

MÁRIO MÚCIO MAIA DE MEDEIROS

**Efeitos *in vitro* da papaína em fibroblastos humanos oriundos de
pele**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Cesar Isaac

São Paulo

2021

MÁRIO MÚCIO MAIA DE MEDEIROS

**Efeitos *in vitro* da papaína em fibroblastos humanos oriundos de
pele**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Cesar Isaac

(VERSÃO CORRIGIDA: Resolução CoPGr 6018/11, de 1º /11/2011)

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Medeiros, Mário Múcio Maia de
Efeitos in vitro da papaína em fibroblastos
humanos oriundos de fragmento de pele / Mário Múcio
Maia de Medeiros. -- São Paulo, 2021.
Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Clínica Cirúrgica.
Orientador: Cesar Isaac.

Descritores: 1.Papaína 2. Alfa 1-antitripsina
3.Fibroblastos 4.Colágeno 5.Cicatrização 6.Cultura
celular

USP/FM/DBD-389/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Ao meu grande amigo e professor Prof. Dr. Carlos Pagliosa Neto, que me mostrou como chegar até aqui, ensinando não só ciência, mas também, valores inestimáveis que tornaram possível a caminhada e que levarei comigo para sempre. Muito obrigado!

Agradecimentos

À Deus, que mais uma vez me fortaleceu para chegar ao fim desse desafio, por me mostrar os caminhos da vida. Obrigado, meu Deus por me capacitar e trazer esta vitória para a minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. César Issac, pela confiança depositada em mim e pela força, nos momentos em que me faltava, aumentando a minha admiração e a persistência para continuar lutando em busca da realização deste sonho.

Às minhas colegas de Doutorado: Dra. Silvana Cereijido Altran, que respeitosamente aceitou os meus limites e foi capaz de me ajudar a superá-los, sendo essencial nesta conquista e a Dra. Júlia Teixeira Nicolosi, por estar sempre à disposição me ajudando com os meus desafios.

À Divisão de Cirurgia Plástica e Queimaduras do Hospital das Clínicas/Universidade de São Paulo, especialmente na pessoa do Dr. Rolf Gemperli por possibilitar a realização deste trabalho.

À Eliane Falconi Monico Gazetto, pelo acolhimento, dedicação a pós-graduação e por tantas vezes em nossas intermináveis conversas ter me mostrado o poder da oração e do sentido da palavra gratidão. Gratidão a você, minha querida amiga.

Aos meus colegas do Serviço de cirurgia plástica do Hospital Belo Horizonte, pela ajuda indispensável e compreensão durante estes anos de estudos.

Aos meus amigos e familiares que me apoiaram e me acompanharam nessa batalha e sofreram com a minha ausência física e afetiva, perdoem-me.

À Dra. Débora Levy e à Dra. Walcy Rosolia Teodoro, pela gentileza e paciência em compartilhar seus conhecimentos, exercendo magistralmente o ofício de ensinar, possibilitando a conclusão deste trabalho. Agradeço também, aos demais colaboradores do LIM 31 e do LIM 17, sempre dispostos a ajudar.

Ao LIM 04, em especial ao Bruno Valério do Rosário, Edna Maria Rodrigues dos Santos, Roqueline Alves Lago, Renata Oliveira da Conceição, Silvana Aparecida Biagioni, pela ajuda sempre carinhosa.

À equipe médica e à equipe de enfermagem do ambulatório de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas/Universidade de São Paulo, pela gentileza e profissionalismo com que me receberam.

À equipe do instituto de ciências biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG), principalmente ao Prof. Dr. Carlos Delfin Cháves-Olórtegui e a Dra. Fernanda Costal Oliveira pela troca de experiências e ajuda fundamental ao direcionamento desse trabalho.

Ao Me. Túlio Gabriel Corazza, pela disponibilidade, paciência e ensinamentos fundamentais a execução desse trabalho.

“Tudo posso naquele que me fortalece.”

Filipenses 4:13.

