

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

MÁRCIA APARECIDA RAMOS LOPES

**Avaliação da viabilidade e aplicação do modelo de pele humana *ex vivo*  
(hOSEC) para estudos de fotoenvelhecimento**

Ribeirão Preto

2022

MÁRCIA APARECIDA RAMOS LOPES

**Avaliação da viabilidade e aplicação do modelo de pele humana *ex vivo*  
(hOSEC) para estudos de fotoenvelhecimento**

**Versão Original**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Clínica Médica  
– Investigação Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Marco Andrey  
Cipriani Frade

Ribeirão Preto

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Lopes, Márcia Aparecida Ramos

Avaliação da viabilidade e aplicação do modelo de pele humana *ex vivo* (hOSEC) para estudos de fotoenvelhecimento. Ribeirão Preto, 2022.

88 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Médica.

Orientador: Frade, Marco Andrey Cipriani.

1. Cultura de explantes de pele humana. 2. Métodos alternativos. 3. Fotoenvelhecimento. 4. Radiação solar. 5. Viabilidade.

Nome: LOPES, Márcia Aparecida Ramos

Título: Avaliação da viabilidade e aplicação do modelo de pele humana *ex vivo* (hOSEC) para estudos de fotoenvelhecimento

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:                    \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

*Dedico este trabalho à minha família, com amor e gratidão, pelo apoio e incentivo incondicional durante toda a minha jornada acadêmica. Especialmente aos meus pais, pelo exemplo de força e determinação, sendo eles a fonte de toda a minha inspiração.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade, pela orientação e por toda a confiança a mim concedida, pelos ensinamentos e exemplo profissional.

Ao colega de laboratório e amigo Dr. Marcel Nani Leite, pela paciência e troca de conhecimentos, seu apoio foi fundamental para a realização deste trabalho.

A todos os colegas do grupo de Hanseníase e Cicatrização, em especial à Cynthia, Danielly, Gislaine, Natália e Sônia, pela convivência e amizade, discussões científicas e entusiasmo a cada nova conquista.

À técnica de laboratório Cici, pelo carinho, zelo e disposição em sempre nos ajudar nos experimentos.

Ao Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Junior do Laboratório de Nutrição da FMRP e à técnica Paula Payão, pela parceria na realização dos experimentos de estresse oxidativo.

À Profa. Dra. Leandra Náira Zambelli Ramalho do Departamento de Patologia da FMRP e à técnica Daisy, pela parceria na realização dos experimentos de imunohistoquímica.

À técnica Patrícia Basile do Departamento de Biologia Básica e Oral da FORP, por disponibilizar o microscópio de luz polarizada para a captura das imagens da coloração de Picrosirius.

Ao técnico Renato do laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental da FMRP, por toda a assistência nas análises da coloração de Picrosirius.

Aos servidores Émerson e Vânia da Secretaria de Pós-Graduação em Clínica Médica da FMRP, pela presteza e profissionalismo de sempre.

Ao Dr. Endrigo Paiva Pontelli e toda sua equipe, pela parceria e colaboração na doação dos fragmentos de pele utilizados neste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio à pesquisa, processo nº 2016/16437-7.

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*“A persistência é o caminho para o êxito.”*

*“Persistence is the path to success.”*

*(Charles Chaplin)*

## RESUMO

LOPES, M. A. R. **Avaliação da viabilidade e aplicação do modelo de pele humana *ex vivo* (hOSEC) para estudos de fotoenvelhecimento.** 2022. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

O fotoenvelhecimento é um dos diversos danos causados pela exposição prolongada à radiação solar, sendo uma preocupação estética que atualmente exige alta demanda terapêutica. Devido a tendência mundial em reduzir o uso de animais em pesquisas, um modelo alternativo se faz necessário para simular esta afecção e permitir a avaliação de cosméticos que atenuem seus efeitos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade e aplicação da cultura de explante de pele organotípica humana (hOSEC) para estudos de fotoenvelhecimento. Foram utilizadas peles provenientes do descarte de cirurgias de abdominoplastia para a montagem do modelo hOSEC e simulador solar Q-Sun XE-1S para reproduzir os danos do fotoenvelhecimento. O modelo hOSEC foi dividido em 4 grupos, o primeiro foi o controle não irradiado (CNI) e os demais foram irradiados em uma potência de 0,35 W/m<sup>2</sup>/nm em diferentes tempos de exposição, de 5, 8 e 10 minutos (grupos IR 5', IR 8' e IR 10', respectivamente). Os grupos foram cultivados por 14 dias e analisados nos dias 0, 7 e 14 por avaliação da viabilidade (método TTC), estudos histológicos para análise da estrutura tecidual e análise de colágeno (colorações HE e Picrosirius), estudos imuno-histoquímicos para avaliação da proliferação, estresse oxidativo e citocinas pró-inflamatórias (marcação de Ki-67, 4-HNE e NFκB, respectivamente), e bioquímicos para quantificação da defesa antioxidante (ensaio de DPPH e GSH) e quantificação dos danos oxidativos (ensaio de MDA e de hidroperóxidos lipídicos por ensaio de FOX). Os resultados do método TTC demonstraram que todos os grupos se mantiveram viáveis durante todo o período de experimento. Histologicamente, todos os grupos irradiados apresentaram estruturas teciduais semelhantes ao CNI até o D7, enquanto no D14 houve danos mais acentuados nos grupos IR 8' e IR 10' quanto a junção dermoepidérmica e quantidade de queratinócitos em apoptose. Quanto ao colágeno, o grupo IR 10' demonstrou uma diminuição exacerbada de colágeno tipo I e um aumento significativo do colágeno tipo III em todos os dias de análise, quando comparado aos demais grupos, enquanto o grupo IR 5' foi semelhante ao CNI. Nos estudos imuno-histoquímicos, a marcação de Ki-67 mostrou que todos os grupos estavam com a capacidade proliferativa preservada na camada basal e, portanto, viáveis durante todo o experimento. Na marcação de 4-HNE houve um aumento de estresse oxidativo no D7 seguindo para uma diminuição no D14 em todos os grupos. Na marcação de NFκB, houve uma diminuição gradativa ao longo dos dias em todos os grupos. Em relação as defesas antioxidantes, não houve resultados significantes entre os grupos no ensaio de DPPH, porém, o CNI apresentou maior quantidade de GSH em relação aos grupos irradiados no D7. Os grupos irradiados demonstraram maiores níveis de estresse oxidativo. Concluindo, o grupo IR 5' se mostrou ideal para o objetivo do estudo, apresentando danos de fotoenvelhecimento sem inviabilizar o modelo. Nossos resultados demonstram a viabilidade e aplicação do modelo hOSEC para o estudo do fotoenvelhecimento, podendo se constituir em uma importante ferramenta para avaliação de produtos cosméticos voltados para a prevenção e tratamento do fotoenvelhecimento.

Palavras-chave: Cultura de explantes de pele humana. Métodos alternativos. Fotoenvelhecimento. Radiação solar. Viabilidade.

## ABSTRACT

LOPES, M. A. R. **Assessment of the viability and application of the *ex vivo* human skin model (hOSEC) for photoaging studies.** 2022. Dissertation (Master's Degree in Internal Medicine) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Photoaging is one of the many damages caused by prolonged exposure to solar radiation, being an aesthetic concern that currently requires high therapeutic demand. Due to the worldwide tendency to reduce the use of animals in research, an alternative model is necessary to simulate this condition and allow the evaluation of cosmetics that attenuate its effects. Thus, the objective of this work was to evaluate the viability and application of human organotypic skin explant culture (hOSEC) for photoaging studies. Discarded skins from abdominoplasty surgeries were used to assemble the hOSEC model and solar simulator Q-Sun XE-1S to reproduce the damage caused by photoaging. The hOSEC model was divided into 4 groups; the first one was the non-irradiated control (NIC) and the others were irradiated at a power of  $0.35 \text{ W/m}^2/\text{nm}$  at different exposure times of 5, 8 and 10 minutes (groups IR 5', IR 8' and IR 10', respectively). The groups were cultured for 14 days and analyzed on days 0, 7 and 14 by viability assessment (TTC method), histological studies for tissue structure analysis and collagen analysis (HE and Picrosirius stainings), immunohistochemical studies to assess proliferation, oxidative stress and pro-inflammatory cytokines (Ki-67, 4-HNE and NF $\kappa$ B stainings, respectively), and biochemicals for quantification of antioxidant defense (DPPH and GSH assay) and quantification of oxidative damage (MDA and lipid hydroperoxides assay by FOX assay). The results of the TTC method showed that all groups remained viable throughout the experiment period. Histologically, all irradiated groups presented tissue structures similar to the NIC until D7, while on D14 there were more accentuated damages in the groups IR 8' and IR 10' regarding the dermoepidermal junction and number of keratinocytes in apoptosis. As for collagen, the group IR 10' showed an exacerbated decrease in type I collagen and a significant increase in type III collagen on all days of analysis, when compared to the other groups, while the group IR 5' was similar to the NIC. In immunohistochemical studies, Ki-67 staining showed that all groups had their proliferative capacity preserved in the basal layer and, therefore, viable throughout the experiment. In the 4-HNE staining, there was an increase in oxidative stress on D7, followed by a decrease on D14 in all groups. In the NF $\kappa$ B staining, there was a gradual decrease over the days in all groups. Regarding antioxidant defenses, there were no significant results between groups in the DPPH assay, however, the NIC showed a higher amount of GSH than the irradiated groups on D7. The irradiated groups showed higher levels of oxidative stress. In conclusion, the group IR 5' proved to be ideal for the study, showing photoaging damages without making the model unfeasible. Our results demonstrate the viability and application of the hOSEC model for the study of photoaging, which may be an important tool for the evaluation of cosmetic products aimed at the prevention and treatment of photoaging.

Keywords: Culture of human skin explants. Alternative methods. Photoaging. Solar radiation. Viability.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema ilustrativo da estrutura da pele .....	16
Figura 2 – Espectro solar .....	18
Figura 3 – Mecanismo do estresse oxidativo .....	23
Figura 4 – Etapas de montagem do modelo hOSEC .....	32
Figura 5 – Simulador solar Q-Sun XE-1S.....	33
Figura 6 – Teste de irradiação.....	35
Figura 7 – Percentual de viabilidade dos grupos irradiados em relação ao grupo CNI pelo método TTC.....	46
Figura 8 – Fotomicrografia dos grupos experimentais pela coloração HE (200x) .....	47
Figura 9 – Fotomicrografia dos grupos experimentais pela coloração HE (400x) .....	48
Figura 10 – Fotomicrografia dos grupos experimentais pela coloração Picrosirius... ..	49
Figura 11 – Percentual de área de colágeno dos grupos experimentais.....	50
Figura 12 – Fotomicrografia dos grupos experimentais pela marcação de Ki-67.....	51
Figura 13 – Quantificação de células positivas de Ki-67 nos grupos experimentais .	52
Figura 14 – Fotomicrografia dos grupos experimentais pela marcação de 4-HNE ...	53
Figura 15 – Quantificação de 4-HNE nos grupos experimentais.....	54
Figura 16 – Fotomicrografia dos grupos experimentais pela marcação de NFκB .....	55
Figura 17 – Quantificação de NFκB nos grupos experimentais.....	56
Figura 18 – Quantificação de DPPH nos grupos experimentais.....	57
Figura 19 – Quantificação de GSH nos grupos experimentais.....	58
Figura 20 – Quantificação do estresse oxidativo pelo ensaio de FOX .....	59
Figura 21 – Quantificação do estresse oxidativo pelo ensaio de MDA.....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	tridimensional
4-HNE	4-hidroxinonenal
a/a	antibiótico/antimicótico
AP-1	Proteína ativadora-1
BHT	butil-hidroxitolueno
CAT	catalase
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNI	Controle não irradiado
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
D0	dia zero
D14	dia quatorze
D7	dia sete
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
DO	densidade ótica
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DTNB	2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzóico ácido
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM	erro padrão das médias
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FOX	<i>Ferrous Oxidation-Xylenol Orange</i>
GPx	glutathione peroxidase
GSH	glutathione reduzida
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
HC	Hospital das Clínicas
HE	Hematoxilina e Eosina
hOSEC	cultura de explante de pele organotípica humana
IL	interleucina

IR 10'	irradiado por 10 minutos
IR 5'	irradiado por 5 minutos
IR 8'	irradiado por 8 minutos
J	Joules
JNK	c-Jun N-terminal quinase
MAPK p38	proteína quinase ativada por mitógeno p38
MDA	malondialdeído
MEC	matriz extracelular
MMPs	metaloproteinases de matriz
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	tampão fosfato de sódio
NFκB	fator nuclear kappa B
PBS	tampão fosfato-salino
RENAMA	Rede Nacional de Métodos Alternativos
RN	Resoluções Normativas
SBF	soro bovino fetal
SiO <sub>2</sub>	dióxido de silício
SOD	superóxido dismutase
TBST	<i>Tris Buffered Saline with Tween</i>
TCA	ácido tricloroacético 50%
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMP	1,1,3,3-tetrametoxipropano
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
TPF	1,3,5-trifenilformazan
TTC	2,3,5-trifenil-tetrazólio
USP	Universidade de São Paulo
UV	ultravioleta

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
1.1 Morfofisiologia cutânea .....	15
1.1.2 Síntese do colágeno .....	17
1.2 Radiação solar .....	18
1.3 Fotoenvelhecimento cutâneo .....	20
1.3.1 Estresse oxidativo e defesa antioxidante .....	22
1.4 Métodos alternativos ao uso de animais .....	24
1.5 Cultura de explante de pele organotípica humana .....	27
2 OBJETIVOS .....	30
2.1 Objetivo Geral .....	30
2.2 Objetivos Específicos .....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	31
3.1 Aspectos éticos .....	31
3.2 Montagem do modelo hOSEC .....	31
3.3 Padronização do experimento .....	33
3.3.1 Experimento I .....	34
3.3.2 Padronização da placa de quartzo .....	34
3.3.3 Experimento II .....	35
3.3.4 Experimento III .....	36
3.3.5 Experimento IV .....	36
3.3.6 Conversão de unidades .....	37
3.3.7 Definição dos grupos .....	37
3.4 Parâmetros para avaliar a aplicação do modelo hOSEC .....	38
3.4.1 Estudo da viabilidade .....	38
3.4.1.1 Método TTC .....	38
3.4.2 Estudo histológico .....	39
3.4.2.1 Coloração HE .....	39
3.4.2.2 Coloração Picrosirius .....	40
3.4.3 Estudo imuno-histoquímico .....	41
3.4.3.1 Marcação de Ki-67 .....	42
3.4.3.2 Marcação de 4-HNE .....	42
3.4.3.3 Marcação de NFκB .....	42
3.4.4 Estudo bioquímico .....	42

3.4.4.1 Ensaio de DPPH.....	43
3.4.4.2 Ensaio de GSH.....	43
3.4.4.3 Ensaio de FOX .....	43
3.4.4.4 Ensaio de MDA.....	44
3.4.4.5 Ensaio de Proteínas Totais.....	44
3.5 Limitações do estudo .....	44
3.6 Análise dos resultados .....	45
4 RESULTADOS .....	46
4.1 Avaliação da viabilidade.....	46
4.1.1 Método TTC .....	46
4.2 Avaliação histológica.....	46
4.2.1 Coloração HE .....	47
4.2.2 Coloração Picrosirius .....	48
4.3 Avaliação imuno-histoquímica .....	50
4.3.1 Marcação de Ki-67.....	50
4.3.2 Marcação de 4-HNE .....	52
4.3.3 Marcação de NFkB .....	54
4.4 Avaliação bioquímica .....	56
4.4.1 Ensaio de DPPH.....	56
4.4.2 Ensaio de GSH .....	57
4.4.3 Ensaio de FOX.....	58
4.4.4 Ensaio de MDA.....	59
5 DISCUSSÃO .....	61
6 CONCLUSÃO.....	71
REFERÊNCIAS.....	72
ANEXOS .....	84

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Morfofisiologia cutânea

A pele é um órgão complexo, estruturado em três camadas (epiderme, derme e hipoderme), fundamental para a proteção do organismo contra agentes físicos, químicos e biológicos. A pele também medeia funções imunológicas, endócrinas e neurais, além de prevenir a perda de fluídos e manter a temperatura corporal, concedendo defesa e reparo ao tecido (DRÉNO *et al.*, 2016; NGUYEN; SOULIKA, 2019; RABE *et al.*, 2006; VOSTÁLOVÁ *et al.*, 2019).

A epiderme é a camada mais externa, constituída principalmente por queratinócitos, e responsável pela umidade, textura e cor da pele. Subdivide-se em estrato basal, espinhoso, granuloso, e córneo, de acordo com a maturação dos queratinócitos (da camada profunda para a superficial). Os mesmos estabelecem a estrutura da epiderme e a produção da queratina – uma proteína fibrosa que auxilia na barreira cutânea (ECKHART; ZEEUWEN, 2018; LOSQUADRO, 2017).

Além dos queratinócitos, a epiderme também contém outros tipos celulares, tais como melanócitos, responsáveis por produzir a melanina – um pigmento que protege os núcleos celulares da radiação ultravioleta (UV) e proporciona cor à pele; células de *Langerhans*, que são células imunes apresentadoras de antígenos; e células de Merkel, que contêm grânulos secretores e estão associadas às terminações nervosas periféricas (LOSQUADRO, 2017; NGUYEN; SOULIKA, 2019).

A derme é composta principalmente por fibroblastos, que são células responsáveis por produzir colágeno e elastina, oferecendo estrutura, força e flexibilidade para a pele. Subdivide-se em duas camadas distintas: derme papilar (superior) e derme reticular (inferior). A derme papilar, localizada abaixo da epiderme, contém fibrócitos, vasos sanguíneos e um conjunto mais frouxo das fibras colágenas, enquanto a derme reticular contém os apêndices cutâneos (foliculos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas) e um conjunto mais denso das fibras colágenas (LOSQUADRO, 2017; NGUYEN; SOULIKA, 2019; RIPPA; KALABUSHEVA; VOROTELYAK, 2019; THULABANDU; CHEN; ATIT, 2017).

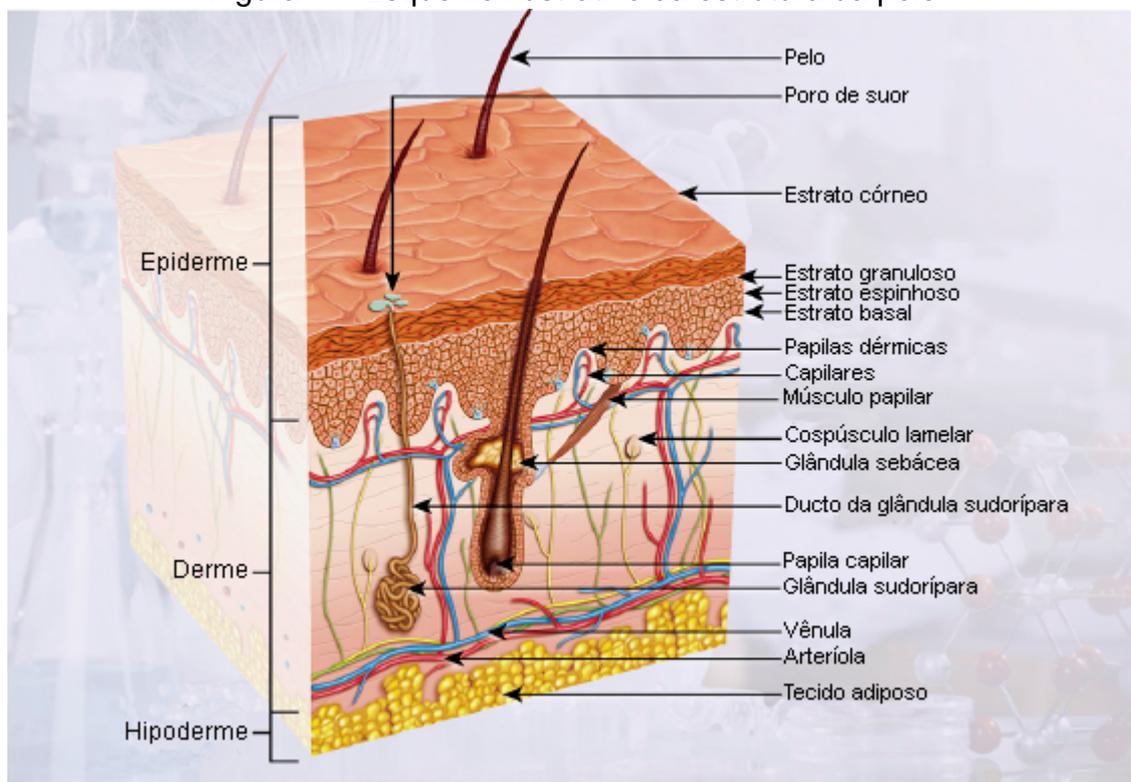
Os fibroblastos sintetizam uma matriz extracelular (MEC) constituída de fibras colágenas, fibras elásticas e proteoglicanos, responsável pela integridade estrutural

da derme. Ambas as camadas dérmicas, papilar e reticular, contêm fibroblastos, miofibroblastos e células imunológicas (macrófagos, linfócitos e mastócitos), entretanto, a MEC da derme reticular possui uma estrutura mais expressada, uma vez que os feixes de colágeno são organizados em fibras densas e, juntamente com os fios de elastina, criam uma rede estruturada (NGUYEN; SOULIKA, 2019; RIPPA; KALABUSHEVA; VOROTELYAK, 2019).

A hipoderme é a camada mais profunda, que atua como suporte e união dos tecidos e órgãos adjacentes. Contém fibrócitos e adipócitos, além da quantidade abundante de proteoglicanos e glicosaminoglicanos. Também armazena energia na forma de ácidos graxos e atua como um órgão endócrino importante para a homeostase da glicose e metabolismo lipídico (LOSQUADRO, 2017; NGUYEN; SOULIKA, 2019).

A figura 1 demonstra didaticamente a estrutura da pele nativa subclassificada em seus três principais compartimentos citados anteriormente (epiderme, derme e hipoderme). Os apêndices da pele, como pelos, glândulas sebáceas, glândulas sudoríparas e vasos sanguíneos, estão embutidos na pele.

Figura 1 – Esquema ilustrativo da estrutura da pele



Fonte: modificado de MATHES; RUFFNER; GRAF-HAUSNER, 2014.

### 1.1.2 Síntese do colágeno

O colágeno é a proteína mais abundante no corpo humano, de estrutura supramolecular complexa com uma hélice tripla característica de três cadeias polipeptídicas, sendo o principal componente dos tecidos conjuntivos por desempenhar um papel central na manutenção de sua integridade estrutural e biológica (GELSE; PÖSCHL; AIGNER, 2003; RICARD-BLUM, 2011; SORUSHANOVA *et al.*, 2019).

Além de contribuir para a arquitetura molecular, forma e propriedades mecânicas dos tecidos, desempenhando uma importante função estrutural, o colágeno também está presente na regulação do crescimento, diferenciação e migração celular por interação de seus receptores com as células, sendo que alguns tipos exercem funções biológicas específicas (RICARD-BLUM, 2011).

A sua biossíntese depende do tipo do colágeno e da isoforma, mas, no geral, a etapa inicial envolve a transcrição de moléculas de mRNA codificadas por várias combinações de três cadeias de diferentes genes de cadeia  $\alpha$  (conversão para procolágeno), seguindo para as duas principais modificações pós-translacionais do colágeno (hidroxilação e glicosilação). O procolágeno é processado proteoliticamente e as triplas hélices dos colágenos resultantes formam agregados supramoleculares. Até que a reticulação natural do colágeno, que ocorre por diferentes vias, fornece estabilidade estrutural, integridade mecânica e resiliência enzimática para os tecidos à base de colágeno (SORUSHANOVA *et al.*, 2018).

Com 28 tipos de colágenos distintos caracterizados de acordo com a sua estrutura e função, cerca de 90% do colágeno total é representado pelos colágenos formadores de fibrila (tipos I, II, III, V e XI). O mais abundante é o tipo I, considerado o colágeno maduro, que compreende aproximadamente 80% da derme e confere à pele resistência à tração. Enquanto o tipo III, considerado o colágeno imaturo, constitui aproximadamente 15% da derme e é responsável pela flexibilidade da pele, sendo abundante em tecidos elásticos e amplamente distribuído em tecidos contendo colágeno tipo I (GELSE; PÖSCHL; AIGNER, 2003; JORGENSEN *et al.*, 2020; LOSQUADRO, 2017; RICARD-BLUM, 2011).

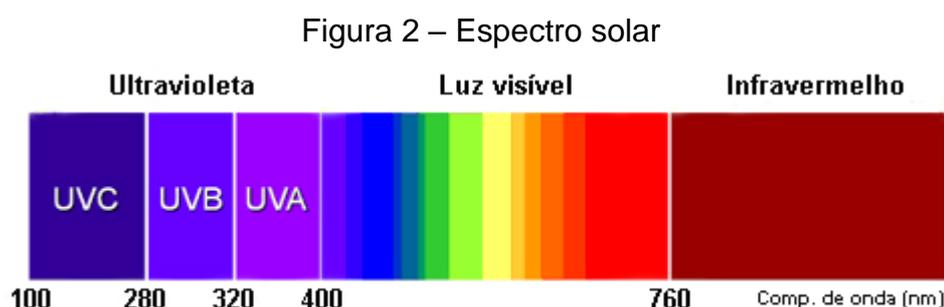
A degradação do colágeno se dá pela ação das metaloproteinases de matriz (MMPs), enzimas proteolíticas zinco-dependentes que participam de processos fisiológicos (desenvolvimento e reparo de tecidos) e patológicos (tumorigênese e

metástase). Os colágenos tipo I e III são degradados principalmente por MMP-1 e MMP-8, mas também por MMP-13 e MMP-14 (RICARD-BLUM, 2011).