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1. Introdução	2
1.1 Definição e etiologia.....	2
1.2 Classificação.....	2
1.2.1 Agente causal.....	3
1.2.2 Grau de contaminação.....	3
1.2.3 Comprometimento tecidual.....	4
1.3 Cura da ferida	4
1.4 Tratamentos.....	10
1.4.1 Papaína.....	10
2. Objetivos	18
3. Métodos.....	20
3.1. Tipo de estudo	20
3.2. Procedimentos éticos.....	20
3.3. Local do estudo.....	20
3.4. População e coleta de amostras.....	21
3.5. Padronização do Cultivo de Fibroblastos de Pele	21
3.6 Caracterização dos NHFs.....	23
3.7 Ensaio de tempo de duplicação celular (Doubling Time) de fibroblastos.....	24
3.8 Teor de pureza da papaína por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE).....	25
3.9 Cálculo da dose de papaína para ensaios <i>in vitro</i>	25
3.10 Teste de Viabilidade e Citotoxicidade Celular por MTT	26
3.11 Teste de adesão celular à superfície de cultivo com Alfa-1 antitripsina.....	28
3.12 Metabolismo Celular por Imunofluorescência indireta para detecção de síntese de colágeno I.....	31
3.13 Análises estatísticas	31
4. Resultados.....	34
4.1 Obtenção de fibroblastos de pele não cicatricial – NHF.....	34

4.2 Caracterização dos NHFs por imunofluorescência indireta – vimentina, colágeno do tipo I	34
4.3 Ensaio de tempo de duplicação celular de fibroblastos	35
4.4 Teor de pureza da papaína por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) - Avaliação Massa Molecular	35
4.5 Cálculo da dose de papaína para ensaios <i>in vitro</i>	36
4.6 Teste de Viabilidade e Citotoxicidade Celular por MTT	37
4.7 Ensaio de adesão celular à superfície de cultivo - Alfa-1 antitripsina	39
4.8 Síntese de colágeno do tipo I - Imunofluorescência indireta	41
5. Discussão	45
6. Conclusão	52
7. Anexos	54
8. Referências	61

Lista de abreviaturas

AAT	Alfa-1 Antitripsina
BSA	Bovine serum albumine
DDT	Dithiothreitol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sulfóxido
MEC	Matriz Extracelular
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide)
NHF	Normal Human Fibroblasts
SAS	Statistical Analysis System
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
IL-1 β	Interleucina 1 Beta
I6	Interleucina 6
MIP-1	Proteína Inflamatória de Macrófagos - 1
MIP-2	Proteína Inflamatória de Macrófagos - 2
MCP-1	Proteína Quimiotática de Monócitos – 1
mRNA	RNA mensageiro
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
TGF- β	Fator Transformador do Crescimento – beta
CYS 25	Aminoácido cisteína
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
His 159	Histidina