Há uma redução natural dos colágenos tipo I e III durante o envelhecimento intrínseco cutâneo, contudo, esta redução é mais intensa no fotodano, uma vez que as MMPs são induzidas pela radiação solar. A repetição deste processo à longo prazo causa fragmentação de colágeno, sendo que este colágeno danificado não suporta um nível de tensão mecânica nos fibroblastos para uma síntese eficiente (VARANI *et al.*, 2006).

## 1.2 Radiação solar

O espectro eletromagnético compreende todas as variedades de radiações, com um determinado comprimento de onda, energia e frequência. Tais radiações são classificadas em radiação ionizante de comprimento de onda curto (cósmica, gama e raios-X) e radiação não ionizante de comprimento de onda longo (UV, luz visível e infravermelho). Estas últimas são emitidas pelo sol, atingindo a superfície da Terra e causando efeitos adversos de acordo com a exposição (Figura 2) (CHRISTENSEN; SUGGS; BARON, 2017; MOHANIA *et al.*, 2017).



Fonte: modificado de Instituto NCB, 2020.

A partícula elementar mediadora da força eletromagnética é chamada de fóton. Quando a pele é atingida por um fóton de luz, ele pode ser refletido, espalhado ou absorvido, sendo que apenas a luz absorvida consegue provocar mudanças químicas nas células e levar à resposta clínica. Quando absorvido, a energia do fóton é transferida para o cromóforo (molécula que absorve luz) que, por sua vez, muda para um estado excitado e transitório e libera energia quando volta ao seu estado normal. Este processo é capaz de alterar o cromóforo ou alterar indiretamente outras

moléculas por meio da transferência de energia, levando a modificações celulares e a uma resposta biológica. Portanto, o espectro de absorção é a probabilidade de absorção de fótons contra o comprimento de onda (CHRISTENSEN; SUGGS; BARON, 2017; MAHMOUD *et al.*, 2008).

A radiação UV fica no intervalo de 100 a 400 nm do espectro eletromagnético, corresponde a aproximadamente 6,8% da radiação solar que atinge a superfície terrestre, sendo considerada a mais biologicamente ativa e, conseqüentemente, a mais prejudicial aos seres humanos. Subdivide-se nos intervalos de UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm), e UVC (100-280 nm), porém, a radiação UVC é completamente filtrada pela camada de ozônio (CHRISTENSEN; SUGGS; BARON, 2017; HUDSON *et al.*, 2020; YOUNG; CLAVEAU; ROSSI, 2017).

A radiação UVA é subdividida em duas regiões, UVA2 (320-340 nm) e UVA1 (340-400 nm), e consiste em aproximadamente 95% da radiação UV que atinge a Terra. Por penetrar as camadas mais profundas da pele (derme, e até mesmo a hipoderme), está mais associada aos efeitos crônicos, tais como dano ao DNA, formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), fotocarcinogênese, fotoenvelhecimento, entre outros (CHRISTENSEN; SUGGS; BARON, 2017; WANG, M. *et al.*, 2019; YOUNG; CLAVEAU; ROSSI, 2017).

A radiação UVB (280-320 nm) representa aproximadamente 5% da radiação UV terrestre e, embora induza a síntese de vitamina D, seus efeitos são muito mais nocivos que os da UVA. Atinge as camadas mais superficiais da pele (epiderme e derme superficial), sendo associada mais aos efeitos agudos, incluindo eritema, pigmentação da pele, mutações gênicas e câncer (MOHANIA *et al.*, 2017; WANG, M. *et al.*, 2019; YOUNG; CLAVEAU; ROSSI, 2017).

A radiação visível ao olho humano, conhecida por visível ou luz visível, fica no intervalo de 400 a 760 nm, e consiste em 44% da energia solar a nível do mar. Assim como o infravermelho, não havia sido muito estudada até recentemente, portanto, seus efeitos ainda não estão bem definidos na literatura. Contudo, os dados disponíveis indicam vários efeitos biológicos associados a luz visível, incluindo eritema, pigmentação, geração de EROs e, associado a este último, danos indiretos ao DNA (CHRISTENSEN; SUGGS; BARON, 2017; HUDSON *et al.*, 2020; MAHMOUD *et al.*, 2008; NARLA *et al.*, 2020).

O infravermelho fica no intervalo de 760 nm até 1 mm, corresponde a aproximadamente 40% da radiação solar que atinge a superfície terrestre, e sua

exposição é percebida como calor. Subdivide-se em IRA (760-1400 nm), IRB (1400-3000 nm) e IRC (3000 nm-1 mm), sendo capaz de atingir a epiderme, derme e hipoderme em diferentes extensões, dependendo da faixa exata do comprimento de onda. O infravermelho é responsável por uma série de efeitos biológicos, mais significativamente no aumento dos níveis de expressão de proteína e mRNA de MMPs, contribuindo ao fotoenvelhecimento da pele (BAROLET; CHRISTIAENS; HAMBLIN, 2016; HUDSON *et al.*, 2020).

Ao longo dos anos, as consequências da exposição da pele à radiação UV foram amplamente estudadas, desta forma, sua capacidade de induzir fotoenvelhecimento, supressão imunológica e câncer de pele já é bem conhecida. Por outro lado, o impacto da radiação visível e infravermelho não receberam devida atenção, fazendo com que a resposta da pele a tais radiações esteja menos documentada. Todavia, como a radiação solar é policromática, a influência individual, assim como as combinações dos intervalos (UV, visível e infravermelho), necessita de uma investigação mais aprofundada (BAROLET; CHRISTIAENS; HAMBLIN, 2016; HUDSON *et al.*, 2020).

### 1.3 Fotoenvelhecimento cutâneo

O envelhecimento intrínseco resulta de fatores genéticos e hormonais, enquanto o envelhecimento extrínseco está associado a fatores ambientais, tais como poluição, tabagismo, estresse, e em especial, a radiação solar. Esta última induz a formação de EROs, danifica o DNA, entre outros, e o seu papel no envelhecimento extrínseco está tão bem definido que, para enfatizar essa relação de causa e efeito, foi criado o termo fotoenvelhecimento (CHRISTENSEN; SUGGS; BARON, 2017; KRUTMANN *et al.*, 2017).

O fotoenvelhecimento refere-se à sobreposição de danos crônicos induzidos pela exposição prolongada à radiação solar no envelhecimento natural, sendo responsável por grande parte das mudanças relacionadas à idade na aparência da pele, pois muitas das funções são naturalmente diminuídas no envelhecimento intrínseco, mas as mesmas demonstram um declínio acelerado na pele fotoenvelhecida, afetando mais gravemente indivíduos de pele clara (RABE *et al.*, 2006; YAAR; GILCHREST, 2007).

Quando a pele é exposta à radiação solar excessiva, uma superprodução de EROs é induzida na epiderme, responsável por ativar o fator nuclear kappa B (NFκB) que, por sua vez, induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina (IL) (IL-1, IL-6 e IL-8) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) de queratinócitos da epiderme. As EROs também levam à ativação do receptor através da inibição da enzima proteína-tirosina fosfatase-κ. Quando o receptor é ativado, ocorre uma sinalização intracelular por meio da proteína quinase ativada por mitógeno p38 (MAPK p38) e da c-Jun N-terminal quinase (JNK), ativando consequentemente o fator de transcrição de Proteína ativadora-1 (AP-1). A AP-1 é responsável por aumentar a transcrição de MMPs e diminuir a expressão dos genes do procolágeno (I e III) e dos receptores TGF-β, reduzindo a formação da MEC. A radiação solar, por meio do recrutamento de neutrófilos e da liberação de MMP-8, degrada a matriz de forma ainda mais acentuada. As EROs também levam à formação de grupos carbonilas, ao acúmulo de proteínas dérmicas danificadas oxidadas e, por fim, as mitocôndrias exibem grandes deleções de DNA e função comprometida (LIM *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2016; YAAR; GILCHREST, 2007).

As alterações histológicas induzidas pelo fotoenvelhecimento são variáveis, mas, de modo geral, a pele fotoenvelhecida apresenta algumas características. Existe um aumento da compactação do estrato córneo e da espessura da camada de células granulares e uma diminuição da espessura da epiderme, clinicamente conhecido como pele seca. Atipia nuclear, perda da maturação ordenada e progressiva dos queratinócitos, hiperplasia epidérmica irregular ou hipoplasia, e inflamação dérmica ocasional, representam as características da ceratose actínica. Irregularidades na pigmentação podem ocorrer devido à redução ou aumento do número de melanócitos hipertróficos e fortemente dopa-positivos (sardas) ou ao alongamento das cristas rete epidérmicas e aumento do número e melanização de melanócitos (lentigo). Outras alterações que caracterizam a pele fotoenvelhecida incluem um aumento exacerbado na deposição de glicosaminoglicanos e fibras elásticas fragmentadas, das proteínas da MEC dérmica (elastina, glicosaminoglicanos e colágeno intersticial), além da substituição das fibras colágenas maduras por fibras colágenas com uma aparência mais basofílica, chamada de degeneração basofílica. Por fim, a característica mais acentuada do fotoenvelhecimento, que não é observada na pele naturalmente envelhecida, é conhecida clinicamente como elastose e ocorre da alteração das fibras elásticas, abrangendo uma porção variável do compartimento dérmico, com início na

junção da derme papilar e reticular (BERNEBURG; PLETTENBERG; KRUTMANN, 2000; YAAR; GILCHREST, 2007).

Embora já existam inúmeros tratamentos disponíveis, o fotoenvelhecimento deve ser prevenido, a fim de retardar seus efeitos. Sendo que a prevenção primária continua sendo a proteção solar, desde o uso de filtros solares a acessórios (roupas de proteção, óculos de sol), além de evitar a exposição nos horários de pico (10h-16h). Outra forma de prevenção e, neste caso, até mesmo reversão, seria o uso de antioxidantes, uma vez que já está bem definido o papel do estresse oxidativo na indução do fotoenvelhecimento (BERNEBURG; PLETTENBERG; KRUTMANN, 2000; RABE *et al.*, 2006).

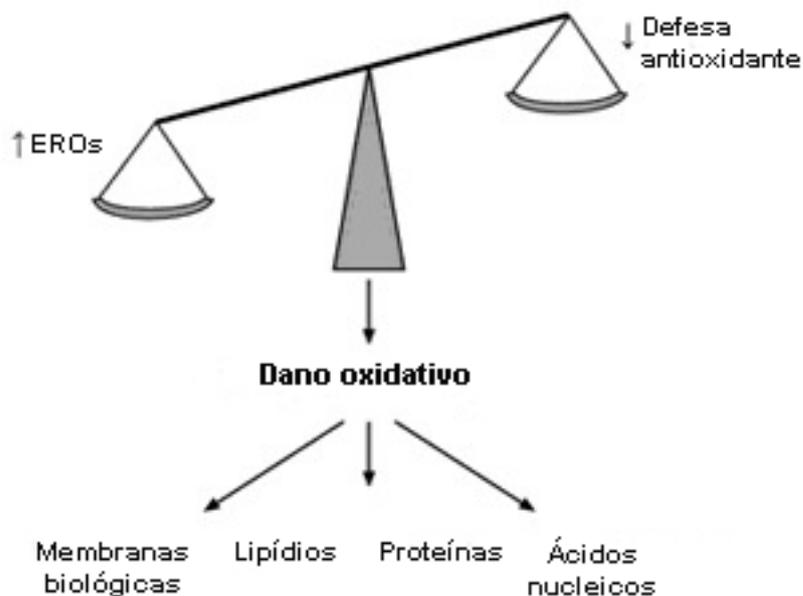
### 1.3.1 Estresse oxidativo e defesa antioxidante

As EROs são moléculas que contêm oxigênio em sua composição e estão ativas na natureza, induzindo a sinalização proliferativa e de sobrevivência celular, podendo danificar DNA, membranas lipídicas, estruturas de colágeno e função mitocondrial. As mais comuns incluem ânion superóxido, peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxila altamente ativo, oxigênio singlete, peróxidos lipídicos e óxidos de nitrogênio (BAEK; LEE, 2016; GU *et al.*, 2020).

A peroxidação lipídica de cadeias de ácidos graxos insaturados por EROs produz hidroperóxidos lipídicos como produtos primários, que podem se concentrar nas membranas celulares proporcionalmente à dose cumulativa de radiação solar na pele. Os peróxidos lipídicos podem ser decompostos em várias espécies de aldeídos reativos, como malondialdeído (MDA), 4-hidroxinonenal (4-HNE), e outros aldeídos e cetonas saturadas e insaturadas. Tais produtos colaterais reativos podem ser mutagênicos, carcinogênicos ou introduzir modificações em aminoácidos, iniciando a autoimunidade neste último caso (KAMMEYER; LUITEN, 2015).

Todos os tipos de células da pele são capazes de produzir EROs em resposta a sinais de citocinas, radiação UV, cosméticos, medicamentos e estímulos fisiológicos. Normalmente, existe um equilíbrio entre a produção e eliminação das EROs devido ao sistema antioxidante, do contrário ocorre um acúmulo dessas moléculas causando o estresse oxidativo (Figura 3) (BAEK; LEE, 2016; GU *et al.*, 2020).

Figura 3 – Mecanismo do estresse oxidativo



Fonte: modificado de MARCOCCI; LEO; ALTEA, 2012.

O estresse oxidativo desempenha um papel fundamental no envelhecimento cutâneo, assim como nos danos dérmicos, uma vez que pode resultar na deterioração estrutural e funcional das células. Diminuir o estresse oxidativo pode ser uma das mais importantes alternativas de prevenção e redução de uma série de doenças cutâneas, como o câncer. Contudo, a supressão total do estresse oxidativo não é conveniente ou indicada, já que a sinalização induzida por EROs é considerada uma ferramenta vital na homeostase celular (BAEK; LEE, 2016; KAMMEYER; LUITEN, 2015; LEPHART, 2016).

Antioxidantes são quaisquer moléculas capazes de bloquear os radicais livres e/ou EROs de roubar elétrons de outros átomos, inibindo o dano devido a oxidação. São classificados em endógenos e exógenos, sendo que a pele possui um vasto sistema antioxidante que previne e repara os danos oxidativos (BAEK; LEE, 2016; LEPHART, 2016).

Tanto os antioxidantes enzimáticos – superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), quanto os não enzimáticos – glutathiona reduzida (GSH), ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), são componentes essenciais da defesa cutânea contra o dano causado por EROs. O SOD catalisa a partição do superóxido em oxigênio molecular ou  $H_2O_2$ . A CAT converte o  $H_2O_2$  em água e oxigênio molecular, completando a ação do SOD. A GPx é semelhante à CAT, sendo capaz de exercer a mesma conversão. A GSH é a principal defesa antioxidante

intracelular não enzimática contra EROs e exerce um papel fundamental na redução do estresse oxidativo. Uma vez que os antioxidantes endógenos ficam sobrecarregados durante o estresse oxidativo, se torna necessário o uso de antioxidantes exógenos para neutralizar a produção de EROs mediada pela radiação solar (BAEK; LEE, 2016; LEPHART, 2016; KHAN *et al.*, 2018; WANG, P. W. *et al.*, 2019).

Os antioxidantes estão mais concentrados na epiderme – SOD (125%), CAT (720%) e GPx (60%) em comparação com a derme, sendo possível a obtenção dos mesmos por meio da ingestão de alimentos. A administração tópica ou oral de antioxidantes também representa uma proteção cutânea contra o estresse oxidativo, já que muitas dessas substâncias são utilizadas para o restabelecimento do equilíbrio redox cutâneo, prevenção e tratamento de patologias associadas as EROs (BAEK; LEE, 2016; LEPHART, 2016).

#### **1.4 Métodos alternativos ao uso de animais**

O conceito de métodos alternativos foi expresso pela primeira vez em 1959 por Russell e Burch, com a publicação de um guia ético implementando o princípio dos 3 Rs (do inglês: *replacement, reduction e refinement* – em português: substituição, redução e refinamento). De acordo com a publicação, a substituição consta na substituição por animais superiores vivos e conscientes de material inconsciente, a redução consta na redução do número de animais usados para obter informações de determinada quantidade e precisão, e o refinamento constitui qualquer diminuição na incidência ou severidade de procedimentos desumanos aplicados aos animais que ainda precisam ser usados (ROLLIN, 2009; RUSSELL; BURCH, 1959).

A definição de substituição reflete a falta de dados e informações disponíveis naquele momento, já que hoje, com o avanço da ciência, a substituição geralmente envolve técnicas que não utilizam animais. Já a redução e o refinamento não levam à substituição, sendo considerados apenas como medidas temporárias para os casos em que ainda não for possível a substituição. Mas devido a tendência mundial à não utilização de animais em pesquisas experimentais, a comunidade científica busca cada vez mais métodos alternativos com o propósito de uma ciência mais ética no futuro (FARNAUD, 2009).

Todo medicamento ou cosmético precisa ter sua eficácia e segurança avaliada antes de ser comercializado, sendo que, anteriormente, tais testes de toxicidade eram realizados exclusivamente em modelos animais. Contudo, as objeções éticas e econômicas contra o uso de animais vêm crescendo na sociedade como um todo, além da preocupação da relação entre a biologia das espécies de teste e humana (BASKETTER *et al.*, 2013; KREWSKI *et al.*, 2010; VINARDELL, 2015).

Em 2013, a União Europeia proibiu a comercialização de cosméticos contendo substâncias testadas em animais, assim como outros países também baniram os testes em animais ao longo dos anos (VINARDELL, 2015). Dentre eles estão Austrália, Israel, Índia, Guatemala, Noruega, Nova Zelândia, Suíça e Turquia, totalizando 40 países até o momento, e muitos outros estão em processo de implementação, como é o caso dos Estados Unidos e do Brasil, que já possuem leis estaduais proibindo os testes em animais.

O cenário brasileiro foi marcado pela implantação da Lei Arouca - 11.794/08 (BRASIL, 2008), estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais e criando o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O CONCEA é responsável por monitorar e avaliar a introdução de métodos alternativos ao uso de animais em atividades de ensino e pesquisa científica, em consonância com o princípio dos 3 Rs, assim como publicar Resoluções Normativas (RN) a fim de reconhecer novas metodologias. No qual, a RN 18/2014 passou a reconhecer dezessete métodos alternativos ao uso de animais, depois mais sete com a RN 31/2016 e mais um com a RN 45/2019. Nesse sentido, também foi criada a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA) em 2012, com o objetivo de promover o desenvolvimento, a validação e a certificação de tecnologias e de métodos alternativos ao uso de animais para os testes de segurança e de eficácia de medicamentos e cosméticos (MORETTO; STEPHANO, 2019).

Todo esse movimento refletiu na comunidade científica, no sentido de desenvolver e validar métodos *in vitro* ou *ex vivo* que não envolvam o sacrifício de animais ou o uso de seres humanos. Segundo Mathes, Ruffner e Graf-Hausner (2014), os modelos são classificados de acordo com sua complexidade biológica em: monoculturas de células humanas, epiderme humana reconstruída, pele humana reconstruída de espessura total, seguindo para o mesmo modelo com adição de outros tipos de células, explantes de pele humana *ex vivo*, e *multi-organ-chip*.

As culturas convencionais em monocamadas apresentam apenas um tipo de célula (primária ou linhagem celular) e seu uso foi essencial para modelar o desenvolvimento humano e as doenças no passado. Contudo, tais ensaios são mais limitados que os modelos tridimensionais (3D) por não considerarem a complexidade das interações celulares que ocorrem, devido à falta de arquitetura de tecido e complexidade do modelo (CORRÒ; NOVELLASDEMUNT; LI, 2020; LEBONVALLET *et al.*, 2010).

A epiderme humana reconstruída é feita de queratinócitos, sendo semelhante a uma epiderme totalmente estratificada e funcional, enquanto o modelo de espessura total é feito de queratinócitos primários e derivados de células cultivados em um equivalente dérmico, muitas vezes semeado com fibroblastos. Contudo, ambos modelos não demonstram muita eficiência em estudos de penetração, uma vez que suas propriedades de barreira são menos desenvolvidas. Esta limitação é devida a diferença na composição e organização lipídica quando comparada à pele nativa (LEBONVALLET *et al.*, 2010; MATHES; RUFFNER; GRAF-HAUSNER, 2014; NIEHUES *et al.*, 2018).

O explante de pele *ex vivo* é proveniente da doação de pele humana após cirurgias ou biópsias, sendo cultivado em meio de cultura que permite seu estudo durante dias. Apesar de oferecer muitas vantagens, pode apresentar variabilidade da pele dos pacientes, assim como a espessura e o número de células presentes (LEBONVALLET *et al.*, 2010; LEITE *et al.*, 2021).

O *multi-organ-chip* é constituído por diferentes modelos organotípicos que podem ser integrados, fornecendo a comunicação por sistemas fluídicos. Acredita-se que este seja o futuro da avaliação pré-clínica, contudo, ainda se faz necessário um alto investimento no modelo e uma solução para a interferência cruzada entre moléculas devido a pequena contagem de células e a diluição significativa (MATHES; RUFFNER; GRAF-HAUSNER, 2014; WAGNER *et al.*, 2013).

Outra possibilidade que pode ser útil no futuro é o modelo *in virtuo*, onde programas de software informático são desenvolvidos em resposta a uma necessidade específica. Consiste em um código interpretável por computadores, proveniente do reagrupamento, tratamento e transformação de todos os dados disponíveis sobre os processos biológicos. Necessita de uma busca minuciosa na literatura para definição do conjunto inicial de regras, a fim de dominar o comportamento celular, uma vez que o comportamento dos agentes de software é

baseado em regras genéricas de divisão, migração, diferenciação e sinalização celular. Além de possuir um ambiente 3D, são interativos, com possíveis modificações durante a sua utilização (LEBONVALLET *et al.*, 2010; SUN *et al.*, 2007).

Com o avanço científico surgiram muitas opções de métodos alternativos ao uso de animais. Todos os modelos apresentam suas vantagens e limitações, portanto, a escolha do mesmo deve ser decidida conforme a finalidade do estudo, além de que alguns deles podem ser complementares de acordo com os objetivos ou disponibilidade de recursos.

### **1.5 Cultura de explante de pele organotípica humana**

A cultura de explante de pele organotípica humana (hOSEC, do inglês *human Organotypic Skin Explant Culture*) é considerada o modelo mais próximo a pele humana *in vivo* devido a existência de todos os tipos celulares, diferente dos demais modelos 3D que, geralmente, possuem somente queratinócitos e fibroblastos em uma MEC desvitalizada. O modelo hOSEC permite avaliação de formulações destinadas à aplicação cutânea, por apresentar uma interface ar-líquido, enquanto os sistemas de culturas celulares permitem apenas o uso de substâncias solúveis no meio de cultura (FRADE *et al.*, 2015).

Os explantes são pequenas amostras de pele provenientes do descarte de cirurgias, sendo um método de baixo custo e com maior facilidade de obtenção. Podem ser de espessura total (epiderme, derme e hipoderme) ou parcial (epiderme e derme), proveniente de doadores saudáveis ou com doenças de pele, utilizados em diferentes áreas de pesquisas e mantidos em cultura por um prazo maior que os demais modelos. Contudo, também apresentam algumas limitações, tais como variabilidade entre os doadores, quantidades limitadas de pele viável disponível, preparo exigente e demorado, perda dos sistemas vascular e nervoso, além de certos tipos de células (células endoteliais, melanócitos e células de *Langerhans*), que são perdidos na cultura ao longo do tempo (LEBONVALLET *et al.*, 2010; MATHES; RUFFNER; GRAF-HAUSNER, 2014; VOSTÁLOVÁ *et al.*, 2019).

O modelo tem sido estudado há mais de cinquenta anos, sofrendo melhorias constantes para otimizar o tecido nos estudos de pesquisa e desenvolvimento de terapêuticas e formulações, particularmente nos estudos com foco na MEC, na

estrutura 3D ou nas interações entre diferentes tipos de células cutâneas. Apresentando assim inúmeras vantagens frente aos equivalentes de pele, uma vez que suas características podem ser mantidas *in vitro*, fazendo com que a pele possa simular melhor a situação *in vivo* (LEBONVALLET *et al.*, 2010; NEIL; BROWN; WILLIAMS, 2020; WAGNER *et al.*, 2013).

Modelos de pele e amostras de tecido já são comercializados com a proposta de testar efetivamente produtos químicos, farmacêuticos e cosméticos, sem a necessidade de recorrer a testes em animais. Com uma variedade de modelos disponíveis, tais como o de duas camadas para aplicações sistêmicas e tópicas, três camadas para estudar os efeitos da administração subcutânea, de inflamação com fenótipo semelhante à psoríase para avaliar a eficácia de medicamentos tópicos para o tratamento de psoríase e produtos biológicos injetados por via subcutânea, entre outros, para atender diferentes estudos (GENOSKIN, 2020).