Asp 158 Ácido Aspártico

Asn 175 Asparagina

MMPs Metaloproteinases

TIMPs Inibidores teciduais de metaloproteinases

Lista de figuras

- Figura 1 - Fases da cicatrização e a deposição dos componentes da matriz cicatricial ao longo do tempo (Adaptado de Broughton et al.)7
- Figura 2 - Representação gráfica da resposta normal da pele a feridas, mostrando o número relativo das principais células durante as três fases do processo de cicatrização (adaptado de Gray et al.²¹).9
- Figura 3 - A- Configuração tridimensional da papaína, na qual estão representados os dois domínios da cadeia principal (em verde) e o sítio catalítico ao meio (em azul). B - . Configuração tridimensional da papaína, na qual está representada a cisteína 25 do sítio ativo da papaína. (Capucho,2007)³⁰12
- Figura 4 - Cultura primária dos fibroblastos humanos. (A) Fragmento de pele sendo submetido ao explante. (B) Frasco de cultura contendo os fragmentos de pele. (C) Imagem microscópica dos fibroblastos migrando a partir dos fragmentos de pele ...23
- Figura 5 - Distribuição dos fibroblastos (CO) e das diluições feita com a papaína(P) e com a Alfa-1 antitripsina e suas respectivas concentrações na placa de cultivo29
- Figura 6 - Distribuição dos fibroblastos (CO) e das diluições feita com a papaína(P) e com a Alfa-1 antitripsina e suas respectivas concentrações na placa de cultivo.....30
- Figura 7 - Imagem representativa de fibroblastos de pele normal (NHF) M.O. 100X34
- Figura 8 - Imagem representativa de fluorescência da sinalização para: (A) Vimentina, (B) Colágeno tipo I por NHF após 72h. de cultivo em meio padrão (D10)35
- Figura 9 - A) – Mostra a tabela dos valores em KDa, (B) localização da precipitação ideal da Papaína e (C) nossa substância, papaína, confirmando a precipitação em 23KDa36
- Figura 10 - Citotoxicidade da papaína livre em fibroblastos humanos em 24 e 48 horas. os dados representam média \pm desvio padrão de três ensaios independentes. (**p < 0,001 e *p < 0,05 vs. controle positivo seguido de análise de variância one-way anova e teste de bonferroni). cp: controle positivo (1% (v/v) de tritontm x-100)37
- Figura 11 - Viabilidade de NHFs expostos as concentrações de papaína (0,1%, 0,075%, 0,05%) em comparação ao controle (CO) ao longo de 24h. Valores expressos em absorbância (Abs)38
- Figura 12 - Viabilidade de NHFs expostos as concentrações de papaína (0,1%, 0,075%, 0,05%) em comparação ao controle (CO) ao longo de 48h. Valores expressos em absorbância (Abs)39

Figura 13 - Primeira coluna - Concentrações de papaína adicionadas aos fibroblastos. Segunda coluna- Concentrações de papaína adicionadas aos fibroblastos colocadas junto com a Alfa-1 antitripsina. Terceira coluna- As concentrações de papaína adicionadas aos fibroblastos colocadas duas horas após ter colocado a Alfa-1 antitripsina. Controle - representa os fibroblastos sem adição de papaína e Alfa-1 antitripsina adicionada aos fibroblastos40

Figura 14 - Expressão de colágeno tipo I frente à exposição de diferentes concentrações de papaína sendo: controle, papaína a 0,05%, papaína a 0,025%, papaína a 0,0125%. Em 24 e 48 horas41

Figura 15 - Avaliação da expressão de colágeno tipo I frente a exposição das diferentes concentrações de papaína, por um período de 24 horas, sendo: (C2) controle, (C5) concentração de papaína de 0,05%, (C7) concentração de papaína de 0,025%, (C9) concentração de papaína de 0,0125%42

Figura 16 - Avaliação da expressão de colágeno tipo I frente a exposição as diferentes concentrações de papaína, no período de 48 horas, sendo (C3) controle, (C5) concentração de papaína de 0,05%, (C6) concentração de papaína de 0,025%, (C8) concentração de papaína de 0,0125% 43

Resumo

Medeiros MMM. *Efeitos in vitro da papaína em fibroblastos humanos oriundos de pele* [tese]. São Paulo: Faculdade de medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

Feridas cutâneas são consideradas um problema de saúde pública, devido ao impacto psicológico, social e econômico que causam. Seu tratamento é dinâmico e depende da evolução das fases da reparação tecidual. Dentro do conceito de curativos contendo princípios ativos, um dos produtos mais utilizados é a papaína uma complexa mistura de enzimas proteolíticas e peroxidases, que causam a proteólise e degradação de proteínas do tecido desvitalizado. Vários estudos tentam quantificar a dose ideal para que a papaína exercesse efeito estimulante no processo de cicatrização, porém, sem sucesso. Assim, em nosso estudo pretendemos avaliar os efeitos de diferentes concentrações de papaína em cultura de fibroblastos de pele, avaliando a capacidade de proliferação e viabilidade celular, citotoxicidade e metabolismo celular pela expressão de colágeno tipo I. Para tanto estabelecemos a IC₅₀ da papaína na cultura de fibroblastos aproximadamente 57µM em 24 horas e 87µM em 48 horas. Com doses inferiores à IC₅₀ realizamos nossos ensaios. Soluções de papaína à 0,075%, 0,05% mostraram-se não tóxicas, porém sem efeito proliferativo celular. Papaína nas concentrações de 0,05%, 0,025% e 0,0125%. também não apresentaram estímulo na síntese de colágenos quando comparadas ao controle. Assim pudemos concluir que não existe correlação direta entre doses de utilização clínica da papaína e doses *in vitro*. Efeitos pró-cicatrizantes observados clinicamente não ocorrem à custa de estímulo direto sobre fibroblastos.