O modelo hOSEC já foi utilizado para avaliação do perfil de distribuição cutânea de fármacos, demonstrando que moléculas podem ser quantificadas neste modelo (LEITE *et al.*, 2021), na caracterização de um modelo de lesão por queimadura profunda de segundo grau, confirmando que o mesmo pode ser usado para avaliação terapêutica de moléculas aplicadas topicamente (GROSS-AMAT *et al.*, 2020), na avaliação do modelo para prever reações de hipersensibilidade a drogas, comprovando que o mesmo é capaz de antecipar o potencial de uma droga diferente dos testes toxicológicos padrão (AHMED *et al.*, 2019), na avaliação dos danos induzidos por UVB, provando que o modelo é apropriado para testar o impacto da exposição nas atividades celulares em pele humana (KHALIL, 2018), nos estudos de migração celular na pele após sensibilização química (JACOBS *et al.*, 2006) e de dermatite de contato alérgica e toxicidade (JACOBS *et al.*, 2004), entre muitos outros, demonstrando que o modelo é versátil e útil em um grande painel de doenças e processos, incluindo doenças imunes, cicatrização de feridas, envelhecimento e câncer (LEBONVALLET *et al.*, 2010).

Nesse contexto, nosso grupo também vem desenvolvendo estudos promissores com o modelo hOSEC, tais como caracterização do modelo para manutenção do bacilo *Mycobacterium leprae*, avaliação da atividade cicatrizante de nanoemulsão lipídica à base de extratos vegetais, influência da fototerapia na cicatrização, e validação do modelo para ensaios de absorção de insumos farmacêuticos.

Em decorrência da alta demanda por tratamentos eficazes nos efeitos do fotoenvelhecimento, este trabalho foi desenvolvido com o intuito de demonstrar um modelo alternativo e os parâmetros biológicos que melhor reflitam o envelhecimento induzido pela exposição da pele à radiação solar. Os mesmos poderão ser utilizados como marcadores para a avaliação da eficácia de protetores solares e antioxidantes, entre outros produtos comerciais de uso tópico, além de contribuir para o desenvolvimento tecnológico nacional, com significativa redução nos custos metodológicos e no tempo de execução das análises.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a viabilidade e aplicação do modelo de pele humana *ex vivo* (hOSEC) para estudos de fotoenvelhecimento.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Definir a dose de radiação ideal, utilizando o aparelho Q-Sun para exposição do modelo hOSEC;
- Induzir danos indicadores de fotoenvelhecimento no modelo hOSEC;
- Avaliar a viabilidade tecidual e estrutural do modelo hOSEC exposto à radiação;
- Avaliar a qualidade e quantidade de colágeno do modelo hOSEC exposto à radiação;
- Avaliar os níveis de atividade antioxidante e de estresse oxidativo do modelo hOSEC exposto à radiação.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Aspectos éticos

A pele foi obtida do descarte de cirurgias plásticas de abdominoplastia realizadas no Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP), com intuito de aproveitar os resíduos dos centros cirúrgicos, de acordo com os seguintes critérios de inclusão e não-inclusão:

- critérios de inclusão: pacientes do sexo feminino com idade entre 18 a 45 anos e fototipos II e III, com pele sadia na área do teste;
- critérios de não-inclusão: antecedentes de câncer de pele; marcas cutâneas sobre a área experimental que pudessem interferir na avaliação dos métodos, como problemas de pigmentação, cicatriz, tatuagem, excesso de pelos, efélides, excesso de nevos, excessivo bronzamento ou queimadura solar, eczemas, escara ou sequela de pigmentação de testes anteriores; histórico de alergias; hiper-reatividade cutânea e dermatografismo.

As participantes foram convidadas previamente à cirurgia, por meio de uma abordagem física, realizada na sala de espera, antes de serem encaminhados ao centro cirúrgico do HC. A pele só foi utilizada após a paciente aceitar participar do estudo, ler e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – ANEXO B) de doação do descarte de pele proveniente da cirurgia.

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HC (Número de processo do CEP: 11290/2018 – ANEXO A).

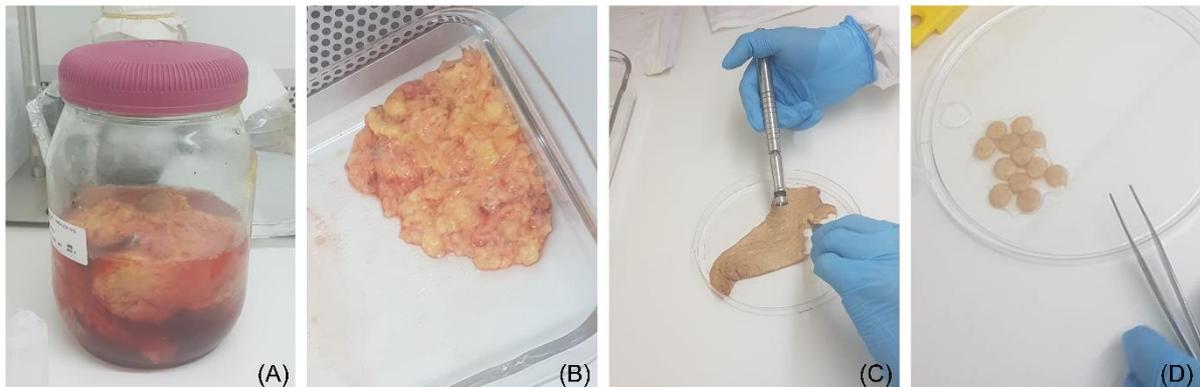
### 3.2 Montagem do modelo hOSEC

A pele removida da paciente foi acondicionada em um recipiente de vidro estéril, fechado hermeticamente e mantido em uma caixa térmica hospitalar para ser transportado ao Laboratório de Cicatrização e Hanseníase, localizado dentro do campus da USP de Ribeirão Preto. No laboratório, o material foi transferido para um novo recipiente estéril com solução tampão fosfato-salino (PBS) a 1,5% de

antibiótico/antimicótico (a/a) com penicilina 10.000 U, estreptomicina 10.000 µg e anfotericina B 25 µg (GIBCO - Invitrogen Corporation, Nova York, Estados Unidos), e o mesmo foi mantido em geladeira a 4°C, *overnight*, para o processo de descontaminação da pele.

Na manhã seguinte, o material foi manipulado dentro de um fluxo laminar, o tecido adiposo subcutâneo foi removido com o auxílio de uma tesoura curva e de uma pinça, e os fragmentos de pele foram extraídos com o auxílio de um *punch* cirúrgico de 10 mm de diâmetro (Figura 4), todos os materiais utilizados foram previamente esterilizados. Os explantes foram dispostos em placas de cultura de 12 poços, sendo alocado um fragmento por poço, posicionados com o lado dérmico sobre papel filtro (80 g/m<sup>2</sup>, permeabilidade ao ar 26 l/s m<sup>2</sup>, porosidade 25 µm) apoiados em grades metálicas de aço inoxidável. Essa estrutura foi utilizada para permitir uma interface ar-líquido, de modo que a derme permanecesse submersa no meio de cultura enquanto a epiderme estivesse em contato com o ar.

Figura 4 – Etapas de montagem do modelo hOSEC



Fonte: elaborada pela autora. (A) pele em processo de descontaminação. (B) tecido adiposo subcutâneo removido. (C) pele viável (derme e epiderme) para seccionamento dos explantes. (D) explantes finalizados com 10mm de diâmetro.

Os explantes foram cultivados em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (GIBCO - Invitrogen Corporation, Nova York, Estados Unidos), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (GIBCO - Invitrogen Corporation, Nova York, Estados Unidos), 1% de L-glutamina (GIBCO - Invitrogen Corporation, Nova York, Estados Unidos) e 1% de solução de a/a, adicionando aproximadamente 2 mL de meio em cada poço, de forma que o volume não ultrapassasse a altura da derme para manter a epiderme acima da interface ar-líquido. As placas foram

mantidas em incubadora à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por um período de quatorze dias, com troca do meio a cada dois dias, no qual 1 mL do meio antigo era retirado e 1 mL de meio fresco adicionado.

### 3.3 Padronização do experimento

Foi utilizado o aparelho simulador solar Q-Sun XE-1S (Q-Lab, Westlake, Estados Unidos) (Figura 5), que reproduz o espectro total da luz solar (radiação UV, luz visível e infravermelho). Este aparelho possui uma lâmpada de arco de xenônio e um filtro de luz diurna, capaz de simular a luz solar direta e melhor correlacionar a exposição natural. Sua potência é dada em Watts (W), mínimo de 0,25 W/m<sup>2</sup>/nm a 0,68 W/m<sup>2</sup>/nm no máximo, o controle de irradiância está disponível em 340 nm e a temperatura pode ser ajustada entre 35°C a 103°C.

Figura 5 – Simulador solar Q-Sun XE-1S



Fonte: elaborada pela autora. (A) simulador solar de amplo espectro. (B) parte interna do simulador, onde as placas foram dispostas para exposição à radiação.

Como não há padronização de exposição solar oferecida pelo equipamento ou protocolo similar para os modelos de pele humana *ex vivo* na literatura, o modelo HOSEC foi exposto a diferentes potências de radiação e tempos de exposição até definir uma dose capaz de causar danos sem inviabilizar o tecido, considerada a dose ideal para o objetivo do estudo.

Para a exposição à radiação, as grades com os explantes foram transferidas para uma outra placa de cultura de 12 poços, com o auxílio de uma pinça. Foi adicionado 2 mL de solução salina com solução de a/a a 1% em cada poço. Após a

exposição, as grades foram transferidas novamente para as placas originais, com o meio de cultura, e levadas a incubadora à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.3.1 Experimento I**

Primeiramente, foi utilizada a potência de 0,60 W/m<sup>2</sup>/nm nos tempos de 10, 20, 40 e 60 minutos em dias alternados e com temperatura à 38°C. A proposta inicial era de um experimento de 30 dias, com análise de amostras no D7, D15 e D30. Contudo, houve contaminação dos explantes, sendo possível a cultura somente até D13, alterando a retirada de amostras para D7, D11 e D13 e, devido a isso também, não restaram fragmentos dos grupos de 10 e 20 minutos para análise histológica no D13.

Foi possível notar que ao longo dos dias os explantes sofriam uma separação da junção dermoepidérmica e apresentavam excesso de morte celular na camada basal, demonstrando danos bem mais acentuados que o esperado para o estudo em questão. Além de que, ficou clara a necessidade de realizar a irradiação com a placa vedada, já que houve contaminação das amostras antes do tempo previsto para término do experimento.

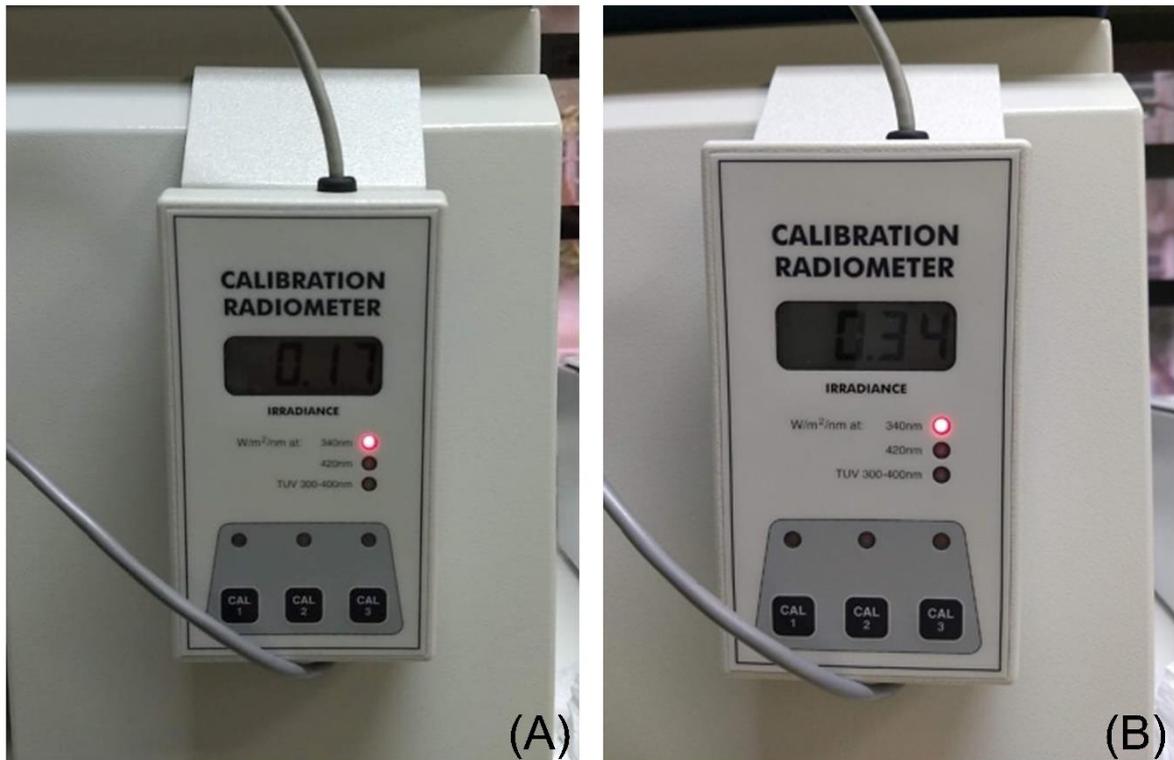
### **3.3.2 Padronização da placa de quartzo**

Para evitar contaminação das amostras de pele, uma vez que o simulador solar fica fora do fluxo laminar, foi necessário realizar a irradiação com a placa fechada. Porém, a tampa original da placa de cultura não deixa a luz passar completamente.

A placa de quartzo é um material translúcido, que permite toda a passagem da luz, destinado ao uso industrial e científico em trabalhos com radiação ou altas temperaturas. Foi utilizada uma placa com 99,99% de pureza em dióxido de silício (SiO<sub>2</sub>) e dimensões de 85 x 125 x 2,1 mm (Actquartzo Industrial, Campinas, Brasil).

Para confirmar se a placa realmente permitia toda a passagem da luz, foi realizado um teste utilizando o radiômetro de calibração (Q-Lab, Westlake, Estados Unidos) que acompanha o simulador solar, demonstrando que a placa não alterava a irradiação – por confirmar a irradiância no ponto de 340 nm, diferentemente da tampa original da placa de cultura (Figura 6).

Figura 6 – Teste de irradiação



Fonte: elaborada pela autora. (A) irradiação da tampa original de uma placa de cultura. (B) irradiação da placa de quartzo utilizada no estudo.

Os resultados mostraram uma grande redução de contaminação após o uso da placa de quartzo, que a partir desta padronização foi utilizada durante todo o estudo, sendo presa em cima da placa de cultura com o auxílio de dois elásticos laterais.

### 3.3.3 Experimento II

Devido a danificação exacerbada da primeira potência utilizada, foi realizado um novo experimento com redução da potência, tempo de exposição e frequência, modificado para  $0,50 \text{ W/m}^2/\text{nm}$ , por 10 minutos, duas vezes por semana. Manteve-se o tempo de 30 dias, porém, com análise em D0, D7, D15, e D30, visto a necessidade de uma comparação do modelo hOSEC com apenas uma irradiação no D0 com as demais análises ao longo do experimento.

Contudo, mesmo com a utilização da placa de quartzo, houve contaminação no D13 novamente, além de que foi observado que a potência ainda estava muito intensa para o modelo hOSEC, com danos muito próximos aos da tentativa anterior, sendo necessário um novo ajuste da dose e também do tempo de experimento.

### **3.3.4 Experimento III**

A partir dos experimentos anteriores, ficou claro a necessidade de uma redução mais extrema de todas as unidades envolvidas, chegando assim a uma nova potência de  $0,35 \text{ W/m}^2/\text{nm}$ , por 2 e 5 minutos e temperatura de  $38^\circ\text{C}$ , três vezes por semana. O tempo de experimento foi reduzido para 21 dias e, como houve uma alteração muito grande de uma análise para a outra nos experimentos anteriores, o intervalo de análises foi alterado para D0, D3, D6, D8, D10, D12, D15, D18 e D21, a fim de acompanhar a evolução dos danos de uma irradiação para a outra.

A partir do D15 não foi possível retirar mais amostras, tampouco continuar o experimento até o planejado, devido a uma contaminação. Como as etapas para o processo de irradiação exigem muita manipulação, concluiu-se que o ideal seria reduzir ainda mais o tempo de experimento, de forma que a radiação aplicada causasse os danos esperados em um menor tempo.

Foi possível observar que até o último dia de análise, D12, a estrutura da pele foi mantida nos dois grupos, porém, somente o grupo irradiado por 5 minutos apresentou alterações da pele, enquanto o grupo irradiado por 2 minutos ficou muito semelhante ao grupo controle e, portanto, foi descartado.

### **3.3.5 Experimento IV**

Baseado no experimento III, manteve-se a potência de  $0,35 \text{ W/m}^2/\text{nm}$ , por 5 minutos e temperatura de  $38^\circ\text{C}$ , três vezes por semana, com redução do tempo de experimento para 14 dias, além da adição de dois novos tempos de exposição, 8 e 10 minutos, a fim de confirmar qual grupo apresentaria os danos mais próximos aos do fotoenvelhecimento. O intervalo de análises passou para D0, D7 e D14, com o propósito de diminuir a manipulação ao longo do experimento e, conseqüentemente, evitar uma contaminação, além de que a redução da potência no experimento anterior já havia demonstrado uma redução das alterações da pele de uma análise para outra, não havendo tanta necessidade de repetir o mesmo intervalo.

De acordo com os resultados obtidos neste experimento, ficou definida a utilização do mesmo como experimento padrão deste trabalho, investigando os danos mais profundamente por meio das análises completas. A montagem do experimento

foi de aproximadamente 8h, com um total de 108 fragmentos seccionados. As avaliações foram realizadas em triplicata por doador, nos dias 0, 7 e 14 de cada experimento, utilizando três diferentes doadores.

### 3.3.6 Conversão de unidades

Como citado anteriormente, a utilização do simulador solar se dá por meio da escolha de uma determinada potência e tempo de exposição, sem oferecer a dose em si necessariamente.

Nesse contexto, foi realizada a conversão das unidades disponíveis para se obter a dose em Joules (J) de cada grupo experimental (Tabela 1).

Utilizou-se o cálculo de conversão:

$$J = W (m^2/nm) \times t (s)$$

Tabela 1 – Dose dos grupos experimentais

Experimento	Potência	Exposição	Dose
I	0,60 W/m <sup>2</sup> /nm	10 minutos	360 J
		20 minutos	720 J
		40 minutos	1440 J
		60 minutos	2160 J
II	0,50 W/m <sup>2</sup> /nm	10 minutos	300 J
III	0,35 W/m <sup>2</sup> /nm	2 minutos	42 J
		5 minutos	105 J
IV	0,35 W/m <sup>2</sup> /nm	5 minutos	105 J
		8 minutos	168 J
		10 minutos	210 J

Fonte: elaborada pela autora.

### 3.3.7 Definição dos grupos

O modelo hOSEC foi dividido em 4 grupos experimentais:

- Controle não irradiado (CNI): modelo hOSEC não foi submetido à radiação;

- Irradiado por 5 minutos (IR 5'): modelo hOSEC foi submetido à radiação por um tempo de exposição de 5 minutos, o equivalente a uma dose de 105 J;
- Irradiado por 8 minutos (IR 8'): modelo hOSEC foi submetido à radiação por um tempo de exposição de 8 minutos, o equivalente a uma dose de 168 J;
- Irradiado por 10 minutos (IR 10'): modelo hOSEC foi submetido à radiação por um tempo de exposição de 10 minutos, o equivalente a uma dose de 210 J.

Os grupos foram irradiados três vezes por semana, ao longo de quatorze dias de experimento, sendo retirado uma triplicata por grupo para cada análise ao final da irradiação no D0, D7 e D14.

### **3.4 Parâmetros para avaliar a aplicação do modelo hOSEC**

#### **3.4.1 Estudo da viabilidade**

##### **3.4.1.1 Método TTC**

A viabilidade do tecido foi avaliada pelo método TTC, que consiste na conversão do cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio (TTC) para 1,3,5-trifenilformazan (TPF), acionado pelas desidrogenases mitocondriais. O corante utilizado demonstra o estado do metabolismo celular, sendo capaz de distinguir partes metabolicamente ativas e inativas de tecidos.

Os explantes em triplicata por grupo, foram transferidos para uma placa de cultura de vinte e quatro poços, com a epiderme voltada para baixo. Preparou-se uma solução de TTC a 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) com DMEM sem vermelho de fenol (GIBCO - Invitrogen Corporation, Nova York, Estados Unidos), adicionando 1 mL em cada poço. A placa foi incubada por 2h30 em incubadora à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, com o auxílio de uma pinça, os explantes foram lavados em solução salina e secos em papel filtro antes de serem transferidos para novos poços da placa. Uma solução extratora foi preparada com dimetilsulfóxido (DMSO)/etanol (1:1) (Synth, Diadema, Brasil) e, sendo adicionado 1,5 mL em cada poço. A placa foi mantida em agitador Kline (Nova Técnica, Piracicaba, Brasil), em temperatura ambiente, protegida de luz, *overnight*. No dia seguinte, foi retirado 200 µL de cada poço e transferido para uma microplaca de 96 poços. A leitura da absorbância

foi realizada no comprimento de onda de 485 nm, de acordo com De Lavor *et al.* (2015).

O resultado foi expresso em porcentagem de citotoxicidade, determinado por meio da relação entre a densidade ótica (DO) das diferentes concentrações de amostras pela DO do controle referente ao mesmo dia de análise, multiplicado por 100 (LEITE *et al.*, 2021).

$$\% \text{ Citotoxicidade} = DO \text{ da amostra} \times 100 / DO \text{ controle}$$

### 3.4.2 Estudo histológico

Para a análise da estrutura do modelo, foram retiradas amostras em triplicata, fixadas em solução formalina a 10% tamponada (tampão fosfato a 0,1 mol/L com pH 7,4) por 24 horas e transferidas para álcool 70% até a inclusão em parafina.

O preparo das amostras contou com uma bateria de desidratação em álcool 80%, 90% e 95%, álcool absoluto I, II e III, 1 hora em cada, solução álcool-xilol (1:1) *overnight*, xilol I, II e III por 1 hora cada, e parafina a 60°C por 2 horas. Após essa etapa, os fragmentos foram cortados ao meio e incluídos em cassetes próprios com parafina, de maneira que a derme e a epiderme ficassem voltadas para a face de microsecção do bloco.

As lâminas foram preparadas utilizando um micrôtomato rotativo (Leica, Wetzlar, Alemanha), com cortes histológicos de 4 µm de espessura, em lâminas comuns de histologia para a coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) e Picrosirius, e em lâminas silanizadas para as marcações de imuno-histoquímica. Quando finalizadas, as mesmas foram transferidas para estufa a 60°C por 2 horas a fim de retirar o excesso de parafina.

#### 3.4.2.1 Coloração HE

As lâminas passaram por bateria de desparafinização em xilol I, II e III (Synth, Diadema, Brasil), e solução álcool-xilol (1:1), por 2 minutos em cada, e por bateria de hidratação em uma sequência de álcoois: absoluto I e II, álcool 95%, 70% e 50% (Synth, Diadema, Brasil), por 2 minutos em cada, água corrente por 5 minutos, dois

enxagues em água destilada, até serem coradas em hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha) por aproximadamente 5 minutos. Em seguida, foram lavadas em água corrente por 5 minutos, um enxague em água destilada, mergulhadas rapidamente em álcool 80%, e em eosina (Vetec Química Fina, Duque de Caxias, Brasil) por aproximadamente 1 minuto. Para a montagem, a lâmina foi passada em uma sequência de álcool 70%, 95%, absoluto I e II, solução álcool-xilol (1:1), xilol I e II, até que a lamínula foi fixada com meio de montagem *Entellan* (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Para a visualização das imagens, foi utilizado o microscópio óptico Leica DM4000 B<sup>®</sup> equipado com uma câmera Leica DFC280<sup>®</sup> (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) utilizando o software Leica Application Suite (LAS) versão 3.2.0 para captura das imagens histológicas.

#### **3.4.2.2 Coloração Picrosirius**

Foi utilizado o corante Sirius-Red (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) a 0,1% em solução aquosa de ácido pícrico (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos), diluído com o auxílio de agitador magnético (Fisatom, Perdizes, Brasil) e filtrado em papel filtro. Após o preparo do corante, as lâminas foram mergulhadas na solução por 20 minutos, lavadas em água corrente por 2 minutos, transferidas para um mergulho rápido em água destilada antes de serem coradas por 1 minuto em Hematoxilina de Harris e lavadas por 3 minutos em água corrente. Em seguida, as lâminas passaram pela mesma sequência de alcoois descrita na seção 3.4.2.1 para montagem, e a lamínula foi fixada com solução de *Bouin* (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos).

As lâminas foram analisadas em microscópio de luz polarizada, modelo Axio (Zeiss, Jena, Alemanha), em parceria com o laboratório da Profa. Dra. Raquel Fernanda Gerlach, na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP).

A quantificação por análise de imagem para diferenciar o colágeno tipo I do colágeno tipo III foi realizada utilizando a ferramenta *Color Threshold* do software ImageJ<sup>®</sup>, no qual foi obtido o percentual de colágeno por meio da análise das partículas automatizadas de acordo com seleção e medida das áreas com base na cor. Os valores para cada tipo de colágeno foram padronizados no Color Space RGB para todas as imagens da seguinte maneira: red 144-255, green 0-166 e blue 0-255

para vermelho (colágeno tipo I) e red 0-145, green 89-255 e blue 0-186 para verde (colágeno tipo III), baseado em Bedoya *et al.* (2016), com modificações. Foram quantificadas 5 imagens de cada lâmina, no aumento de 200x, e em seguida os dados foram analisados estatisticamente.