Descritores: Papaína; Alfa 1-antitripsina; Fibroblastos; Colágeno; Cicatrização; Cultura celular.

Abstract

Medeiros MMM. *In vitro effects of papain on human skin fibroblasts* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de medicina, Universidade de São Paulo"; 2021.

Wounds are a public health problem due to the psychological, social and economic impact they cause to the patients. The treatment is dynamic and depends on the evolution of the tissue repair phases. Within the concept of dressings containing active principles, one of the most used products is papain, a complex mixture of proteolytic enzymes and peroxidases, which cause proteolysis and degradation of proteins in devitalized tissue. Several unsuccessful studies have tried to quantify the ideal dose of papain to exert a stimulatory effect on the healing process. Thus, in our study, we aimed to evaluate the *in vitro* effects of different concentrations of papain on skin fibroblast, analyzing the capacity of cell proliferation and viability, cytotoxicity and cell metabolism through the expression of type I collagen. For this purpose, we established the IC₅₀ of papain in the culture of fibroblasts approximately 57µM in 24 hours and 87µM in 48 hours. With doses below the IC₅₀ we performed our tests. Papain solutions at 0.075%, 0.05% proved to be non-toxic, but without cell proliferative effect. Papain at concentrations of 0.05%, 0.025% and 0.0125% did not show stimulation in collagen synthesis when compared to the control. Thus, we were able to conclude that there is no direct correlation between clinical doses of papain and *in vitro* doses. Pro-healing clinical effects do not occur at the expense of direct stimulation on fibroblasts.

Descriptors: Papain; Alpha 1-antitrypsin; Fibroblasts; Collagen; Wound healing; Cell culture

1. Introdução

1. Introdução

O interesse da medicina pelos cuidados com a perda de integridade do tegumento cutâneo vem desde a antiguidade¹.

As, assim denominadas, feridas cutâneas são consideradas um problema de saúde pública, devido ao impacto psicológico, social e econômico que causam tanto aos pacientes quanto às suas famílias².

Os custos para o sistema de saúde também são altos e crescentes, atingindo pessoas, independentemente do gênero, idade ou etnia³.

1.1 Definição e etiologia

Define-se ferida como uma interrupção na continuidade de tecidos biológicos, causada principalmente por traumas: mecânico, térmico, químico, pela presença de agentes bacterianos, ou ainda desencadeada por afecções clínicas. Tais lesões são representadas não apenas pela ruptura da pele e do tecido celular subcutâneo, mas também, em alguns casos, por lesões em músculos, tendões e ossos⁴.

1.2 Classificação

Feridas podem ser classificadas de três formas diferentes de acordo com: o agente causal, o grau de contaminação e o comprometimento tecidual⁵.

1.2.1 Agente causal

- Incisas ou cirúrgicas: são produzidas por um instrumento cortante. As feridas limpas são geralmente fechadas por suturas. Agentes: faca, bisturi, lâmina, etc⁵.
- Contusas: são produzidas por objeto rombo e caracterizadas por traumatismo das partes moles, hemorragia e edema⁵.
- Lacerantes: São ferimentos com margens irregulares e com mais de um ângulo. O mecanismo da lesão é por tração: rasgo ou arrancamento tecidual. Um exemplo clássico é a mordedura de cão⁵.
- Perfurantes: são caracterizadas por pequenas aberturas na pele. Há um predomínio da profundidade sobre o comprimento. Exemplos: bala ou ponta de faca⁵.

1.2.2 Grau de contaminação

As feridas podem ser limpas, limpa-contaminadas, contaminadas e infectadas⁵.