### 3.4.3 Estudo imuno-histoquímico

Na análise imuno-histoquímica, secções de 4 µm das amostras foram incubadas com os anticorpos primários Ki-67, 4-HNE e NFκB, sendo que para a marcação foi utilizado o kit Novolink® Polymer Detection Systems (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha) e para revelação o kit NovaRED® Substrate, Peroxidase (HRP) (Vector, São Francisco, Estados Unidos).

Foi utilizado o mesmo protocolo para todos os anticorpos, no qual as lâminas passaram por tratamento de desparafinização em xilol I e xilol II por 10 minutos em cada e recuperação antigênica em tampão citrato (pH 6,0) no *Steamer* por 40 minutos. Os cortes histológicos foram isolados com caneta hidrofóbica antes de serem lavados duas vezes com *Tris Buffered Saline with Tween* (TBST). Após o tratamento inicial, houve o bloqueio da peroxidase endógena por 5 minutos, permanecendo em local fechado e escuro. As lâminas foram aspiradas e lavadas duas vezes com TBST, sendo que este processo foi repetido após cada etapa de incubação. Houve o bloqueio da proteína por 5 minutos, incubação com o anticorpo primário por 1 hora, no anticorpo secundário por 30 minutos e no polímero por 30 minutos. Utilizou-se o revelador NovaRED por aproximadamente 5 minutos, sendo que o mesmo foi previamente preparado com 1000 µL de água destilada, 24 µL do reagente 1 e 16 µL dos reagentes 2, 3 e 4. As lâminas foram enxaguadas em água e coradas em hematoxilina por aproximadamente 1 minuto, enxaguadas em água corrente antes de azular o núcleo em solução com amoníaco por 30 segundos, em três banhos rápidos. A montagem foi realizada após passar por uma bateria de desidratação em álcool 90% I e II, absoluto I e II, e xilol I e II.

As lâminas foram examinadas em microscópio de luz, as imagens capturadas a uma ampliação de 200x e analisadas usando o *plugin Cell Conter* do *software ImageJ*®.

#### 3.4.3.1 Marcação de Ki-67

Foram realizadas diferentes diluições do anticorpo Ki-67 (Thermo Fisher, Waltham, Estados Unidos) até confirmar que a diluição de 1:200 seria a melhor escolha.

#### 3.4.3.2 Marcação de 4-HNE

Para a marcação do anticorpo 4-HNE (Abcam, Cambridge, Reino Unido), a diluição ideal foi a de 1:400.

#### 3.4.3.3 Marcação de NFκB

Ficou definida a diluição de 1:100 para a marcação do anticorpo NFκB (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Estados Unidos).

#### 3.4.4 Estudo bioquímico

O estudo bioquímico foi realizado para avaliar os mecanismos de defesas antioxidantes e o estresse celular no modelo, já que o estado de estresse oxidativo é induzido pelo desequilíbrio entre a produção de EROs e a insuficiência de moléculas antioxidantes, característico do fotoenvelhecimento (CANNAVÒ *et al.*, 2019).

Os fragmentos foram retirados das placas, transferidos para microtubos de 2 mL – sem a adição de nenhuma solução, e acondicionados no freezer -80°C até o dia da análise. Posteriormente, os mesmos foram pesados, confirmando peso de 200 mg, no mínimo. Após identificar cada fragmento com seus respectivos pesos em uma planilha, os mesmos foram macerados em 2 mL de tampão fosfato de sódio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 0,1 mol/L e pH 7, no homogeneizador de tecidos (Omni, Geórgia, Estados Unidos) por 2 minutos. Em seguida, centrifugou-se o macerado a 3500 rpm por 10 minutos e transferiu-se 100 µL do sobrenadante para microtubos de 1,5 mL (para os ensaios de DPPH, GSH, FOX e MDA) e 10 µL para um microtubo de 2 mL (para o ensaio de Proteínas Totais).

#### 3.4.4.1 Ensaio de DPPH

Foi preparada uma solução de 2,4 mg de DPPH em 100 mL de metanol, adicionando 400 µL da mesma no microtubo com 100 µL de sobrenadante do macerado. O microtubo ficou em repouso por 30 minutos, agitado em vortex (Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil) a cada 15 minutos, e centrifugado a 4000 rpm por 5 minutos. Transferiu-se 200 µL para a placa de 96 poços que já estava com a curva padrão preparada com trolox (1000 µg/mL), com ponto zero (100 µL H<sub>2</sub>O + 400 µL). A leitura foi realizada no espectrofotômetro a 515 nm.

#### 3.4.4.2 Ensaio de GSH

De acordo com Sedlak e Lindsay (1968), para o ensaio de glutathiona reduzida (GSH) foi adicionado 250 µL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,02 mol/L, 200 µL de água Milli-Q e 50 µL de ácido tricloroacético 50% (TCA) no microtubo com o sobrenadante do tecido, sendo que a diluição do ácido deve ocorrer somente na hora em que o mesmo será utilizado. Aguardou-se por 15 minutos, agitando na metade do tempo, e centrifugou a 4000 rpm, por 10 minutos a 4°C. Em seguida foi transferido 250 µL do sobrenadante para um outro microtubo com 250 µL de TRIS-HCl, 0,4 M e pH 8,9, e 25 µL de 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzóico ácido (DTNB), aguardando por 5 minutos antes de transferir 200 µL para uma placa de 96 poços. A leitura de absorbância foi realizada a 412 nm no espectrofotômetro e comparado a uma curva padrão de GSH a 10 mmol/L.

#### 3.4.4.3 Ensaio de FOX

De acordo com Banerjee *et al.* (2003), foi preparada uma solução com 7,6 mg de xilenol laranja e 88 mg de butil-hidroxitolueno (BHT) em 90 mL de metanol e uma outra com 9,8 mg de sulfato ferroso em 10 mL de ácido sulfúrico 250 mmol/L (0,13 mL de ácido sulfúrico em 10 mL de água), até que as duas soluções foram misturadas, respectivamente, em uma concentração 9:1. Adicionou-se 1 mL da mistura ao microtubo com o sobrenadante e o mesmo permaneceu em repouso por 30 minutos ao abrigo da luz e em temperatura ambiente, agitado em vórtex a cada 15 minutos, e

centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos. Decorrido este tempo, foi transferido 200 µL para uma placa de 96 poços e a leitura de absorbância foi realizada a 560 nm. A concentração de FOX foi calculada comparando a uma curva padrão preparada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em concentrações de 10 a 200 µmol/L.

#### **3.4.4.4 Ensaio de MDA**

A peroxidação lipídica foi quantificada pela medida do nível de MDA no tecido, de acordo com o método proposto por Gérard-Monnier *et al.* (1998), com adaptações. Foi adicionado 300 µL de solução de 10 mmol/L de 1-metil-fenilindol em acetonitrila e metanol (2:1, v/v) e 75 µL de HCl puro (37%) ao microtubo com o sobrenadante do tecido. Em seguida, agitou-se os tubos em vortex e os mesmos foram incubados em banho-maria a 45°C por 40 minutos, resfriados em gelo e centrifugados a 4000 rpm por 5 minutos. Do sobrenadante foi transferido 200 µL para uma placa de 96 poços e realizada a leitura de absorbância a 586 nm. A concentração de MDA foi calculada comparando-a a uma curva de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) hidrolisado.

#### **3.4.4.5 Ensaio de Proteínas Totais**

Foi utilizado o kit de Proteínas Totais (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil) para a determinação colorimétrica das proteínas totais em amostras líquidas por reação de ponto final, onde os íons cobre em meio alcalino (reagente de biureto) reagem com as ligações peptídicas das proteínas séricas, produzindo uma cor púrpura proporcional à concentração das proteínas na amostra, com leitura em absorbância máxima de 545 nm.

### **3.5 Limitações do estudo**

Embora o projeto inicial trazia a proposta de utilizar a pele de no mínimo três doadores e em triplicata por doador – o qual foi utilizado, acreditamos que o aumento desse número seria de grande valia em razão da variabilidade dentre os indivíduos doadores. Contudo, devido ao tempo empregado nos experimentos preliminares para

definir as doses que seriam utilizadas no estudo, não foi possível aumentar o número de amostras de pele.

Além disso, diante do importante papel das fibras elásticas no fotoenvelhecimento, o trabalho tinha por objetivo analisar a alteração das mesmas no modelo hOSEC. Porém, foi utilizado um kit de coloração Verhoeff que proporcionou resultados diferentes tanto da imagem oferecida pelo próprio kit quanto das imagens pesquisadas em artigos da área. A partir desta divergência, entramos em contato com o fornecedor e o mesmo respondeu que o kit passaria por alguns ajustes na empresa, impossibilitando a continuidade desta avaliação.

### **3.6 Análise dos resultados**

Os dados foram expressos com o valor médio  $\pm$  erro padrão das médias (EPM). Para todos os métodos foi aplicado o teste estatístico de análise de variância para múltiplas comparações de amostras One-Way ANOVA, seguido pelo teste de comparações de Tukey. Os valores de  $p < 0,05$  mostram evidências estatísticas de que há diferença entre os dados em questão sob intervalo de confiança de 95%.

Foi utilizado o software GraphPad Prism® (versão 8.0) para confecção dos gráficos e realização dos testes estatísticos.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação da viabilidade

#### 4.1.1 Método TTC

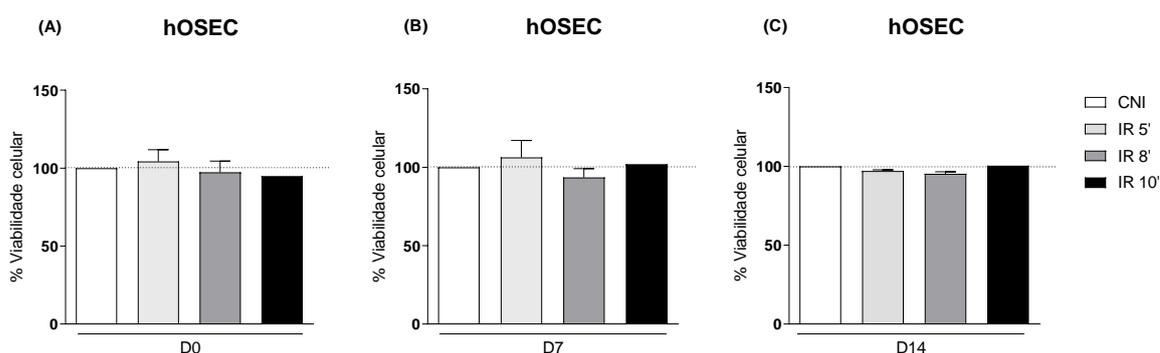
Logo após a montagem do experimento e exposição do modelo hOSEC à primeira irradiação, representando o dia zero (D0), os grupos IR 5', IR 8' e IR 10' apresentaram percentuais de viabilidade de 104,4%, 97,3% e 94,9%, respectivamente, em comparação com o grupo CNI (100%) (Figura 7).

No 7º dia (D7), após quatro aplicações de radiação, os grupos IR 5', IR 8' e IR 10' apresentaram percentuais de 106,3%, 93,5% e 102%, respectivamente, quando comparados com o grupo CNI do mesmo dia (Figura 7).

No 14º dia (D14), completando as sete aplicações de radiação, os grupos IR 5', IR 8' e IR 10' apresentaram percentuais de 97,1%, 95,6% e 100,5%, respectivamente, quando comparados com o grupo CNI do mesmo dia (Figura 7).

Tais resultados demonstraram que os mesmos se mantiveram viáveis durante todo o período de experimento, não havendo diferença estatística.

Figura 7 – Percentual de viabilidade dos grupos irradiados em relação ao grupo CNI pelo método TTC



Percentual de viabilidade dos grupos IR 5', IR 8' e IR 10' em relação ao grupo CNI (correspondente a 100% de células viáveis), pelo método TTC e análise nos tempos: (A) D0, (B) D7 e (C) D14. Os valores representam médias  $\pm$  EPM (n=3). Teste estatístico ANOVA, pós-teste Tukey: \*Diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos estudados.

### 4.2 Avaliação histológica

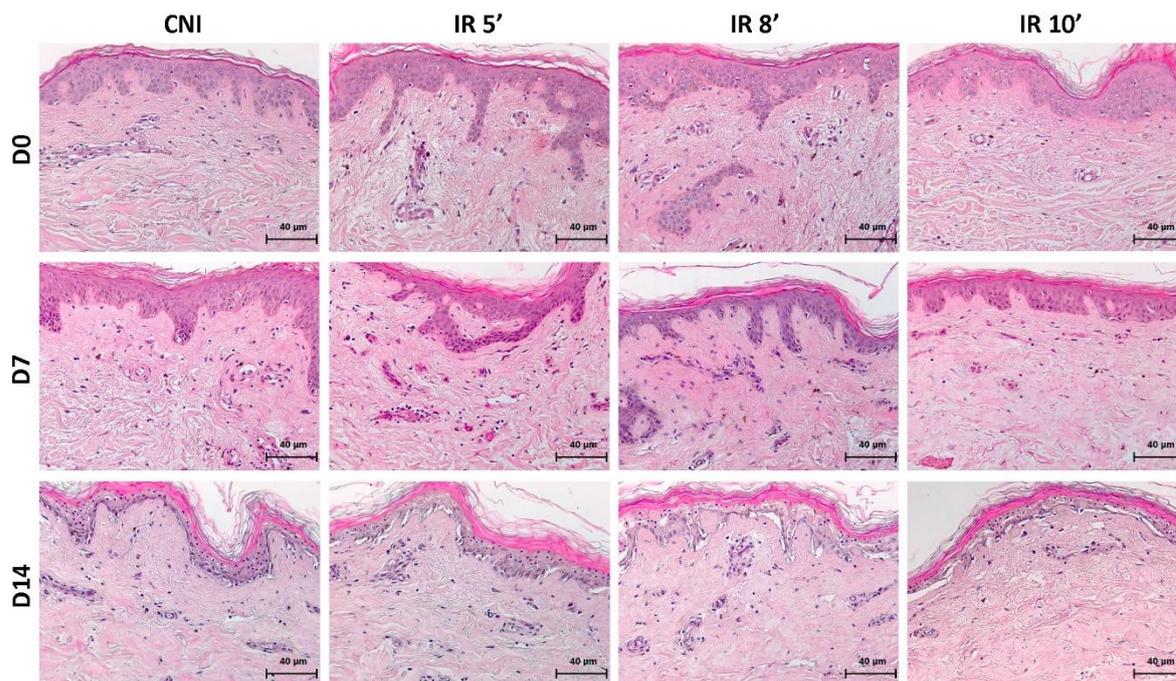
#### 4.2.1 Coloração HE

Observou-se que no D0, todos os grupos apresentaram estruturas similares, uma vez que a junção dermoepidérmica foi preservada, assim como as papilas dérmicas. Também apresentaram quantidade normal de camadas de queratinócitos na epiderme e organização das fibras colágenas na derme (Figuras 8 e 9).

No D7, observou-se que a junção dermoepidérmica continuou preservada em todos os grupos, porém, os grupos irradiados já começavam a apresentar alguns queratinócitos com núcleos picnóticos. Os grupos IR 8' e IR 10' demonstraram uma diminuição da espessura da epiderme, apresentando menos camadas de queratinócitos, quando comparados ao D0 (Figuras 8 e 9).

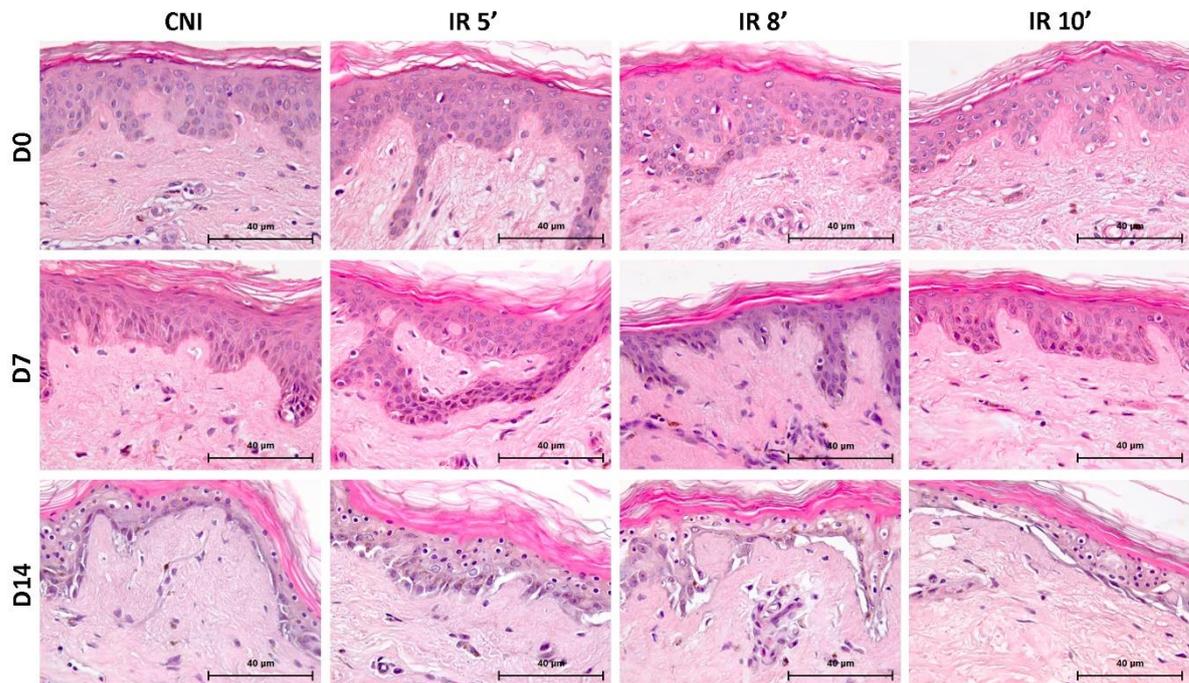
Já no D14, observou-se que houve apoptose de queratinócitos em todos os grupos, sendo o esperado do próprio modelo na proporção apresentada nos grupos CNI e IR 5', enquanto nos grupos IR 8' e IR 10' foi mais acentuada. Houve também separação da junção dermoepidérmica em alguns pontos assim como uma predisposição a desorganização do colágeno nos grupos irradiados, evoluindo de acordo com o aumento do tempo de exposição (Figuras 8 e 9).

Figura 8 – Fotomicrografia dos grupos experimentais pela coloração HE (200x)



Análise da estrutura tecidual do modelo hOSEC, nos grupos experimentais CNI, IR 5', IR 8' e IR 10', no D0, D7 e D14, pela coloração HE, em aumento de 200x.

Figura 9 – Fotomicrografia dos grupos experimentais pela coloração HE (400x)

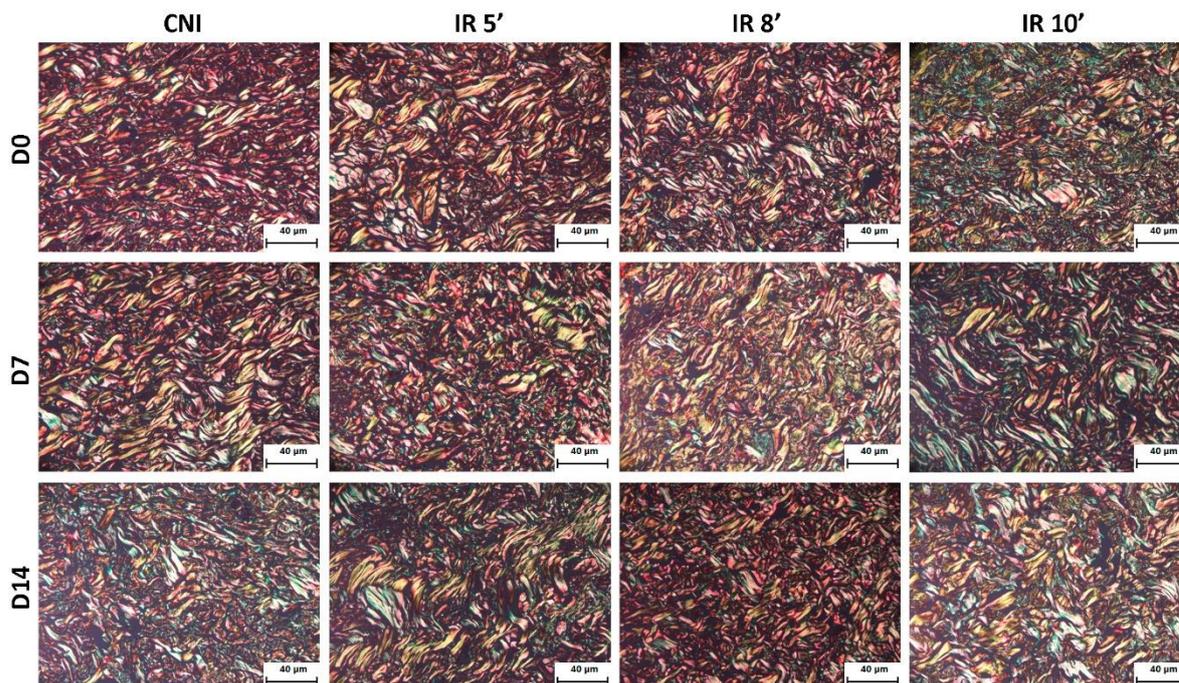


Análise da estrutura tecidual do modelo hOSEC, nos grupos experimentais CNI, IR 5', IR 8' e IR 10', no D0, D7 e D14, pela coloração HE, em aumento de 400x.

#### 4.2.2 Coloração Picrosirius

Em geral, qualitativamente, os grupos demonstraram maior quantidade de colágeno tipo I (colágeno mais forte e resistente, representado pela cor vermelha), já o colágeno tipo III (colágeno mais frouxo, representado pela cor verde) se mostrou mais presente no grupo IR 10' (Figura 10).

Figura 10 – Fotomicrografia dos grupos experimentais pela coloração Picosirius



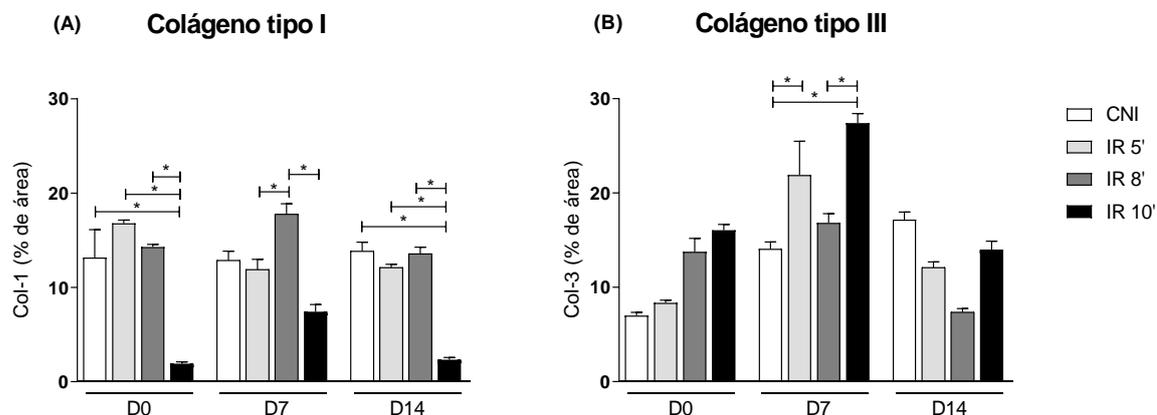
Análise qualitativa de colágeno tipo I e tipo III do modelo hOSEC, nos grupos experimentais CNI, IR 5', IR 8' e IR 10', no D0, D7 e D14, pela coloração Picosirius, em aumento de 200x.

Quantitativamente, identificou-se que no D0, o grupo IR 10' teve sua quantidade de colágeno tipo I afetada, diferentemente do que ocorreu nos demais grupos. Também houve uma maior quantidade de colágeno tipo III no mesmo grupo, corroborando com o dado anterior (Figura 11).

No D7, observou-se que a quantidade de colágeno tipo I estava menor no grupo IR 10', da mesma forma que o colágeno tipo III apresentou uma quantidade exacerbada no mesmo grupo, repetindo assim o mesmo perfil apresentado no D0 (Figura 11).

No D14, o grupo IR 10' apresentou novamente uma menor quantidade de colágeno tipo I, enquanto no colágeno tipo III não houve diferença estatística entre os grupos. Assim, de uma forma geral, o grupo IR 10' manteve o mesmo perfil ao longo do experimento, com níveis mais baixos de colágeno tipo I e níveis mais altos de colágeno tipo III (Figura 11).