- Limpas: são as que não apresentam sinais de infecção e em que não são atingidos os tratos respiratório, digestivo, genital ou urinário. Probabilidade de infecção é baixa, em torno de 1 a 5 %. Exemplo: feridas produzidas em ambiente cirúrgico⁵.
- Limpas-contaminadas: são os ferimentos que apresentam contaminação grosseira, em acidente doméstico por exemplo ou em situações cirúrgicas em que houve contato com os tratos respiratório, digestório, urinário e genital, porém em situações controladas. O risco de infecção é cerca de 10%⁵.
- Contaminadas: são consideradas contaminadas as feridas acidentais, com mais de seis horas de trauma ou que tiveram contato com terra e fezes, por exemplo.

No ambiente cirúrgico são consideradas contaminadas as em que a técnica asséptica não foi devidamente respeitada. Os níveis de infecção podem atingir 20 a 30% (cirurgia dos cólons)^{5,6}.

- Infectadas: são aquelas que apresentam sinais nítidos de infecção⁶.

1.2.3 Comprometimento tecidual

- Estágio I: comprometimento da epiderme⁵.
- Estágio II: perda tecidual e comprometimento da epiderme, derme ou ambas⁵.
- Estágio III: comprometimento total da pele e necrose de tecido subcutâneo, entretanto não atinge a fáscia muscular⁵.
- Estágio IV: extensa destruição de tecido, chegando a ocorrer lesão óssea ou muscular ou necrose tissular⁵.

1.3 Cura da ferida

Uma vez instalada a solução de continuidade da barreira cutânea, haverá uma resposta fisiológica para resolução dessa situação. O resultado dessa reparação depende da profundidade do trauma⁷. O processo de cicatrização de feridas envolve uma série de eventos celulares e bioquímicos que acabam por levar a reparação dos tecidos⁸.

Esses eventos são definidos classicamente como hemostasia, inflamação, proliferação, epitelização, maturação e remodelação do tecido cicatricial. Importante para o processo de cicatrização é o envolvimento de fatores de crescimento endógenos, citocinas e proteases em cada um desses eventos. O conhecimento atual destes, em cada estágio da cicatrização, bem como os aspectos bioquímicos das

feridas, sugere que existe um grande potencial desses agentes para melhorar a qualidade e o tempo de cicatrização de uma ferida, particularmente uma ferida crônica⁹.

O termo citocinas refere-se a um grupo heterogêneo de proteínas que exercem suas ações nas células-alvo por meio de interações com os receptores da superfície celular, os fatores de crescimento são sintetizados e liberados por muitos tipos celulares¹⁰. Depois que um fator de crescimento é liberado, ele pode: agir na mesma célula que a produziu (estimulação autócrina), atuar em células adjacentes à célula produtora (estimulação parácrina), entrar na circulação a ser transportada para as células que estão distantes da célula produtora (estimulação endócrina)¹¹. Para nosso conhecimento atual, existem cinco famílias de fatores de crescimento envolvidos na cicatrização de feridas e exercem uma influência importante no processo de reparo tecidual, dentre elas: atrair outras células para a área da ferida (quimiotaxia), induzir proliferação celular (mitose), estimular a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) e regular a síntese e degradação do extracelular matriz (MEC)^{10,12}.

A lesão na pele desencadeia uma cascata organizada de células e eventos bioquímicos que acabam por levar à restauração da integridade da pele⁸.

A cicatrização de feridas é um processo fisiológico altamente complexo, que envolve a interação de vários tipos celulares e componentes bioquímicos, que conduzem a cascata de cicatrização até o reparo final. Além desses componentes, várias vias enzimáticas também se tornam ativas durante o reparo e ajudam na cicatrização¹³.

Entre os fatores implicados no controle do processo de cicatrização, a matriz extracelular (MEC), que é feita de colágeno e fibras elásticas, dispersos numa substância amorfa de glicosaminoglicanos, proteoglicanos e glicoproteínas do tecido

conjuntivo, é capaz de modular a reparação de feridas, regulando aspectos importantes do comportamento celular, como adesão, migração e proliferação, exercendo um importante papel e não apenas com relação ao suporte arquitetônico para os tecidos, mas também, na regulação celular^{14,15}.