Figura 11 – Percentual de área de colágeno dos grupos experimentais



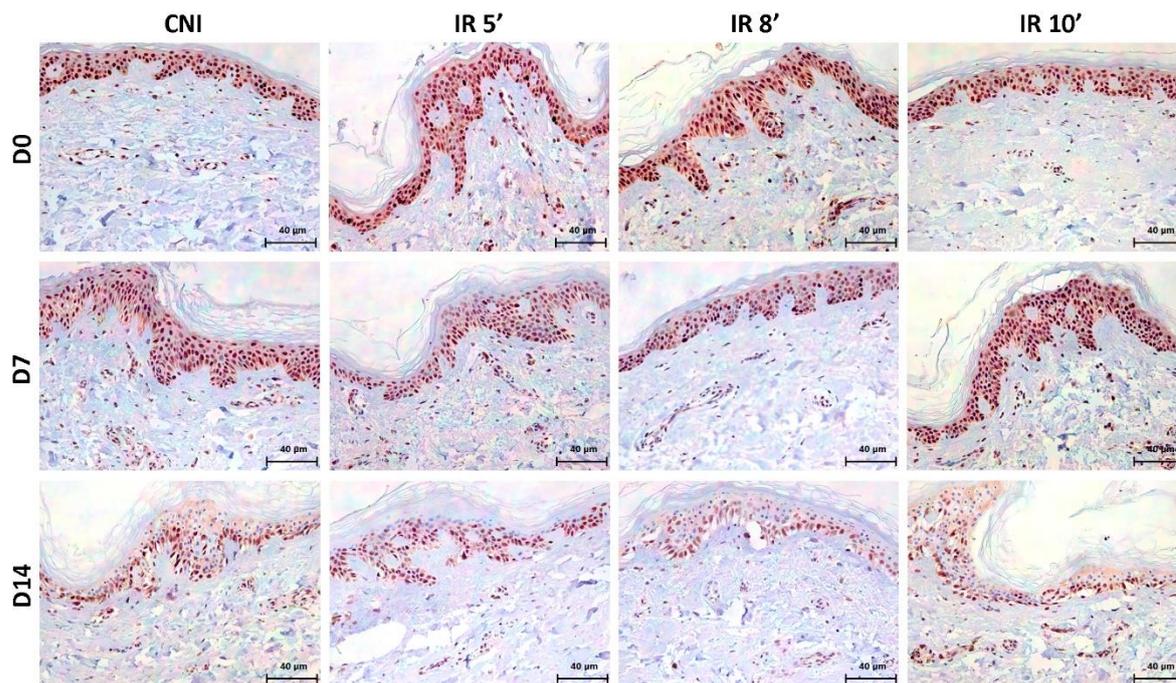
Análise quantitativa de colágeno (A) tipo I e (B) tipo III do modelo hOSEC, nos grupos experimentais CNI, IR 5', IR 8' e IR 10', no D0, D7 e D14, pela coloração Picrosirius. Os valores representam médias  $\pm$  EPM (n=3). Teste estatístico ANOVA, pós-teste Tukey: \*Diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos estudados.

### 4.3 Avaliação imuno-histoquímica

#### 4.3.1 Marcação de Ki-67

Qualitativamente, observou-se uma marcação mais intensa em todos os grupos no D0, com diminuição da mesma ao longo dos dias. Contudo, a marcação ainda estava presente na camada basal ao longo dos dias, mostrando que o tecido estava perfeitamente viável e com a capacidade proliferativa preservada em todos os grupos experimentais (Figura 12).

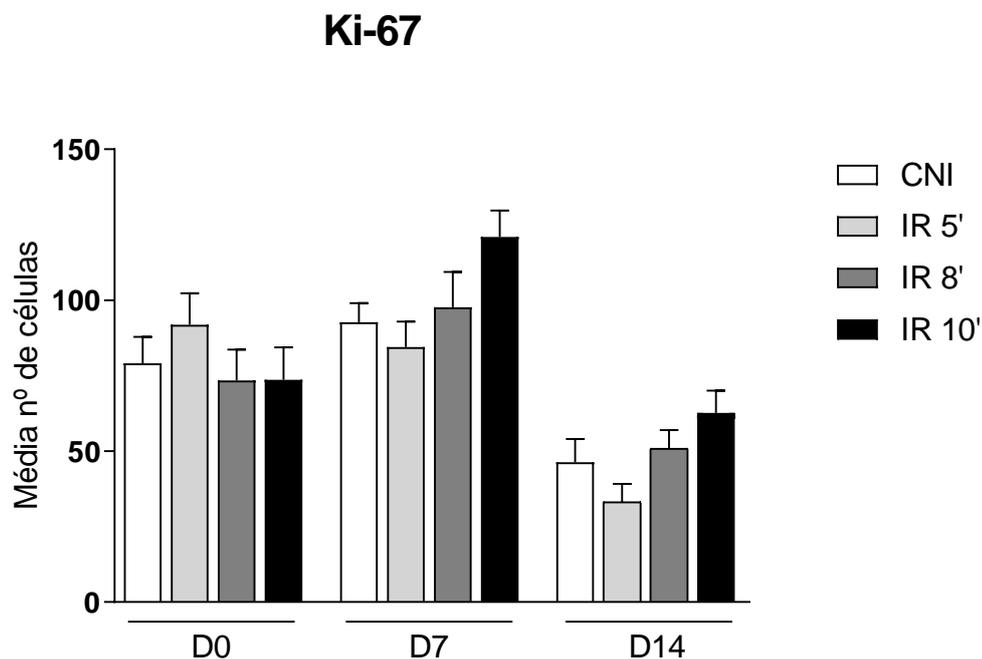
Figura 12 – Fotomicrografia dos grupos experimentais pela marcação de Ki-67



Análise qualitativa da capacidade proliferativa do modelo hOSEC, nos grupos experimentais CNI, IR 5', IR 8' e IR 10', no D0, D7 e D14, pela marcação de Ki-67, em aumento de 200x.

De acordo com a quantificação do Ki-67, não houve diferença estatística entre os grupos, porém, foi possível observar uma predisposição de aumento da proliferação do modelo hOSEC no D7 e redução no D14, em todos os grupos quando comparados ao D0 (Figura 13).

Figura 13 – Quantificação de células positivas de Ki-67 nos grupos experimentais

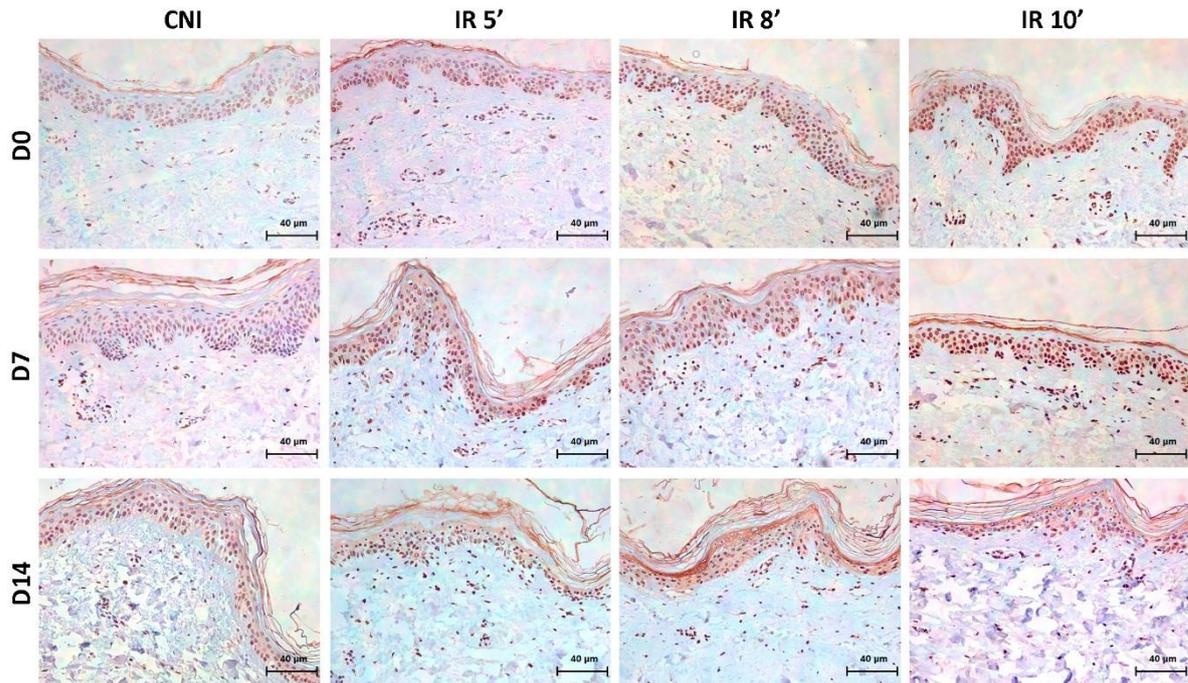


Média do número de células proliferativas do modelo hOSEC, nos grupos experimentais CNI, IR 5', IR 8' e IR 10', no D0, D7 e D14, pela marcação do anticorpo Ki-67. Os valores representam médias  $\pm$  EPM ( $n=3$ ). Teste estatístico ANOVA, pós-teste Tukey: \*Diferença estatística significativa ( $p<0,05$ ) entre os grupos estudados.

#### 4.3.2 Marcação de 4-HNE

Qualitativamente, notou-se que no D0 e no D7, a marcação foi se intensificando de acordo com o aumento de exposição, sendo mais visível no grupo IR 10'. Pode-se observar que o grupo CNI apresentou menor marcação que os grupos irradiados em todos os dias de análise, porém, a marcação se mostrou similar entre os grupos no D14 (Figura 14).

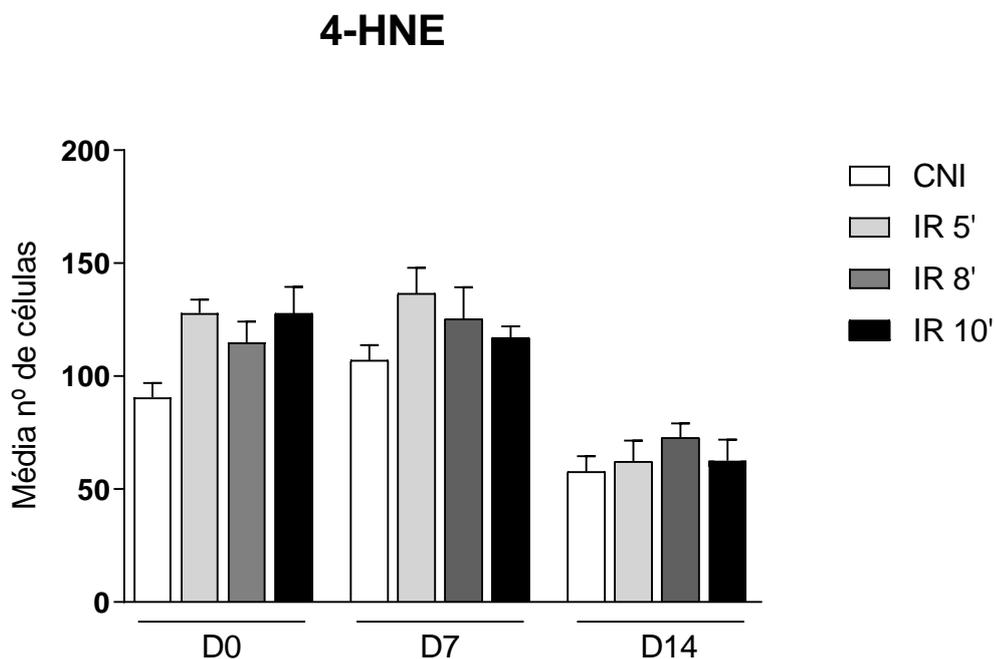
Figura 14 – Fotomicrografia dos grupos experimentais pela marcação de 4-HNE



Análise qualitativa do estresse oxidativo do modelo hOSEC, nos grupos experimentais CNI, IR 5', IR 8' e IR 10', no D0, D7 e D14, pela marcação de 4-HNE, em aumento de 200x.

Apesar de não apresentar diferença estatística, os resultados demonstraram que houve uma predisposição do aumento dos níveis de 4-HNE no D7 em relação ao D0, de modo geral. Já no D14, houve uma diminuição dos níveis de 4-HNE em todos os grupos comparando aos demais dias (Figura 15).

Figura 15 – Quantificação de 4-HNE nos grupos experimentais

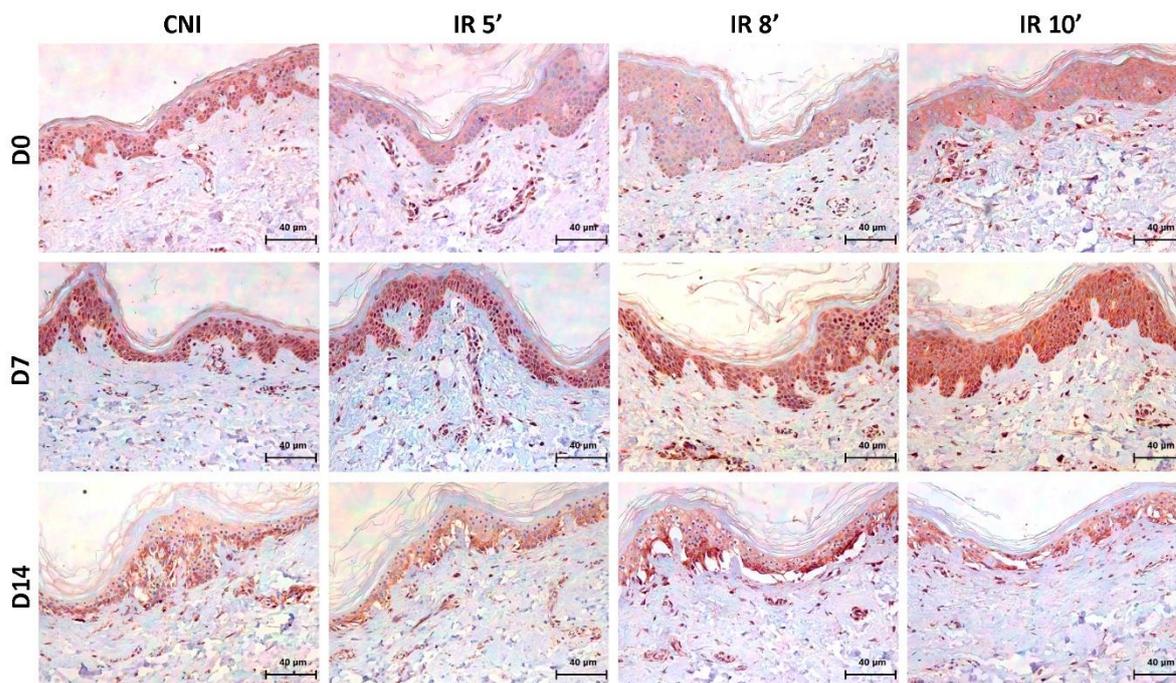


Média do número de células sob estresse oxidativo do modelo hOSEC, nos grupos experimentais CNI, IR 5', IR 8' e IR 10', no D0, D7 e D14, pela marcação do anticorpo 4-HNE. Os valores representam médias  $\pm$  EPM (n=3). Teste estatístico ANOVA, pós-teste Tukey: \*Diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos estudados.

#### 4.3.3 Marcação de NFkB

Qualitativamente, os grupos apresentaram marcações similares, com uma marcação mais intensa no D7 quando comparado ao demais dias. Quase não houve marcação no dia quatorze, devido à redução da camada de queratinócitos (Figura 16).

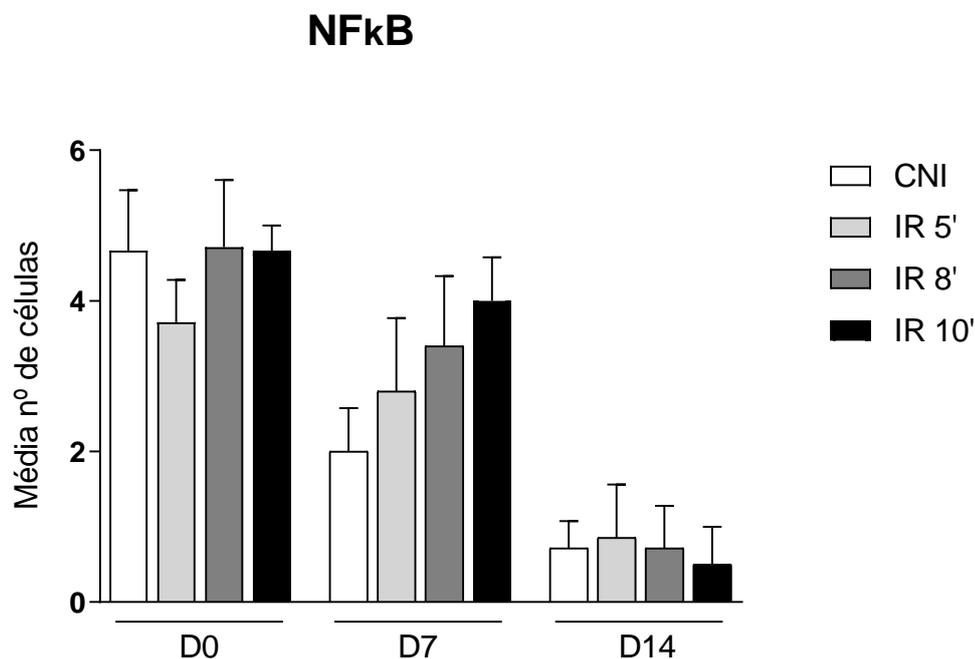
Figura 16 – Fotomicrografia dos grupos experimentais pela marcação de NFκB



Análise qualitativa da resposta inflamatória do modelo hOSEC, nos grupos experimentais CNI, IR 5', IR 8' e IR 10', no D0, D7 e D14, pela marcação de NFκB, em aumento de 200x.

Na análise quantitativa não houve diferença estatística entre os grupos, porém, houve uma predisposição de redução dos níveis de NFκB ao longo do experimento. No D7, observou-se um aumento gradativo entre os grupos, a partir do CNI, enquanto no D14 houve uma diminuição em todos os grupos (Figura 17).

Figura 17 – Quantificação de NFκB nos grupos experimentais



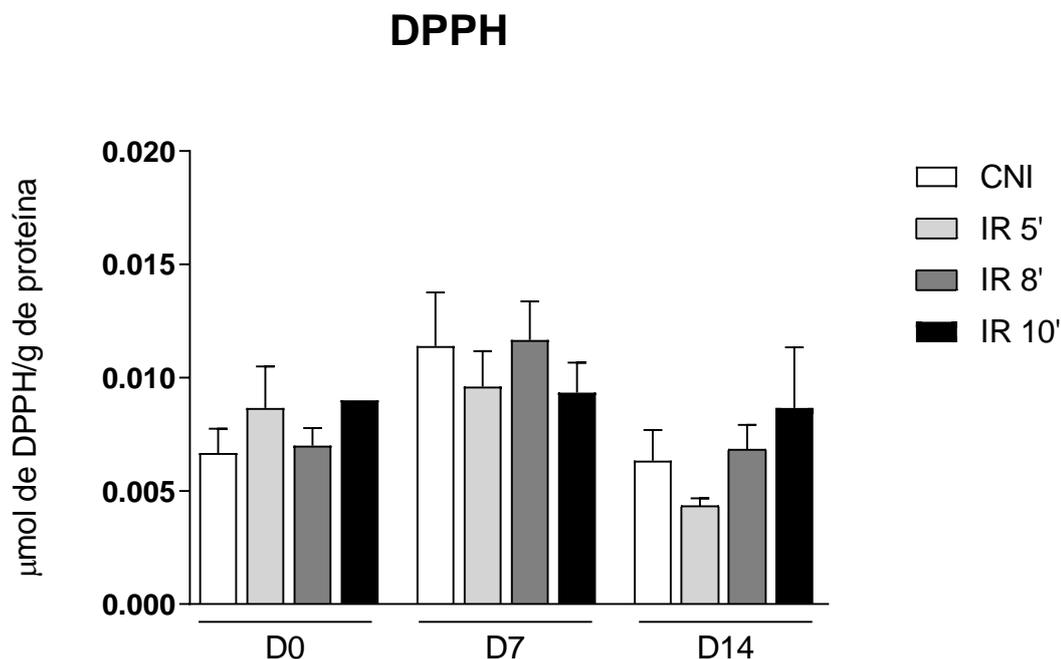
Média do número de células sob atividade inflamatória do modelo hOSEC, nos grupos experimentais CNI, IR 5', IR 8' e IR 10', no D0, D7 e D14, pela marcação do anticorpo NFκB. Os valores representam médias ± EPM (n=3). Teste estatístico ANOVA, pós-teste Tukey: \*Diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos estudados.

#### 4.4 Avaliação bioquímica

##### 4.4.1 Ensaio de DPPH

Os resultados obtidos mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos, talvez pela baixa concentração de DPPH no modelo hOSEC. Contudo, houve um aumento da concentração no D7, quando comparado ao D0, seguindo para uma diminuição em todos os grupos no D14, similar ao D0 (Figura 18).

Figura 18 – Quantificação de DPPH nos grupos experimentais

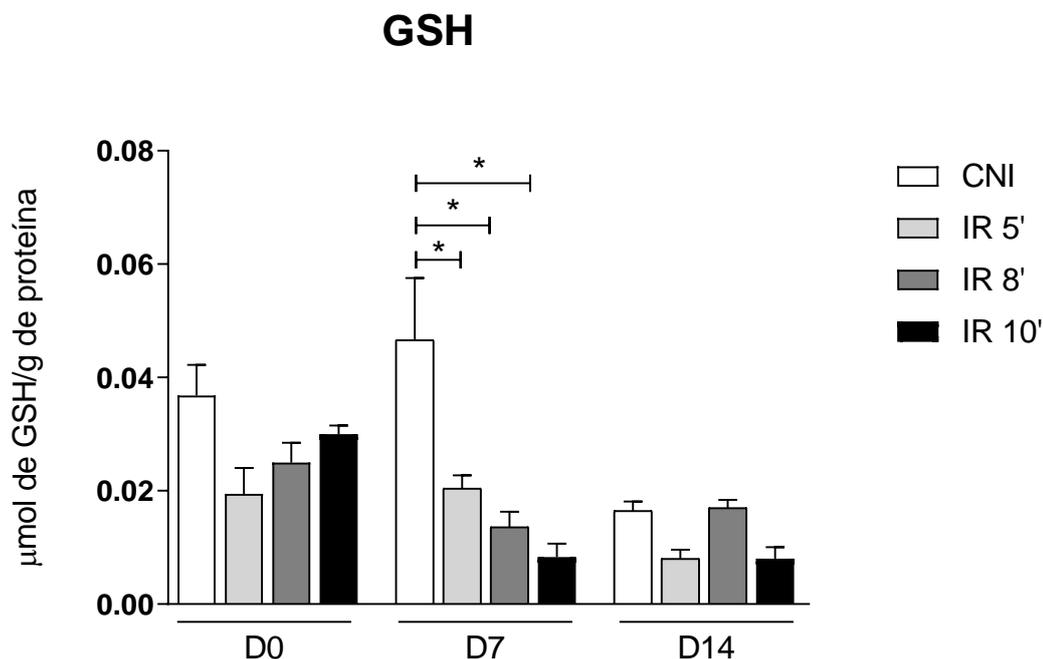


Quantificação dos níveis de concentração de DPPH do modelo hOSEC, nos grupos experimentais CNI, IR 5', IR 8' e IR 10', no D0, D7 e D14. Os valores representam médias  $\pm$  EPM (n=3). Teste estatístico ANOVA, pós-teste Tukey. \*Corresponde à diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos estudados.

#### 4.4.2 Ensaio de GSH

A quantificação de GSH demonstrou que houve diferença estatística do grupo CNI com todos os outros grupos no D7, além de que a quantidade da molécula diminuiu gradativamente nos demais grupos conforme o aumento do tempo de exposição, seguindo para uma diminuição da concentração de GSH em todos os grupos no D14, fato semelhante ao mencionado anteriormente no ensaio de DPPH assim como a baixa concentração da molécula encontrada no modelo (Figura 19).

Figura 19 – Quantificação de GSH nos grupos experimentais

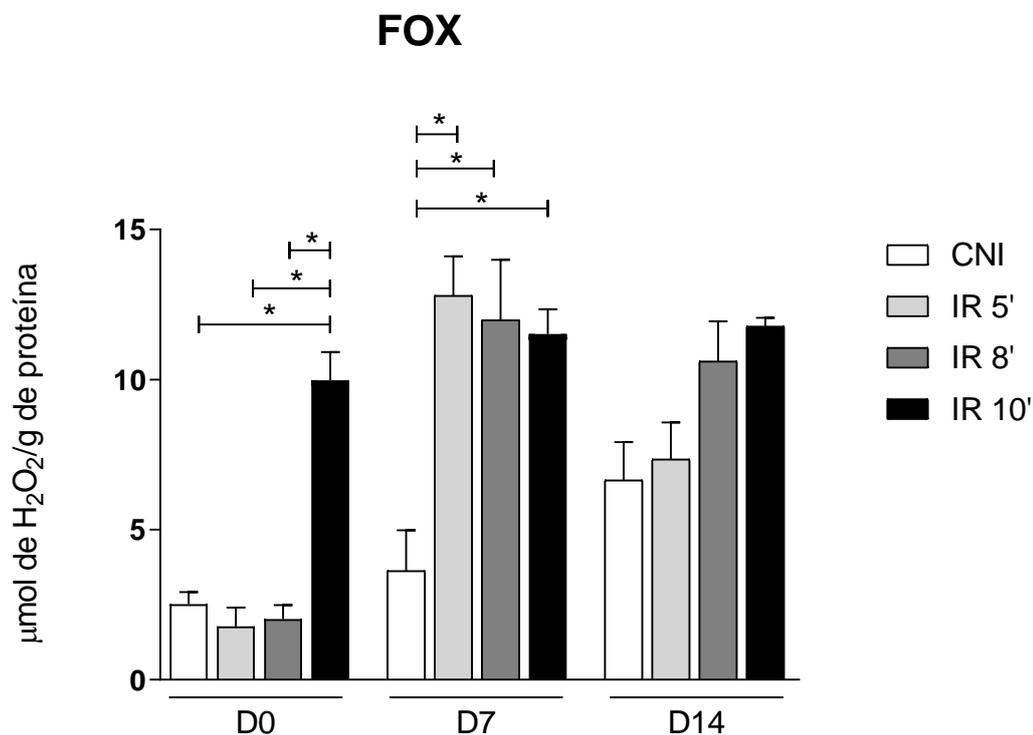


Quantificação dos níveis de concentração de GSH do modelo hOSEC, nos grupos experimentais CNI, IR 5', IR 8' e IR 10', no D0, D7 e D14. Os valores representam médias  $\pm$  EPM (n=3). Teste estatístico ANOVA, pós-teste Tukey. \*Corresponde à diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos estudados.

#### 4.4.3 Ensaio de FOX

No ensaio de FOX, houve diferença estatística do grupo IR 10' com todos os outros grupos no D0, demonstrando o efeito imediato da dose de radiação exacerbada no modelo hOSEC. No D7 houve diferença estatística do grupo CNI com todos os outros grupos. Observou-se ainda que, de forma geral, houve uma diminuição do estresse oxidativo no D14, apresentando um perfil de aumento gradativo do mesmo de acordo com o tempo de exposição dos grupos, demonstrando que pode haver um equilíbrio no estresse oxidativo de origem lipídica no modelo (Figura 20).

Figura 20 – Quantificação do estresse oxidativo pelo ensaio de FOX

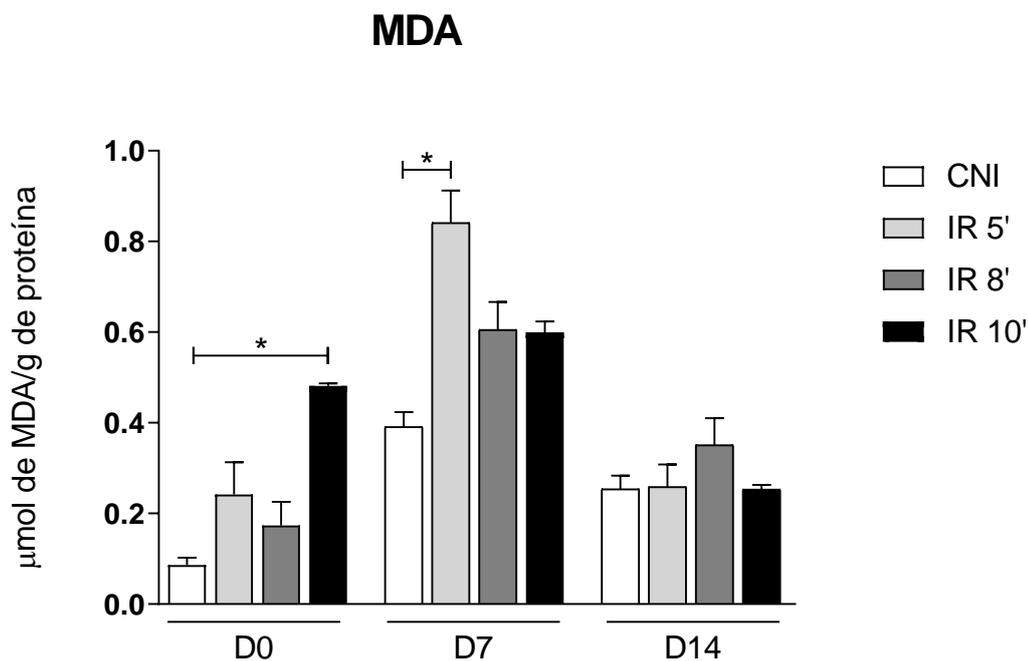


Quantificação dos níveis de hidroperóxidos lipídicos do modelo hOSEC, nos grupos experimentais CNI, IR 5', IR 8' e IR 10', no D0, D7 e D14. Os valores representam médias  $\pm$  EPM (n=3). Teste estatístico ANOVA, pós-teste Tukey. \*Corresponde à diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos estudados.

#### 4.4.4 Ensaio de MDA

Na quantificação de MDA houve diferença estatística do grupo IR 10' com o CNI no D0 e do grupo IR 5' com o CNI no D7, demonstrando a quantidade exacerbada de peroxidação lipídica nos grupos irradiados em comparação ao grupo CNI. Observou-se um perfil similar ao ensaio de FOX, assim como na quantificação de estresse oxidativo por imuno-histoquímica na marcação 4-HNE, onde os níveis de estresse aumentaram no D7 quando comparados ao D0 e em seguida diminuíram no D14, além de que o grupo CNI apresentou níveis mais baixos em relação aos grupos irradiados, demonstrando o efeito da radiação solar no estresse oxidativo (Figura 21).

Figura 21 – Quantificação do estresse oxidativo pelo ensaio de MDA



Quantificação da peroxidação lipídica do modelo hOSEC, nos grupos experimentais CNI, IR 5', IR 8' e IR 10', no D0, D7 e D14. Os valores representam médias  $\pm$  EPM (n=3). Teste estatístico ANOVA, pós-teste Tukey. \*Corresponde à diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos estudados.

## 5 DISCUSSÃO

Apesar de todos os avanços científicos, o modelo ideal para estudos de fotoenvelhecimento ainda representa um grande desafio. A pesquisa clínica em voluntários humanos é restrita por razões éticas e alguns tipos de ensaios são impossíveis de realizar, especialmente quando envolve eventos nocivos, como é o caso da radiação. O uso de animais também se tornou inviável nesta afecção, tanto pela incerteza da legitimidade dos dados gerados devido as diferenças entre o tecido animal e o humano, quanto pelas várias objeções éticas, econômicas e científicas contra o uso dos mesmos (LEITE *et al.*, 2021; NEIL; BROWN; WILLIAMS, 2020; VOSTÁLOVÁ *et al.*, 2019).

Baseado na substituição destes ensaios, a busca por métodos alternativos confiáveis e relevantes, com potencial redução de tempo e de custos, vem crescendo muito nas últimas décadas, a fim de acelerar o processo de avaliação de novos produtos. Embora já existam inúmeros modelos disponíveis, ainda se faz necessário um estudo mais aprofundado para a validação dos mesmos, devido às limitações apresentadas por cada um. Visto que, o maior desafio em um modelo alternativo é a simulação de eventos biológicos envolvidos no metabolismo sofrido por um organismo *in vivo* (LEITE *et al.*, 2021; MORETTO; STEPHANO, 2019).

A cultura de explantes de pele *ex vivo* demonstra ser uma excelente alternativa para estudos dermatológicos, uma vez que possui estrutura 3D e todos os tipos de células da pele nativa. O modelo apresenta vantagens significantes frente aos demais e já teve sua aplicação comprovada em diversos estudos de relevância, tais como a avaliação de danos e proteção induzidos por radiação, demonstrando viabilidade e vitalidade celular por um determinado período de tempo, além de se mostrar adequado para avaliar a segurança e eficácia de produtos tópicos, como protetores solares (FRADE *et al.*, 2015; VOSTÁLOVÁ *et al.*, 2019).

Em nosso estudo, aplicamos ferramentas histológicas e bioquímicas para destacar novos conhecimentos sobre o modelo de pele humana *ex vivo* quando exposto a radiação solar, com o intuito de padronizar um modelo alternativo de fotoenvelhecimento que poderá ser utilizado na avaliação de produtos tópicos voltados para esta afecção. Uma vez que, compreender os mecanismos do fotoenvelhecimento se torna primordial para o desenvolvimento de produtos para o

tratamento ou prevenção do mesmo. Além de que, o uso deste modelo proporciona uma estratégia para superar as limitações de modelos experimentais baseados em animais e culturas de células, bem como as preocupações éticas de ensaios clínicos.

O tempo de cultura ideal do modelo pode variar de acordo com o propósito do estudo. Trabalhos anteriores utilizaram e aprovaram o modelo de explantes de pele para analisar os efeitos da radiação UVB com análises em 24h (KHALIL, 2018), da radiação UVB e UVA+UVB em 48 horas (HOFMANN-WELLENHOF *et al.*, 2004), da radiação UV combinada em até 72 horas (VON KOSCHEMBAHR *et al.*, 2018), da radiação UVA em 7 dias (ANDRADE *et al.*, 2015), entre outros. Em nosso estudo padronizamos o modelo no tempo de 14 dias, sendo que, já foi relatado que a pele *ex vivo* mantida em condições favoráveis com meio nutritivo, temperatura e oxigenação, conserva os aspectos fisiológicos semelhantes aos da pele *in vivo* em até 15 dias (XU *et al.*, 2012). Além do mais, é importante lembrar que, diferente dos demais estudos, foi utilizado um simulador solar de amplo espectro, envolvendo a combinação da radiação UV, visível e infravermelha.

Devido à falta de dados na literatura utilizando a radiação de amplo espectro no mesmo modelo, foi necessário a padronização de um protocolo que atendesse o objetivo de estudo sem inviabilizar o tecido. Após as primeiras tentativas nas potências de 0,60 W/m<sup>2</sup>/nm e 0,50 W/m<sup>2</sup>/nm, em diferentes tempos de exposição, confirmando um dano exacerbado e inexecuível, nosso estudo investigou a ação da radiação total em 0,35 W/m<sup>2</sup>/nm, nos tempos de 5, 8 e 10 minutos, totalizando as doses experimentais de 105 J, 168 J e 210 J, respectivamente.

Em nosso estudo, os danos induzidos pelo fotoenvelhecimento foram analisados no D0, D7 e D14, após uma, quatro e sete irradiações, respectivamente. A viabilidade tecidual foi avaliada imediatamente após as irradiações. De acordo com Vostálová *et al.* (2018), o método TTC demonstrou ser o mais adequado e sensível para a demonstração de danos ao tecido da pele quando comparado a testes de viabilidade comuns. Nossos resultados demonstraram que não houve grandes alterações, uma vez que todos os grupos apresentaram viabilidade maior que 90%, independentemente da dose de radiação aplicada ou do dia de análise. Diferente do estudo de Vostálová *et al.* (2018), já citado anteriormente, onde aplicaram radiação UVA no modelo de explantes de pele e observaram uma diminuição da viabilidade de acordo com o aumento das doses.

Já está bem definido na literatura que a radiação UV induz hiperproliferação epidérmica e altera a expressão de marcadores de diferenciação (MAKINO *et al.*, 2019). O antígeno Ki-67 é uma proteína nuclear associada à proliferação celular, podendo ser detectado exclusivamente dentro do núcleo celular durante a interfase, enquanto a maior parte da proteína é realocada para a superfície dos cromossomos durante a mitose (CUYLEN *et al.*, 2016). Está presente em todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose), mas está ausente nas células em repouso (quiescentes) (G0) (BRUNO; DARZYNKIEWICZ, 1992). O conteúdo celular da proteína Ki-67 aumenta acentuadamente durante a progressão celular na fase S do ciclo celular (DARZYNKIEWICZ *et al.*, 2015).

O fator de proliferação Ki-67 foi localizado na epiderme, sendo que no D14 as células positivas estavam mais acentuadas na camada basal. Não observamos nenhuma mudança significativa durante o cultivo, assim como nos estudos de Vostálová *et al.* (2019) e Frade *et al.* (2015). Porém, notamos um aumento de células positivas na análise seguinte ao D0, seguindo para uma redução expressiva na análise seguinte no D14, o que corrobora com os achados de Makino *et al.* (2019) em pele humana xenotransplantada irradiada com UVB.

Para determinar uma dose ideal, a princípio utilizamos a modificação morfológica como indicador, tornando complexa uma avaliação precisa da atividade celular. Resultados de um estudo com radiação UVB no modelo de explantes de pele (KHALIL, 2018) indicaram um impacto prejudicial significativo nas camadas epidérmicas da pele e um aumento na vacuolização celular logo na primeira exposição, o que pode variar de acordo com a dose aplicada, uma vez que, no D0 de nosso estudo, os grupos irradiados se mostraram semelhantes ao grupo CNI. Na coloração HE é possível observar os queratinócitos que entram em apoptose após terem recebido uma dose fisiológica de radiação, mais conhecidos como células queimadas de sol, que causam severos danos à pele (VAN LAETHEM *et al.*, 2005). No estudo de Vostálová *et al.* (2018), utilizando diferentes doses de UVA no mesmo modelo, não foi constatado a presença de células queimadas de sol, somente alterações discretas na estrutura da pele a partir de um intervalo de 48 horas, e concordando com isso, o presente modelo apresentou as mesmas características até o D7. De acordo com Andrade *et al.* (2015), houve necrose de queratinócitos no modelo devido ao nível de agressão causado pela radiação UVA em um período de 7 dias, apresentando quantidade similar no mesmo estudo realizado em ratos *hairless*.

Nesse contexto, foi possível observar características similares em nosso estudo, embora somente no D14, apresentando danos mais acentuados de acordo com o aumento das doses de irradiação.

Histologicamente, a pele envelhecida apresenta adelgaçamento das camadas epidérmicas e achatamento e delaminação da junção dermoepidérmica, sendo que a exposição à radiação solar aumenta e acelera tais mudanças (ROIG-ROSELLO; ROUSSELLE, 2020). No estudo de Bernerd (2005), foi observado que a junção dermoepidérmica é drasticamente alterada no fotoenvelhecimento, porém, o uso de vitamina C em modelo de pele humana reconstruída demonstrou efeitos de melhora na mesma. Newton *et al.* (2017), confirmou uma redução do tamanho das cristas epidérmicas e da junção dermoepidérmica na pele de indivíduos idosos em comparação a indivíduos jovens, sendo importante ressaltar que as cristas epidérmicas aumentam substancialmente a área de superfície da junção dermoepidérmica, mantendo a derme e a epiderme bem conectadas. Corroborando com estes estudos, nossos resultados também demonstraram tais alterações, especialmente no grupo IR 10', além de um início de separação da junção dermoepidérmica nos grupos irradiados a partir de D14, o que pode ser explicado pela redução das cristas epidérmicas.

Observamos também um aumento significativo de núcleos picnóticos nos queratinócitos após irradiação solar quando comparado ao CNI no D14, assim como demonstrado no estudo de Abadie, Bedos e Rouquette (2019), onde irradiaram explantes de pele com UVA por sete dias e observaram tal aumento. Zhou *et al.* (2016) também detectaram células queimadas de sol ao mesmo tempo que detectaram células apoptóticas em explantes de pele expostos a radiação UVB após 72h.

Entre os muitos danos induzidos pelo fotoenvelhecimento, mudanças quantitativas e estruturais nas fibras colágenas são as principais alterações observadas. Uma vez que, independentemente do tipo de envelhecimento (intrínseco ou extrínseco), existe uma atrofia dérmica progressiva, no qual o principal mecanismo consta na redução da quantidade de MEC e, sobretudo, do colágeno na derme, que é fragmentado e distribuído de maneira desorganizada (SHIN *et al.*, 2019). De acordo com Kandan *et al.* (2020), comprovou-se que a radiação UVA aplicada em modelo animal durante 10 dias aumentou a degradação das fibras colágenas e reduziu significativamente a densidade do colágeno dérmico na pele de camundongo. Um outro estudo, utilizando cultura 2D e 3D de fibroblastos irradiados com UVA,

demonstrou que a radiação UV inibiu a síntese de colágeno tipo I em fibroblastos dérmicos, além de causar comprometimento das funções dos mesmos, regulação positiva das MMPs e aumento da reticulação do colágeno (NAKYAI *et al.*, 2018). Conforme um estudo de 10 semanas de irradiação UVB em modelo animal, foi reportado que os efeitos deletérios da radiação UVB no metabolismo do colágeno são a principal causa do fotoenvelhecimento, por diminuir a produção de colágeno e acelerar a degradação do mesmo por indução de MMPs, causando a destruição da estrutura do tecido e promovendo a formação de rugas (TANAKA; UCHI; FURUE, 2019).

Considerando os resultados dos trabalhos citados, o primeiro alvo foi o dano no colágeno, já que a disposição das fibras colágenas na derme indica se uma pele é fotodanificada ou não. A análise qualitativa da derme foi importante na escolha da dose experimental, focando primeiramente na fragmentação e desorganização das fibras colágenas, sem destruir a estrutura do modelo.

Em nosso modelo de fotoenvelhecimento foi observado que o grupo IR 10' já começou a apresentar desorganização e fragmentação discretas das fibras colágenas logo no D7, no qual as mesmas se mostraram irregulares e curtas, e de forma mais acentuada no D14 quando comparado ao D0. O grupo IR 8' também demonstrou o mesmo perfil do IR 10', porém, somente no D14. Wang, P. W. *et al.* (2019) evidenciaram a quebra da derme na pele de camundongo quando exposta a UVA e UVB (por três e cinco dias, respectivamente), bem como a desorganização das fibras colágenas, indicando potencial perda da integridade da pele na camada dérmica, o que corrobora com nossos achados. Estas alterações que ocorrem no colágeno dérmico são responsáveis pelas modificações de suas propriedades biomecânicas, o que pode explicar em parte a fragilidade da pele em idosos.

Dessa forma, foi realizada também uma análise quantitativa dos colágenos tipo I e III, sendo estes os mais afetados no fotoenvelhecimento. A coloração Picrosirius se baseia nas propriedades birrefringentes do colágeno, permitindo a distinção entre os colágenos tipo I e tipo III por meio de luz polarizada (RITTIÉ, 2017). O método indica que o colágeno tipo I se apresenta nas cores vermelha ou amarela, fortemente birrefringente, enquanto o colágeno tipo III proporciona uma cor esverdeada, fracamente birrefringente (JUNQUEIRA; MONTES; KRISZTÁN, 1979). A pele saudável é dominada pelo colágeno vermelho maduro tipo I (JORGENSEN *et al.*, 2020).

Em nosso estudo, observamos que a deposição de colágeno tipo I foi menor no grupo irradiado comparado ao grupo controle, o que corrobora com os achados de NURYANA *et al.* (2020), que além disso evidenciaram que as expressões de mRNA de colágeno tipo I e III se apresentaram significativamente mais baixas nos grupos irradiados. Também observamos que a proporção de colágeno tipo III para tipo I foi aumentada em nosso modelo, visto que a radiação UV pode aumentar o colágeno tipo III enquanto suprime o colágeno tipo I (FAN; ZHUANG; LI, 2013).

O estresse oxidativo é outro dano característico do fotoenvelhecimento, já que a radiação solar é responsável por induzir a superprodução de EROs que interagem com membranas ricas em lipídios, enzimas e DNA, alterando suas estruturas e interferindo em suas funções. Tais lesões oxidativas, quando acumuladas nas células da pele, causam fotodanos, levando ao fotoenvelhecimento e a fotocarcinogênese (LU *et al.*, 2020). Um estudo utilizando modelos de explante de pele humana e pele reconstruída irradiados com UVB demonstrou um aumento significativo de peroxidação lipídica em ambos modelos, que apresentaram resultados similares (MARTINS *et al.*, 2020). Outro estudo com fibroblastos dérmicos humanos irradiados com UVA constatou um aumento exacerbado de EROs e uma diminuição significativa de antioxidante, evidenciando o estresse oxidativo nos grupos irradiados em relação ao grupo controle (LU *et al.*, 2020). Tais achados corroboram com os resultados de um estudo humano *in vivo*, onde foi utilizado um simulador solar de amplo espectro, confirmando que todas as regiões espectrais da radiação solar causam uma produção cumulativa de EROs na pele, podendo diferir apenas na sensibilidade de um fototipo de pele para o outro (ALBRECHT *et al.*, 2019).

Os danos associados ao estresse oxidativo foram dependentes da dose definida pela análise morfológica do modelo, uma vez que não utilizamos uma análise deste tipo de dano nos experimentos preliminares. Posteriormente, baseado nos trabalhos citados, foi realizada a dosagem de antioxidantes e produtos colaterais reativos da peroxidação lipídica, a fim de constatar um possível desequilíbrio de defesa da pele devido as doses utilizadas e, conseqüentemente, a confirmação do estresse oxidativo no modelo.

Hidroperóxidos são EROs associadas ao estresse oxidativo e sua concentração pode ser estimada por meio da ação de agentes oxidantes presentes nas amostras que se ligam ao xilenol laranja para formação do complexo colorido no ensaio FOX (do inglês *Ferrous Oxidation-Xylenol Orange*) (BANERJEE *et al.*, 2003).

Em nosso estudo, foi observado um aumento significativo dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos grupos irradiados quando comparados ao CNI, demonstrando o estresse oxidativo do tecido, assim como Lyu e Park (2012) também constataram um aumento de 1,64 vezes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em cultura de fibroblastos dérmicos humanos irradiada com UVA em relação ao controle. Já Kim *et al.* (2012) relataram que este ensaio não forneceu sensibilidade suficiente para medir as alterações nos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> antes e depois da exposição à radiação UVB em camundongos *hairless*.

O MDA é um produto secundário da peroxidação lipídica, sendo o principal indicador da mesma e, portanto, um indicador de dano celular. Em nosso modelo, detectamos um aumento significativo na produção de MDA dos grupos expostos em relação ao grupo controle no D0 e D7, o que corrobora com os achados de Lu *et al.* (2020) e Khan *et al.* (2018) que utilizaram radiação UVA em cultura de fibroblastos dérmicos humanos e ambos os estudos obtiveram o mesmo resultado. Nosso trabalho ainda demonstrou que os níveis de MDA foram reduzidos no D14, assemelhando os grupos irradiados ao grupo CNI, corroborando com o estudo de Saguie *et al.* (2021), onde explantes de pele humana irradiados ou não por UVA apresentaram o mesmo perfil observado. Tais achados indicam que a radiação UV causa danos oxidativos imediatos em lipídios e proteínas, o qual se normaliza após alguns dias, sugerindo então um possível “estresse” devido ao protocolo do modelo em si.

A peroxidação lipídica também foi avaliada pela imunomarcagem do 4-HNE, visto que este é um produto derivado da mesma e, portanto, foi utilizado como indicador de EROs para avaliar os níveis de estresse oxidativo celular no modelo (LIOU; STORZ, 2015). Um estudo comparando as alterações morfológicas e estruturais com alterações redox durante o envelhecimento cronológico na pele de rato (de 3 dias a 21 meses) confirmou que a imunopositividade do 4-HNE aumenta na velhice (JANKOVIC *et al.*, 2019). Camundongos *hairless* expostos à radiação UVA diariamente por 15 dias também indicaram um aumento significativo de adutos de 4-HNE em relação ao grupo controle (LARROQUE-CARDOSO *et al.*, 2015). Embora nosso modelo não tenha apresentado alterações expressivas, observamos um leve aumento de D0 para D7, caindo para a metade de D7 para D14, confirmando que a via de oxidação é um evento precoce de dano à pele induzido pela radiação solar, além de outros fatores externos (FERRARA *et al.*, 2020).

Considerando a ligação entre o estresse oxidativo e a inflamação, investigamos o possível estado inflamatório do modelo pela imunomarcagem de um dos principais

fatores de transcrição envolvido nas respostas inflamatórias dos tecidos. O NFκB é ativado pela radiação solar, sendo responsável por liberar MMP-8 no fotoenvelhecimento e ainda gerar uma cascata de eventos, aumentando o dano oxidativo por meio da produção de radicais livres (SZOLTYSEK *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2012). Quando a pele é exposta à radiação solar, existe uma translocação de NFκB para os núcleos de um subconjunto de queratinócitos, uma vez que, na pele normal, ele está localizado principalmente no citoplasma (PFUNDT *et al.*, 2001). Em nosso estudo, não houve diferença dos grupos irradiados com o grupo controle, uma vez que os mesmos apresentaram perfis similares, corroborando com o estudo de Ferrara *et al.* (2021), no qual foi constatado que a radiação UV por si só não afeta significativamente os níveis de NFκB quando comparados aos tecidos não expostos. Wu *et al.* (2012) analisaram os efeitos da radiação UVB em pele de camundongo e também observaram pouca expressão de NFκB, tanto nos grupos irradiados quanto no controle. Nosso estudo ainda demonstrou que os níveis de NFκB foram reduzindo ao longo dos dias, reforçando os dados obtidos nas análises de MDA e 4-HNE.

Nesse contexto, tais achados evidenciaram que o modelo em si apresenta uma maior produção de moléculas sinalizadoras de estresse oxidativo, uma vez que o CNI apresentou um perfil similar ao dos grupos irradiados, mesmo que em menor quantidade. Para uma melhor compreensão desta condição biológica no modelo, investigamos também o sistema de defesas antioxidantes, a fim de constatar uma correlação entre os resultados de ambos e, conseqüentemente, o desequilíbrio causado pela radiação solar.

A GSH está envolvida em inúmeros processos celulares, funcionais e, principalmente, na participação em algumas reações de detoxificação. Por atuar na defesa contra xenobióticos e na proteção celular contra mudanças no quadro oxidativo, concentrações baixas de GSH estão associadas à um maior risco de estresse oxidativo e à ocorrência de infecções oportunistas (FORMAN *et al.*, 2009). Em nosso estudo, todos os grupos exibiram baixas concentrações deste antioxidante, embora os grupos irradiados tenham apresentado concentrações ainda mais baixas que o grupo CNI, confirmando que a radiação induz alterações nos níveis do mesmo. Embora GARRE *et al.* (2018) tenham demonstrado em seu estudo utilizando explantes de pele humana expostos à radiação solar que os níveis de GSH no grupo irradiado foram significativamente menores quando comparados ao CNI e Fonseca *et al.* (2010) também observaram uma redução de 44,5% do antioxidante em amostras

de pele de camundongo *hairless* irradiadas com UVB quando comparadas ao CNI. Nosso modelo ainda demonstrou que os níveis deste antioxidante foram aumentados de D0 para D7 e em seguida caíram novamente no D14, corroborando com o estudo de Vostálová *et al.* (2019), que apresentou o mesmo perfil de GSH.

O DPPH é um radical livre utilizado para medir a capacidade antioxidante. Seu ensaio consiste na redução do radical DPPH violeta pelo antioxidante, alterando a cor das moléculas estáveis de DPPH para amarelo claro (SIRIVIBULKOVIT; NOUANTHAVONG; SAMEENOI, 2018). Este ensaio é mais comumente empregado em substâncias e formulações com possível poder antioxidante, como no estudo dos efeitos do ácido hialurônico em modelos de lipídios expostos à radiação UV (TROMMER *et al.*, 2003), efeito antioxidante de polifenóis em modelo de envelhecimento de células da pele induzido por UV (NADIM *et al.*, 2014), efeito protetor do alho na senescência celular em queratinócitos humanos expostos à radiação UVB (KIM, 2016), entre outros. No entanto, avaliamos amostras de pele com o intuito de corroborar com os resultados obtidos no ensaio de GSH. Como já demonstrado anteriormente, os níveis de concentração de DPPH no modelo foram realmente baixos, apresentando resultados não tão relevantes quanto os demais ensaios bioquímicos.

Portanto, os marcadores de antioxidantes utilizados neste estudo não apresentaram grandes alterações no estado redox intracelular do modelo de explantes de pele, uma vez que, no geral, os grupos irradiados demonstraram níveis próximos ao CNI, indicando que tais ensaios talvez não sejam os mais indicados para o modelo hOSEC devido à baixa concentração encontrada.

De modo geral, os achados preliminares deste estudo abrem possibilidade de se padronizar o modelo hOSEC para testes de produtos cosméticos de uso tópico, voltados para o tratamento e prevenção do fotoenvelhecimento, uma vez que as análises realizadas já nos mostraram resultados relevantes e satisfatórios. Embora algumas limitações ainda ocasionem grandes variações nas análises, tais como a heterogeneidade da pele dos doadores, o modelo representa uma alternativa mais viável, de menor custo e com minimização do uso de animais.

Acreditamos ainda que vários pontos podem ser aprimorados, tais como o aumento do número de amostra de pele doadas para uma melhor avaliação do comportamento do modelo, assim como o uso de metodologias para a análise das fibras elásticas, uma vez que as mesmas também possuem papel fundamental no

fotoenvelhecimento. Modificações neste sentido são importantes para dar sequência ao estudo deste modelo, contudo, este trabalho confirmou o potencial do modelo hOSEC para estudos de fotoenvelhecimento, além de abrir novas perspectivas para a avaliação da segurança e eficácia de produtos voltados para esta afecção.

## 6 CONCLUSÃO

- ✓ Dentre as doses estudadas, a de 105 J (potência de 0,35 W/m<sup>2</sup>/nm por 5 minutos de exposição) se mostrou a ideal na padronização do modelo de pele humana *ex vivo* (hOSEC) para estudos de fotoenvelhecimento;
- ✓ Os grupos irradiados demonstraram danos de fotoenvelhecimento, quando comparados ao não irradiado;
- ✓ O modelo se mostrou viável com até 14 dias de cultura para o estudo em questão;
- ✓ O modelo demonstrou uma degradação do colágeno tipo I e uma maior quantidade do colágeno tipo III nos grupos irradiados;
- ✓ A avaliação da atividade antioxidante constatou menor concentração de GSH nos grupos irradiados comparado ao não irradiado;
- ✓ Os grupos irradiados demonstraram maiores níveis de estresse oxidativo em comparação ao não irradiado;
- ✓ De acordo com os parâmetros analisados e com os resultados preliminares, o modelo hOSEC pode tornar-se um modelo importante e interessante para estudos de fotoenvelhecimento.

## REFERÊNCIAS

- ABADIE, S.; BEDOS, P.; ROUQUETTE, J. A human skin model to evaluate the protective effect of compounds against UVA damage. **International Journal of Cosmetic Science** 2019 Dec;41(6):594-603. doi: 10.1111/ics.12579. PMID: 31512246.
- AHMED, S. S.; WHRITENOUR, J.; AHMED, M. M.; BIBBY, L.; DARBY, L.; WANG, X. N.; WATSON, J.; DICKINSON, A. M. Evaluation of a human *in vitro* skin test for predicting drug hypersensitivity reactions. **Toxicology and Applied Pharmacology** 2019 Apr 15;369:39-48. doi: 10.1016/j.taap.2019.02.005. Epub 2019 Feb 12. PMID: 30768973.
- ALBRECHT, S.; JUNG, S.; MÜLLER, R.; LADEMANN, J.; ZUBERBIER, T.; ZASTROW, L.; REBLE, C.; BECKERS, I.; MEINKE, M. C. Skin type differences in solar-simulated radiation-induced oxidative stress. **British Journal of Dermatology** 2019 Mar;180(3):597-603. doi: 10.1111/bjd.17129. Epub 2018 Oct 14. PMID: 30176057.
- ANDRADE T. A.; AGUIAR, A. F.; GUEDES, F. A.; LEITE, M. N.; CAETANO, G. F.; COELHO, E. B.; DAS, P. K.; FRADE, M. A. *Ex vivo* model of human skin (hOSEC) as alternative to animal use for cosmetic tests. **Procedia Engineering** 110 (2015) 67 – 73.
- BAEK, J.; LEE, M. G. Oxidative stress and antioxidant strategies in dermatology. **Redox Report** 2016 Jul;21(4):164-9. doi: 10.1179/1351000215Y.0000000015. Epub 2016 Mar 31. PMID: 26020527.
- BANERJEE, D.; MADHUSOODANAN, U. K.; SHARANABASAPPA, M.; GHOSH, S.; JACOB, J. Measurement of plasma hydroperoxide concentration by FOX-1 assay in conjunction with triphenylphosphine. **Clinica Chimica Acta** 2003 Nov;337(1-2):147-52. doi: 10.1016/j.cccn.2003.08.004. PMID: 14568191.
- BAROLET, D.; CHRISTIAENS, F.; HAMBLIN, M. R. Infrared and skin: Friend or foe. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** 2016 Feb;155:78-85. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.12.014. Epub 2015 Dec 21. PMID: 26745730; PMCID: PMC4745411.
- BASKETTER, D.; ALÉPÉE, N.; CASATI, S.; CROZIER, J.; EIGLER, D.; GRIEM, P.; HUBESCH, B.; DE KNECHT, J.; LANDSIEDEL, R.; LOUEKARI, K.; MANOU, I.; MAXWELL, G.; MEHLING, A.; NETZEVA, T.; PETRY, T.; ROSSI, L. H. Skin sensitisation – moving forward with non-animal testing strategies for regulatory purposes in the EU. **Regulatory Toxicology and Pharmacology** 2013 Dec;67(3):531-5. doi: 10.1016/j.yrtph.2013.10.002. Epub 2013 Oct 16. PMID: 24140884.

BEDOYA, S. A. O.; CONCEIÇÃO, L. G.; VILORIA, M. I. V.; LOURES, F. H.; VALENTE, F. L.; AMORIM, R. L.; SILVA, F. F. Characterization of types I and III collagen in the stroma of cutaneous squamous cell carcinoma in dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 68 (1) Jan-Feb 2016.

BERNEBURG, M.; PLETTENBERG, H.; KRUTMANN, J. Photoaging of human skin. *Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine* 2000 Dec;16(6):239-44. doi: 10.1034/j.1600-0781.2000.160601.x. PMID: 11132125.

BERNERD, F. La peau reconstruite: modèle d'étude du keratinocyte, du fibroblaste et de leurs interactions. Effets des ultraviolets, dommages et réparation [Human skin reconstructed *in vitro* as a model to study the keratinocyte, the fibroblast and their interactions: photodamage and repair processes]. **Journal de la Société de Biologie** 2005;199(4):313-20. French. doi: 10.1051/jbio:2005032. PMID: 16738525.

BRASIL. Atos do Poder Legislativo. **Lei n. 11.794, de 08 de outubro de 2008**. Estabelece procedimentos para o uso científico de animais. Diário Oficial da União, Brasília. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/ato2007-2010/2008/lei/11794.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2007-2010/2008/lei/11794.htm). Acesso em: 21 jun. 2021.

BRUNO, S.; DARZYNKIEWICZ, Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. **Cell Proliferation** 1992 Jan;25(1):31-40. doi: 10.1111/j.1365-2184.1992.tb01435.x. PMID: 1540682.

CANNAVÒ, S. P.; RISO, G.; CASCIARO, M.; DI SALVO, E.; GANGEMI, S. Oxidative stress involvement in psoriasis: a systematic review. **Free Radical Research** 2019 Aug;53(8):829-840. doi: 10.1080/10715762.2019.1648800. Epub 2019 Aug 8. PMID: 31392915.

CHRISTENSEN, L.; SUGGS, A.; BARON, E. Ultraviolet Photobiology in Dermatology. **Advances in Experimental Medicine and Biology** 2017;996:89-104. doi: 10.1007/978-3-319-56017-5\_8. PMID: 29124693.

CORRÒ, C.; NOVELLASDEMUNT, L.; LI, V. S. W. A brief history of organoids. **American Journal of Physiology-Cell Physiology** 2020 Jul 1;319(1):C151-C165. doi: 10.1152/ajpcell.00120.2020. Epub 2020 May 27. PMID: 32459504; PMCID: PMC7468890.

CUYLEN, S.; BLAUKOPF, C.; POLITI, A. Z.; MÜLLER-REICHERT, T.; NEUMANN, B.; POSER, I.; ELLENBERG, J.; HYMAN, A. A.; GERLICH, D. W. Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. **Nature** 2016 Jul 14;535(7611):308-12. doi: 10.1038/nature18610. Epub 2016 Jun 29. PMID: 27362226; PMCID: PMC4947524.

DARZYNKIEWICZ, Z.; ZHAO, H.; ZHANG, S.; LEE, M. Y.; LEE, E. Y.; ZHANG, Z. Initiation and termination of DNA replication during S phase in relation to cyclins D1, E and A, p21WAF1, Cdt1 and the p12 subunit of DNA polymerase  $\delta$  revealed in individual cells by cytometry. **Oncotarget** 2015 May 20;6(14):11735-50. doi: 10.18632/oncotarget.4149. PMID: 26059433; PMCID: PMC4494901.

DE LAVOR, M. S.; BINDA, N. S.; FUKUSHIMA, F. B.; CALDEIRA, F. M.; DA SILVA, J. F.; SILVA, C. M.; DE OLIVEIRA, K. M.; MARTINS, B. C.; TORRES, B. B.; ROSADO, I. R.; GOMEZ, R. S.; GOMEZ, M. V.; DE MELO, E. G. Ischemia-reperfusion model in rat spinal cord: cell viability and apoptosis signaling study. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology** 2015 Sep 1;8(9):9941-9. PMID: 26617703; PMCID: PMC4637788.

DRÉNO, B.; ARAVIISKAIA, E.; BERARDESCA, E.; GONTIJO, G.; SANCHEZ VIERA, M.; XIANG, L. F.; MARTIN, R.; BIEBER, T. Microbiome in healthy skin, update for dermatologists. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology** 2016 Dec;30(12):2038-2047. doi: 10.1111/jdv.13965. Epub 2016 Oct 13. PMID: 27735094; PMCID: PMC6084363.

ECKHART, L.; ZEEUWEN, P. L. J. M. The skin barrier: Epidermis vs environment. **Experimental Dermatology** 2018 Aug;27(8):805-806. doi: 10.1111/exd.13731. PMID: 29989217.

FAN, J.; ZHUANG, Y.; LI, B. Effects of collagen and collagen hydrolysate from jellyfish umbrella on histological and immunity changes of mice photoaging. **Nutrients** 2013 Jan 17;5(1):223-33. doi: 10.3390/nu5010223. PMID: 23344251; PMCID: PMC3571645.

FARNAUD, S. The evolution of the Three Rs. **Alternatives to Laboratory Animals** 2009 Jul;37(3):249-54. doi: 10.1177/026119290903700305. PMID: 19678725.

FERRARA, F.; PAMBIANCHI, E.; WOODBY, B.; MESSANO, N.; THERRIEN, J. P.; PECORELLI, A.; CANELLA, R.; VALACCHI, G. Evaluating the effect of ozone in UV induced skin damage. **Toxicology Letters** 2021 Mar 1;338:40-50. doi: 10.1016/j.toxlet.2020.11.023. Epub 2020 Dec 3. PMID: 33279629.

FERRARA, F.; WOODBY, B.; PECORELLI, A.; SCHIAVONE, M. L.; PAMBIANCHI, E.; MESSANO, N.; THERRIEN, J. P.; CHOUDHARY, H.; VALACCHI, G. Additive effect of combined pollutants to UV induced skin OxInflammation damage. Evaluating the protective topical application of a cosmeceutical mixture formulation. **Redox Biology** 2020 Jul;34:101481. doi: 10.1016/j.redox.2020.101481. Epub 2020 Apr 18. PMID: 32336667; PMCID: PMC7327990.

FONSECA, Y. M.; CATINI, C. D.; VICENTINI, F. T.; NOMIZO, A.; GERLACH, R. F.; FONSECA, M. J. Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. **Journal of Ethnopharmacology** 2010 Feb 17;127(3):596-601. doi: 10.1016/j.jep.2009.12.019. Epub 2009 Dec 22. PMID: 20026397.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H.; RINNA, A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Molecular Aspects of Medicine** 2009 Feb-Apr;30(1-2):1-12. doi: 10.1016/j.mam.2008.08.006. Epub 2008 Aug 30. PMID: 18796312; PMCID: PMC2696075.

FRADE, M. A.; ANDRADE, T. A.; AGUIAR, A. F.; GUEDES, F. A.; LEITE, M. N.; PASSOS, W. R.; COELHO, E. B.; DAS, P. K. Prolonged viability of human organotypic skin explant in culture method (hOSEC). **Anais Brasileiros de Dermatologia** 2015 May-Jun;90(3):347-50. doi: 10.1590/abd1806-4841.20153645. Epub 2015 Jun 1. PMID: 26131864; PMCID: PMC4516099.

GARRE, A.; NARDA, M.; VALDERAS-MARTINEZ, P.; PIQUERO, J.; GRANGER, C. Antiaging effects of a novel facial serum containing L-Ascorbic acid, proteoglycans, and proteoglycan-stimulating tripeptide: *ex vivo* skin explant studies and *in vivo* clinical studies in women. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology** 2018 May 29;11:253-263. doi: 10.2147/CCID.S161352. PMID: 29881301; PMCID: PMC5985795.

GELSE, K.; PÖSCHL, E.; AIGNER, T. Collagens – structure, function, and biosynthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews** 2003 Nov 28;55(12):1531-46. doi: 10.1016/j.addr.2003.08.002. PMID: 14623400.

GENOSKIN. *Ex vivo* clinical testing. Disponível em: <https://genoskin.com/en/tissue-samples/>. Acesso em: 12 ago. 2021.

GÉRARD-MONNIER, D.; ERDELMEIER, I.; RÉGNARD, K.; MOZE-HENRY, N.; YADAN, J. C.; CHAUDIÈRE, J. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. **Chemical Research in Toxicology** 1998 Oct;11(10):1176-83. doi: 10.1021/tx9701790. PMID: 9778314.

GROSS-AMAT, O.; GUILLEN, M.; SALMON, D.; NATAF, S.; AUXENFANS, C. Characterization of a Topically Testable Model of Burn Injury on Human Skin Explants. **International Journal of Molecular Sciences** 2020 Sep 22;21(18):6956. doi: 10.3390/ijms21186956. PMID: 32971882; PMCID: PMC7554828.

GU, Y.; HAN, J.; JIANG, C.; ZHANG, Y. Biomarkers, oxidative stress and autophagy in skin aging. **Ageing Research Reviews** 2020 May;59:101036. doi: 10.1016/j.arr.2020.101036. Epub 2020 Feb 24. PMID: 32105850.

HOFMANN-WELLENHOF, R.; SMOLLE, J.; ROSCHGER, A.; STRUNK, D.; HUBMER, M.; HOFFMANN, C.; QUEHENBERGER, F.; HORN, M.; KERL, H.; WOLF, P. Sunburn cell formation, dendritic cell migration, and immunomodulatory factor production after solar-simulated irradiation of sunscreen-treated human skin explants *in vitro*. **Journal of Investigative Dermatology** 2004 Oct;123(4):781-7. doi: 10.1111/j.0022-202X.2004.23322.x. PMID: 15373785.

HUDSON, L.; RASHDAN, E.; BONN, C. A.; CHAVAN, B.; RAWLINGS, D.; BIRCHMACHIN, M. A. Individual and combined effects of the infrared, visible, and ultraviolet light components of solar radiation on damage biomarkers in human skin cells. **FASEB Journal** 2020 Mar;34(3):3874-3883. doi: 10.1096/fj.201902351RR. Epub 2020 Jan 16. PMID: 31944399; PMCID: PMC7079185.

INSTITUTO NCB. Ultravioleta e saúde – Soluções usando LEDs (ART4361). Radiação ultravioleta. Disponível em: <https://www.newtonbraga.com.br/index.php/meio-ambiente-e-saude/17489-ultravioleta-e-saude-solucoes-usando-leds-art4361.html>. Acesso em: 08 jun. 2021.

JACOBS, J. J.; LEHÉ, C. L.; CAMMANS, K. D.; DAS, P. K.; ELLIOTT, G. R. Assessment of contact allergens by dissociation of irritant and sensitizing properties. **Toxicology in Vitro** 2004 Oct;18(5):681-90. doi: 10.1016/j.tiv.2004.03.007. PMID: 15251187.

JACOBS, J. J.; LEHÉ, C. L.; HASEGAWA, H.; ELLIOTT, G. R.; DAS, P. K. Skin irritants and contact sensitizers induce Langerhans cell migration and maturation at irritant concentration. **Experimental Dermatology** 2006 Jun;15(6):432-40. doi: 10.1111/j.0906-6705.2006.00420.x. PMID: 16689859.

JANKOVIC, A.; SASO, L.; KORAC, A.; KORAC, B. Relation of Redox and Structural Alterations of Rat Skin in the Function of Chronological Aging. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity** 2019 Feb 14;2019:2471312. doi: 10.1155/2019/2471312. PMID: 30906501; PMCID: PMC6393874.

JORGENSEN, A. M.; VARKEY, M.; GORKUN, A.; CLOUSE, C.; XU, L.; CHOU, Z.; MURPHY, S. V.; MOLNAR, J.; LEE, S. J.; YOO, J. J.; SOKER, S.; ATALA, A. Bioprinted Skin Recapitulates Normal Collagen Remodeling in Full-Thickness Wounds. **Tissue Engineering Part A** 2020 May;26(9-10):512-526. doi: 10.1089/ten.TEA.2019.0319. Epub 2020 Jan 28. PMID: 31861970; PMCID: PMC7249461.

JUNQUEIRA, L. C.; MONTES, G. S.; KRISZTÁN, R. M. The collagen of the vertebrate peripheral nervous system. **Cell and Tissue Research** 1979 Nov;202(3):453-60. doi: 10.1007/BF00220437. PMID: 519713.

KAMMEYER, A.; LUITEN, R. M. Oxidation events and skin aging. **Ageing Research Reviews** 2015 May;21:16-29. doi: 10.1016/j.arr.2015.01.001. Epub 2015 Jan 31. PMID: 25653189.

KANDAN, P. V.; BALUPILLAI, A.; KANIMOZHI, G.; KHAN, H. A.; ALHOMIDA, A. S.; PRASAD, N. R. Opuntiol Prevents Photoaging of Mouse Skin via Blocking Inflammatory Responses and Collagen Degradation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity** 2020 Nov 30;2020:5275178. doi: 10.1155/2020/5275178. PMID: 33312336; PMCID: PMC7721505.

KHALIL, C. Human skin explants an *in vitro* approach for assessing UVB induced damage. **Toxicology in Vitro** 2018 Dec;53:193-199. doi: 10.1016/j.tiv.2018.08.013. Epub 2018 Aug 24. PMID: 30149078.

KHAN, A.; BAI, H.; SHU, M.; CHEN, M.; KHAN, A.; BAI, Z. Antioxidative and antiphotoprotective activities of neferine upon UV-A irradiation in human dermal fibroblasts. **Bioscience Reports** 2018 Dec 14;38(6):BSR20181414. doi: 10.1042/BSR20181414. Erratum in: Biosci Rep. 2021 Jul 30;41(7): PMID: 30355644; PMCID: PMC6294629.

KIM, H. K. Protective Effect of Garlic on Cellular Senescence in UVB-Exposed HaCaT Human Keratinocytes. **Nutrients** 2016 Jul 29;8(8):464. doi: 10.3390/nu8080464. PMID: 27483310; PMCID: PMC4997377.

KIM, S. Y.; NA, Y. J.; KIM, D.; KIM, Y.; KIM, H. M.; HWANG, S. H.; KWAK, J.; KUH, H. J.; LEE, J. Development of estimation methods of skin oxidation and evaluation of anti-oxidative effects of genistein in topical formulations. **Korean Journal of Physiology & Pharmacology** 2012 Jun;16(3):205-9. doi: 10.4196/kjpp.2012.16.3.205. Epub 2012 Jun 26. PMID: 22802703; PMCID: PMC3394924.

KREWSKI, D.; ACOSTA, D. JR.; ANDERSEN, M.; ANDERSON, H.; BAILAR, J. C.; BOEKELHEIDE, K.; BRENT, R.; CHARNLEY, G.; CHEUNG, V. G.; GREEN, S. JR.; KELSEY, K. T.; KERKVLIT, N. I.; LI, A. A.; MCCRAY, L.; MEYER, O.; PATTERSON, R. D.; PENNIE, W.; SCALA, R. A.; SOLOMON, G. M.; STEPHENS, M.; YAGER, J.; ZEISE, L. Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews** 2010 Feb;13(2-4):51-138. doi: 10.1080/10937404.2010.483176. PMID: 20574894; PMCID: PMC4410863.

KRUTMANN, J.; BOULOC, A.; SORE, G.; BERNARD, B. A.; PASSERON, T. The skin aging exposome. **Journal of Dermatological Science** 2017 Mar;85(3):152-161. doi: 10.1016/j.jdermsci.2016.09.015. Epub 2016 Sep 28. PMID: 27720464.

LARROQUE-CARDOSO, P.; CAMARÉ, C.; NADAL-WOLLBOLD, F.; GRAZIDE, M. H.; PUCELLE, M.; GAROBY-SALOM, S.; BOGDANOWICZ, P.; JOSSE, G.; SCHMITT, A. M.; UCHIDA, K.; ZARKOVIC, K.; SALVAYRE, R.; NÈGRE-SALVAYRE, A. Elastin Modification by 4-Hydroxynonenal in Hairless Mice Exposed to UV-A. Role in Photoaging and Actinic Elastosis. **Journal of Investigative Dermatology** 2015 Jul;135(7):1873-1881. doi: 10.1038/jid.2015.84. Epub 2015 Mar 4. PMID: 25739050.

LEBONVALLET, N.; JEANMAIRE, C.; DANOUX, L.; SIBILLE, P.; PAULY, G.; MISERY, L. The evolution and use of skin explants: potential and limitations for dermatological research. **European Journal of Dermatology** 2010 Nov-Dec;20(6):671-84. doi: 10.1684/ejd.2010.1054. Epub 2010 Sep 7. PMID: 20822970.

LEITE, M. N.; VIEGAS, J. S. R.; PRAÇA, F. S. G.; DE PAULA, N. A.; RAMALHO, L. N. Z.; BENTLEY, M. V. L. B.; FRADE, M. A. C. *Ex vivo* model of human skin (hOSEC) for assessing the dermatokinetics of the anti-melanoma drug Dacarbazine. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** 2021 May 1;160:105769. doi: 10.1016/j.ejps.2021.105769. Epub 2021 Feb 19. PMID: 33610737.

LEPHART, E. D. Skin aging and oxidative stress: Equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms. **Ageing Research Reviews** 2016 Nov;31:36-54. doi: 10.1016/j.arr.2016.08.001. Epub 2016 Aug 9. PMID: 27521253.

LIM, J. Y.; KIM, O. K.; LEE, J.; LEE, M. J.; KANG, N.; HWANG, J. K. Protective effect of the standardized green tea seed extract on UVB-induced skin photoaging in hairless mice. **Nutrition Research and Practice** 2014 Aug;8(4):398-403. doi: 10.4162/nrp.2014.8.4.398. Epub 2014 May 15. PMID: 25110559; PMCID: PMC4122711.

LIOU, G. Y.; STORZ, P. Detecting reactive oxygen species by immunohistochemistry. **Methods in Molecular Biology** 2015;1292:97-104. doi: 10.1007/978-1-4939-2522-3\_7. PMID: 25804750; PMCID: PMC4571457.

LOSQUADRO, W. D. Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America** 2017 Aug;25(3):283-289. doi: 10.1016/j.fsc.2017.03.001. Epub 2017 May 30. PMID: 28676156.

LU, Y. S.; JIANG, Y.; YUAN, J. P.; JIANG, S. B.; YANG, Y.; ZHU, P. Y.; SUN, Y. Z.; QI, R. Q.; LIU, T.; WANG, H. X.; WU, Y.; GAO, X. H.; CHEN, H. D. UVA Induced Oxidative Stress Was Inhibited by Paeoniflorin/Nrf2 Signaling or PLIN2. **Frontiers in Pharmacology** 2020 May 15;11:736. doi: 10.3389/fphar.2020.00736. PMID: 32499710; PMCID: PMC7243259.

LYU, S. Y.; PARK, W. B. Photoprotective Potential of Anthocyanins Isolated from *Acanthopanax divaricatus* Var. *albeofructus* Fruits against UV Irradiation in Human Dermal Fibroblast Cells. **Biomolecules & Therapeutics** (Seoul) 2012 Mar;20(2):201-6. doi: 10.4062/biomolther.2012.20.2.201. PMID: 24116296; PMCID: PMC3792219.

MAHMOUD, B. H.; HEXSEL, C. L.; HAMZAVI, I. H.; LIM, H. W. Effects of visible light on the skin. **Photochemistry and Photobiology** 2008 Mar-Apr;84(2):450-62. doi: 10.1111/j.1751-1097.2007.00286.x. Epub 2008 Jan 29. PMID: 18248499.

MAKINO, T.; MIZAWA, M.; YOSHIHISA, Y.; SHIMIZU, T. Ultraviolet B irradiation increases the expression of trichohyalin-like 1 protein in human skin xenotransplants. **Clinical and Experimental Dermatology** 2019 Oct;44(7):773-776. doi: 10.1111/ced.13904. Epub 2019 Jan 4. PMID: 30610764.

MARCOCCI, C.; LEO, M.; ALTEA, M. A. Oxidative stress in graves' disease. **European Thyroid Journal** 2012 Jul;1(2):80-7. doi: 10.1159/000337976. Epub 2012 Jun 7. PMID: 24783001; PMCID: PMC3821469.

MARTINS, R. M.; ALVES, G. A. D.; MARTINS, S. S.; DE FREITAS, L. A. P.; ROCHETTE, P. J.; MOULIN, V. J.; FONSECA, M. J. V. Apple Extract (*Malus* sp.) and Rutin as Photochemopreventive Agents: Evaluation of Ultraviolet B-Induced Alterations on Skin Biopsies and Tissue-Engineered Skin. **Rejuvenation Research** 2020 Dec;23(6):465-475. doi: 10.1089/rej.2019.2219. Epub 2020 May 18. PMID: 32242497.

MATHES, S. H.; RUFFNER, H.; GRAF-HAUSNER, U. The use of skin models in drug development. **Advanced Drug Delivery Reviews** 2014 Apr;69-70:81-102. doi: 10.1016/j.addr.2013.12.006. Epub 2013 Dec 27. PMID: 24378581.

MOHANIA, D.; CHANDEL, S.; KUMAR, P.; VERMA, V.; DIGVIJAY, K.; TRIPATHI, D.; CHOUDHURY, K.; MITTEN, S. K.; SHAH, D. Ultraviolet Radiations: Skin Defense-Damage Mechanism. **Advances in Experimental Medicine and Biology** 2017;996:71-87. doi: 10.1007/978-3-319-56017-5\_7. PMID: 29124692.

MORETTO, L. D.; STEPHANO, M. A. Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil. 1ª edição. São Paulo, 2019.

NADIM, M.; AURIOL, D.; LAMERANT-FAYEL, N.; LEFÈVRE, F.; DUBANET, L.; REDZINIAK, G.; KIEDA, C.; GRILLON, C. Improvement of polyphenol properties upon glucosylation in a UV-induced skin cell ageing model. **International Journal of Cosmetic Science** 2014 Dec;36(6):579-87. doi: 10.1111/ics.12159. Epub 2014 Sep 29. PMID: 25196711.

NAKYAI, W.; TISSOT, M.; HUMBERT, P.; GRANDMOTTET, F.; VIYUCH, J.; VIENNET, C. Effects of Repeated UVA Irradiation on Human Skin Fibroblasts Embedded in 3D Tense Collagen Matrix. **Photochemistry and Photobiology** 2018 Jul;94(4):715-724. doi: 10.1111/php.12895. Epub 2018 Mar 31. PMID: 29421845.

NARLA, S.; KOHLI, I.; HAMZAVI, I. H.; LIM, H. W. Visible light in photodermatology. **Photochemical and Photobiological Sciences** 2020 Jan 22;19(1):99-104. doi: 10.1039/c9pp00425d. PMID: 31922171.

NEIL, J. E.; BROWN, M. B.; WILLIAMS, A. C. Human skin explant model for the investigation of topical therapeutics. **Scientific Reports** 2020 Dec 3;10(1):21192. doi: 10.1038/s41598-020-78292-4. PMID: 33273665; PMCID: PMC7712775.

NEWTON, V. L.; BRADLEY, R. S.; SEROUL, P.; CHEREL, M.; GRIFFITHS, C. E.; RAWLINGS, A. V.; VOEGELI, R.; WATSON, R. E.; SHERRATT, M. J. Novel approaches to characterize age-related remodelling of the dermal-epidermal junction in 2D, 3D and in vivo. **Skin Research and Technology** 2017 May;23(2):131-148. doi: 10.1111/srt.12312. Epub 2016 Aug 9. PMID: 27502896.

NGUYEN, A. V.; SOULIKA, A. M. The Dynamics of the Skin's Immune System. **International Journal of Molecular Sciences** 2019 Apr 12;20(8):1811. doi: 10.3390/ijms20081811. PMID: 31013709; PMCID: PMC6515324.

NIEHUES, H.; BOUWSTRA, J. A.; EL GHALBZOURI, A.; BRANDNER, J. M.; ZEEUWEN, P. L. J. M.; VAN DEN BOGAARD, E. H. 3D skin models for 3R research: The potential of 3D reconstructed skin models to study skin barrier function. **Experimental Dermatology** 2018 May;27(5):501-511. doi: 10.1111/exd.13531. Epub 2018 Apr 6. PMID: 29518287.

NURYANA, C. T.; HARYANA, S. M.; WIROHADIDJOJO, Y. W.; ARFIAN, N. Achatina fulica mucous improves cell viability and increases collagen deposition in UVB-irradiated human fibroblast culture. **Journal of Stem Cells and Regenerative Medicine** 2020 May 27;16(1):26-31. doi: 10.46582/jsrm.1601005. PMID: 32536768; PMCID: PMC7282269.

PFUNDT, R.; VAN VLIJMEN-WILLEMS, I.; BERGERS, M.; WINGENS, M.; CLOIN, W.; SCHALKWIJK, J. In situ demonstration of phosphorylated c-jun and p38 MAP kinase in epidermal keratinocytes following ultraviolet B irradiation of human skin. **Journal of Pathology** 2001 Feb;193(2):248-55. doi: 10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<::AID-PATH780>3.0.CO;2-Y. PMID: 11180173.

RABE, J. H.; MAMELAK, A. J.; MCELGUNN, P. J.; MORISON, W. L.; SAUDER, D. N. Photoaging: mechanisms and repair. **Journal of the American Academy of Dermatology** 2006 Jul;55(1):1-19. doi: 10.1016/j.jaad.2005.05.010. PMID: 16781287.

RICARD-BLUM, S. The collagen family. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology** 2011 Jan 1;3(1):a004978. doi: 10.1101/cshperspect.a004978. PMID: 21421911; PMCID: PMC3003457.

RIPPA, A. L.; KALABUSHEVA, E. P.; VOROTELYAK, E. A. Regeneration of Dermis: Scarring and Cells Involved. **Cells** 2019 Jun 18;8(6):607. doi: 10.3390/cells8060607. PMID: 31216669; PMCID: PMC6627856.

RITTIÉ, L. Method for Picrosirius Red-Polarization Detection of Collagen Fibers in Tissue Sections. **Methods in Molecular Biology** 2017;1627:395-407. doi: 10.1007/978-1-4939-7113-8\_26. PMID: 28836216.

ROIG-ROSELLO, E.; ROUSSELLE, P. The Human Epidermal Basement Membrane: A Shaped and Cell Instructive Platform That Aging Slowly Alters. **Biomolecules** 2020 Nov 27;10(12):1607. doi: 10.3390/biom10121607. PMID: 33260936; PMCID: PMC7760980.

ROLLIN, B. E. Scientific autonomy and the 3Rs. **The American Journal of Bioethics** 2009 Dec;9(12):62-4. doi: 10.1080/15265160903234094. PMID: 20013506.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. *The Principles of Humane Experimental Technique*. London, UK: Methuen. 1959.

SAGUIE, B. O.; MARTINS, R. L.; FONSECA, A. S. D.; ROMANA-SOUZA, B.; MONTE-ALTO-COSTA, A. An *ex vivo* model of human skin photoaging induced by UVA radiation compatible with summer exposure in Brazil. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** 2021 Aug;221:112255. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2021.112255. Epub 2021 Jul 8. PMID: 34271412.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry** 1968 Oct 24;25(1):192-205. doi: 10.1016/0003-2697(68)90092-4. PMID: 4973948.

SHIN, J. W.; KWON, S. H.; CHOI, J. Y.; NA, J. I.; HUH, C. H.; CHOI, H. R.; PARK, K. C. Molecular Mechanisms of Dermal Aging and Antiaging Approaches. **International Journal of Molecular Sciences** 2019 Apr 29;20(9):2126. doi: 10.3390/ijms20092126. PMID: 31036793; PMCID: PMC6540032.

SIRIVIBULKOVIT, K.; NOUANTHAVONG, S.; SAMEENOI, Y. Paper-based DPPH Assay for Antioxidant Activity Analysis. **Analytical Sciences** 2018;34(7):795-800. doi: 10.2116/analsci.18P014. PMID: 29998961.

SORUSHANOVA, A.; DELGADO, L. M.; WU, Z.; SHOLOGU, N.; KSHIRSAGAR, A.; RAGHUNATH, R.; MULLEN, A. M.; BAYON, Y.; PANDIT, A.; RAGHUNATH, M.; ZEUGOLIS, D. I. The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. **Advanced Materials** 2019 Jan;31(1):e1801651. doi: 10.1002/adma.201801651. Epub 2018 Aug 20. PMID: 30126066.

- SUN, T.; MCMINN, P.; COAKLEY, S.; HOLCOMBE, M.; SMALLWOOD, R.; MACNEIL, S. An integrated systems biology approach to understanding the rules of keratinocyte colony formation. **Journal of the Royal Society Interface** 2007 Dec 22;4(17):1077-92. doi: 10.1098/rsif.2007.0227. PMID: 17374590; PMCID: PMC2396345.
- SZOLTYSEK, K.; WALASZCZYK, A.; JANUS, P.; KIMMEL, M.; WIDLAK, P. Irradiation with UV-C inhibits TNF- $\alpha$ -dependent activation of the NF- $\kappa$ B pathway in a mechanism potentially mediated by reactive oxygen species. **Genes to Cells** 2017 Jan;22(1):45-58. doi: 10.1111/gtc.12455. Epub 2016 Dec 15. PMID: 27976481.
- TANAKA, Y.; UCHI, H.; FURUE, M. Antioxidant cinnamaldehyde attenuates UVB-induced photoaging. **Journal of Dermatological Science** 2019 Dec;96(3):151-158. doi: 10.1016/j.jdermsci.2019.11.001. Epub 2019 Nov 6. PMID: 31735467.
- THULABANDU, V.; CHEN, D.; ATIT, R. P. Dermal fibroblast in cutaneous development and healing. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology** 2018 Mar;7(2):10.1002/wdev.307. doi: 10.1002/wdev.307. Epub 2017 Dec 15. PMID: 29244903; PMCID: PMC5814349.
- TROMMER, H.; WARTEWIG, S.; BÖTTCHER, R.; PÖPPL, A.; HOENTSCH, J.; OZEGOWSKI, J. H.; NEUBERT, R. H. The effects of hyaluronan and its fragments on lipid models exposed to UV irradiation. **International Journal of Pharmaceutics** 2003 Mar 26;254(2):223-34. doi: 10.1016/s0378-5173(03)00033-4. PMID: 12623198.
- VAN LAETHEM, A.; CLAERHOUT, S.; GARMYN, M.; AGOSTINIS, P. The sunburn cell: regulation of death and survival of the keratinocyte. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 2005 Aug;37(8):1547-53. doi: 10.1016/j.biocel.2005.02.015. Epub 2005 Mar 8. PMID: 15896663.
- VARANI, J.; DAME, M. K.; RITTIE, L.; FLIGIEL, S. E.; KANG, S.; FISHER, G. J.; VOORHEES, J. J. Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. **The American Journal of Pathology** 2006 Jun;168(6):1861-8. doi: 10.2353/ajpath.2006.051302. PMID: 16723701; PMCID: PMC1606623.
- VINARDELL, M. P. The use of non-animal alternatives in the safety evaluations of cosmetics ingredients by the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS). **Regulatory Toxicology and Pharmacology** 2015 Mar;71(2):198-204. doi: 10.1016/j.yrtph.2014.12.018. Epub 2014 Dec 31. PMID: 25555996.
- VON KOSCHEMBAHR, A.; YOUSSEF, A.; BÉAL, D.; CALISSI, C.; BOURGART, E.; MARQUES, M.; LECCIA, M. T.; GIOT, J. P.; MAITRE, A.; DOUKI, T. Solar simulated light exposure alters metabolization and genotoxicity induced by benzo[a]pyrene in human skin. **Scientific Reports** 2018 Oct 2;8(1):14692. doi: 10.1038/s41598-018-33031-8. PMID: 30279536; PMCID: PMC6168490.

VOSTÁLOVÁ, J.; CUKR, M.; ZÁLEŠÁK, B.; LICHNOVSKÁ, R.; ULRICHOVÁ, J.; RAJNOCHOVÁ SVOBODOVÁ, A. Comparison of various methods to analyse toxic effects in human skin explants: Rediscovery of TTC assay. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** 2018 Jan;178:530-536. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.12.011. Epub 2017 Dec 9. PMID: 29247925.

VOSTÁLOVÁ, J.; GALANDÁKOVÁ, A.; ZÁLEŠÁK, B.; LICHNOVSKÁ, R.; ČÍŽKOVÁ, K.; ULRICHOVÁ, J.; RAJNOCHOVÁ SVOBODOVÁ, A. Changes in antioxidant, inflammatory and metabolic markers during 1 week cultivation of human skin explants. **Journal of Applied Toxicology** 2019 May;39(5):773-782. doi: 10.1002/jat.3766. Epub 2019 Jan 3. PMID: 30604520.

WAGNER, I.; MATERNE, E. M.; BRINCKER, S.; SÜSSBIER, U.; FRÄDRICH, C.; BUSEK, M.; SONNTAG, F.; SAKHAROV, D. A.; TRUSHKIN, E. V.; TONEVITSKY, A. G.; LAUSTER, R.; MARX, U. A dynamic multi-organ-chip for long-term cultivation and substance testing proven by 3D human liver and skin tissue co-culture. **Lab on a Chip** 2013 Sep 21;13(18):3538-47. doi: 10.1039/c3lc50234a. PMID: 23648632.

WANG, M.; CHARAREH, P.; LEI, X.; ZHONG, J. L. Autophagy: Multiple Mechanisms to Protect Skin from Ultraviolet Radiation-Driven Photoaging. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity** 2019 Dec 13;2019:8135985. doi: 10.1155/2019/8135985. PMID: 31915514; PMCID: PMC6930764.

WANG, P. W.; HUNG, Y. C.; LIN, T. Y.; FANG, J. Y.; YANG, P. M.; CHEN, M. H.; PAN, T. L. Comparison of the Biological Impact of UVA and UVB upon the Skin with Functional Proteomics and Immunohistochemistry. **Antioxidants** (Basel) 2019 Nov 20;8(12):569. doi: 10.3390/antiox8120569. PMID: 31756938; PMCID: PMC6943602.

WANG, X. F.; HUANG, Y. F.; WANG, L.; XU, L. Q.; YU, X. T.; LIU, Y. H.; LI, C. L.; ZHAN, J. Y.; SU, Z. R.; CHEN, J. N.; ZENG, H. F. Photo-protective activity of pogostone against UV-induced skin premature aging in mice. **Experimental Gerontology** 2016 May;77:76-86. doi: 10.1016/j.exger.2016.02.017. Epub 2016 Feb 27. PMID: 26929999.

WU, C. S.; LAN, C. C.; KUO, H. Y.; CHAI, C. Y.; CHEN, W. T.; CHEN, G. S. Differential regulation of nuclear factor-kappa B subunits on epidermal keratinocytes by ultraviolet B and tacrolimus. **Kaohsiung Journal of Medical Sciences** 2012 Nov;28(11):577-85. doi: 10.1016/j.kjms.2012.04.023. Epub 2012 Jul 26. PMID: 23140765.

XU, W.; JONG HONG, S.; JIA, S.; ZHAO, Y.; GALIANO, R. D.; MUSTOE, T. A. Application of a partial-thickness human *ex vivo* skin culture model in cutaneous wound healing study. **Laboratory Investigation** 2012 Apr;92(4):584-99. doi: 10.1038/labinvest.2011.184. Epub 2012 Jan 9. PMID: 22231737.

YAAR, M.; GILCHREST, B. A. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. **British Journal of Dermatology** 2007 Nov;157(5):874-87. doi: 10.1111/j.1365-2133.2007.08108.x. Epub 2007 Aug 17. PMID: 17711532.

YOUNG, A. R.; CLAVEAU, J.; ROSSI, A. B. Ultraviolet radiation and the skin: Photobiology and sunscreen photoprotection. **Journal of the American Academy of Dermatology** 2017 Mar;76(3S1):S100-S109. doi: 10.1016/j.jaad.2016.09.038. Epub 2016 Dec 27. PMID: 28038885.

ZHOU, B. R.; MA, L. W.; LIU, J.; ZHANG, J. A.; XU, Y.; WU, D.; PERMATASARI, F.; LUO, D. Protective Effects of Soy Oligopeptides in Ultraviolet B-Induced Acute Photodamage of Human Skin. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity** 2016;2016:5846865. doi: 10.1155/2016/5846865. Epub 2016 Jul 12. Retraction in: *Oxid Med Cell Longev*. 2020 Aug 28;2020:8265810. Erratum in: *Oxid Med Cell Longev*. 2018 Jan 10;2018:3871280. PMID: 27478534; PMCID: PMC4960338.

## ANEXOS

## ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA  
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



OFÍCIO Nº 3460/2018  
CEP/MGV

RIBEIRÃO PRETO, 06 DE DEZEMBRO DE 2018

PREZADOS SENHORES,

O TRABALHO INTITULADO “**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E APLICAÇÃO DO MODELO DE PELE HUMANA EX VIVO (HOSEC) PARA ESTUDOS DE FOTOENVELHECIMENTO A LONGO PRAZO**”, FOI ANALISADO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SUA 482ª REUNIÃO ORDINÁRIA, REALIZADA EM 03/12/2018 E ENQUADRADO NA CATEGORIA: **APROVADO**, BEM COMO O BIORREPOSITÓRIO E O TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO – VERSÃO 1, DE 23/10/2018, DE ACORDO COM O PROCESSO HCRP Nº 11290/2018.

*DE ACORDO COM CARTA CIRCULAR Nº 003/2011/CONEP/CNS, DATADA DE 21/03/2011, O SUJEITO DE PESQUISA OU SEU REPRESENTANTE, QUANDO FOR O CASO, DEVERÁ RUBRICAR TODAS AS FOLHAS DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE – APONDO SUA ASSINATURA NA ÚLTIMA DO REFERIDO TERMO; O PESQUISADOR RESPONSÁVEL DEVERÁ DA MESMA FORMA, RUBRICAR TODAS AS FOLHAS DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE – APONDO SUA ASSINATURA NA ÚLTIMA PÁGINA DO REFERIDO TERMO.*

*ESTE COMITÊ SEGUE INTEGRALMENTE A RESOLUÇÃO Nº 466/12 CNS/MS. LEMBRAMOS QUE DEVEM SER APRESENTADOS A ESTE CEP, O RELATÓRIO PARCIAL E O RELATÓRIO FINAL DA PESQUISA.*

ATENCIOSAMENTE.

**DR. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA**  
COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM  
PESQUISA DO HCRP E DA FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores  
**MÁRCIA APARECIDA RAMOS LOPES**  
**PROF.DR.MARCO ANDREY CIPRIANI FRADE(ORIENTADOR)**  
Depto. de Clínica Médica

## **ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para guarda de material biológico**

**Título da pesquisa:** Avaliação da viabilidade e aplicação do modelo de pele humana *ex vivo* (hOSEC) para estudos de fotoenvelhecimento

**Pesquisadores responsáveis:** Márcia Aparecida Ramos Lopes / Orientador: Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade – (16) 3315-3374 / 98181-8513 / 3602-2441

O (a) senhor (a) está sendo convidado (a) a participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte deste estudo, assine ao final deste documento em duas vias. Caso o (a) senhor (a) não aceite participar da pesquisa, não será penalizado (a) de forma alguma e seu atendimento não será prejudicado na Instituição.

O objetivo da pesquisa é padronizar um modelo de cultura de pele humana, ou seja, manter um fragmento de pele humana em um frasco contendo nutrientes necessários para manter a viabilidade do tecido. Esse fragmento de pele será usado para estudar o fotoenvelhecimento.

Ao decidir participar e assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), o senhor (a) receberá uma via do TCLE assinado e rubricado em todas as páginas pelo senhor (a) e pelo pesquisador responsável e assim estará cedendo um fragmento de tecido de aproximadamente 15 cm<sup>2</sup>. Os fragmentos de tecido serão colocados em um vidro com soro fisiológico e levados para o laboratório sob responsabilidade do pesquisador. No laboratório, o fragmento será lavado e limpo, e pequenos pedaços da pele serão colocados em cultura dentro de uma estufa, e ao final do experimento os fragmentos serão descartados.

O (a) senhor (a) está ciente que o risco dessa pesquisa é mínimo e se diz respeito a quebra de sigilo ou confidencialidade dos dados, porém, o pesquisador tomará todas as medidas para que isso não aconteça. Como benefício indireto, o (a) senhor (a) está contribuindo com a doação da sua pele (que seria descartada na cirurgia), visando inovar os estudos de fotoenvelhecimento com métodos alternativos ao uso de animais. Sua participação nesta pesquisa é voluntária e o (a) senhor (a)

tem liberdade para deixar de participar a qualquer momento, apenas entrando em contato com algum dos pesquisadores.

Será mantido sigilo absoluto dos dados obtidos individualmente neste estudo, para assegurar a privacidade dos participantes. Caso o (a) senhor (a) se sinta prejudicado (a) em participar desta pesquisa, o (a) senhor (a) poderá buscar indenização de acordo com as normas vigentes no país.

Os pesquisadores estarão disponíveis para qualquer dúvida, a qualquer momento, durante o estudo e o (a) senhor (a) tem a garantia de acesso aos resultados da pesquisa.

Um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é composto por um grupo de pessoas que são responsáveis por supervisionarem pesquisas que utilizam material humano, que estão sendo feitas na instituição, e tem a função de proteger e garantir os direitos, a segurança e o bem-estar de todos os participantes de pesquisa que se voluntariam a participar da mesma. O CEP do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto está localizado no Subsolo do Hospital e funciona das 8:00 às 17:00. O telefone de contato é o (16) 3602-2228, portanto, caso tenha dúvidas sobre aspectos éticos desta pesquisa, o (a) senhor (a) também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Esta pesquisa está vinculada ao biorrepositório “Fotoenvelhecimento” criado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP com o objetivo de guardar amostras de pele para fins de pesquisa e análise científica, visto que esses fragmentos seriam desprezados após a cirurgia. Gostaríamos de convidá-lo (a) a autorizar a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização do material biológico humano de pele para fins de pesquisa e análise científica.

Este material será coletado durante a cirurgia plástica. Após coletado será guardado em biorrepositório, no Laboratório de Cicatrização e Hanseníase da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP/SP – Av. Bandeirantes, 3900 – Monte Alegre – telefone: (16) 3315-3374, onde as amostras serão armazenadas por 60 dias. Os pesquisadores responsáveis pela equipe se comprometem a identificar as amostras e os dados coletados de modo que garanta o seu sigilo e a sua confidencialidade, para isso a sua amostra de tecido será identificada por meio de números.

Quanto ao material, será coletado aproximadamente 15 cm<sup>2</sup>. Não haverá riscos em decorrência da coleta uma vez que, após a cirurgia, a amostra seria descartada. Sua participação é voluntária, tendo liberdade de aceitar ou não que sua amostra seja guardada, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhe for prestado. O (a) senhor (a) também tem o direito de retirar seu consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado a qualquer momento.

Solicitamos também os dados de contato do (a) senhor (a), para que seja possível encontrá-lo (a) posteriormente. Através dos contatos, garantimos fornecer as informações de seu interesse, além de receber eventuais benefícios provenientes do estudo com seu material biológico. Também solicitaremos sua autorização, se necessário, para o descarte do material armazenado caso não haja necessidade de uso para a pesquisa científica.

Declaramos para os devidos fins que a cada nova pesquisa o (a) senhor (a) será contatado para a utilização do seu material biológico armazenado neste biorrepositório, e também a nova pesquisa será submetida à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucional e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Solicitamos seus dados de contato e sua assinatura, tendo recebido as informações acima, para confirmação de aceitação de participação. Também afirmamos que uma via deste documento, devidamente assinada e rubricada, será entregue ao (a) senhor (a).

**Dados do participante:**

Nome: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_,

Endereço: \_\_\_\_\_, nº \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

Abaixo também seguem os dados de contato do pesquisador responsável, caso o (a) senhor (a) tenha alguma dúvida posteriormente.

Nome do participante: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Nome do pesquisador: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

**Dados do responsável legal ou testemunha (caso aplicável):**

Nome legível: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_