Conforme apontado por Richard Clark¹³, o coágulo de fibrina por si só constitui uma matriz extracelular provisória, composta de 95% de fibrina e muitos outros componentes, principalmente fibronectina. Esses componentes podem suportar a migração celular necessária para a cicatrização de feridas, mas também desencadeia o processo de inflamação. Por exemplo, a própria fibrina induz a secreção de IL-8 pelas células endoteliais e de TNF α , IL1 β , IL-6, MIP-1, MIP-2 e MCP-1 por células mononucleares¹⁶.

Dependendo da profundidade da derme residente, os fibroblastos expressam diferentes quantidades de colágeno e proporções de mRNA de colágeno tipo I e III. Além disso, fibroblastos dentro da derme mais profunda produzem menos colagenase mRNA do que os fibroblastos em camadas mais superficiais¹⁷. O fibroblasto é uma célula maleável, capaz de alterar sua função e fisiologia ou mesmo se transformar em um novo tipo de célula, com base em sua localização dentro do corpo^{15,18}.

Clark em 1993 dividiu o reparo tecidual em três fases: (1) inflamação, (2) formação de tecido de granulação com deposição de matriz extracelular e (3) remodelação. (Figura 1). Segundo ele, estas não são mutuamente excludentes, mas sobrepostas no tempo¹⁵.

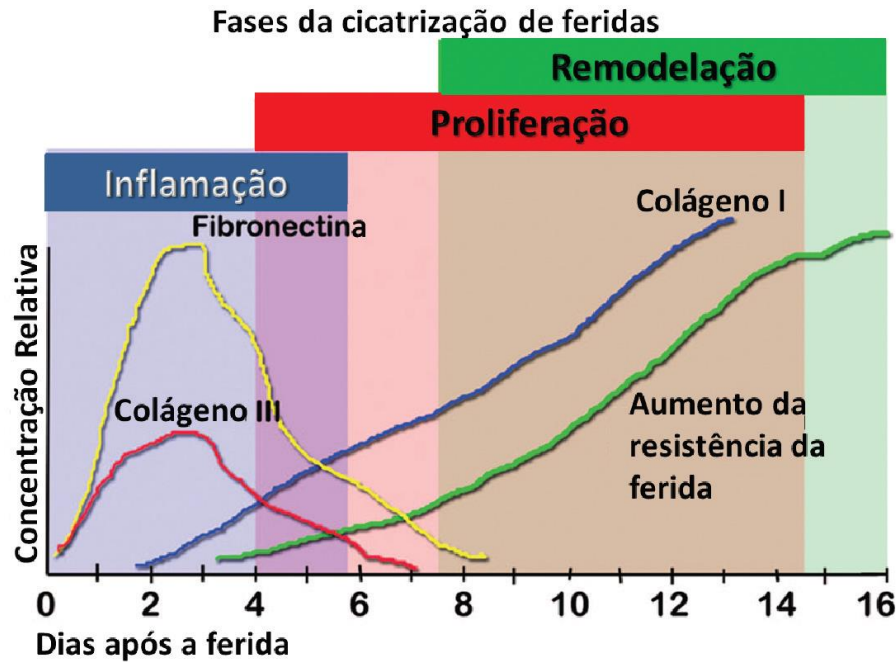


Figura 1 - Fases da cicatrização e a deposição dos componentes da matriz cicatricial ao longo do tempo (Adaptado de Broughton et al)¹⁵.

A hemostasia serve como passo inicial e base para o processo de cicatrização, a inflamação resulta em vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. No entanto, a primeira ação que o corpo realiza imediatamente após o ferimento é controlar o sangramento¹⁵. Os vasos sanguíneos lesados, bem como o endotélio e plaquetas próximas ativam a parte intrínseca da cascata de coagulação^{19,20}. O pico de atividade dos polimorfonucleares ocorre nas primeiras 24-48 horas após o trauma, seguindo-se de um maior aporte de macrófagos durante os dois a três dias seguintes. O macrófago (permanece do terceiro ao sétimo dia), também ativa os elementos celulares das fases subsequentes da cicatrização, tais como fibroblastos e células endoteliais, sendo a célula inflamatória mais importante dessa fase²¹. Essas células, além de suas conhecidas atividades imunes, estão intimamente envolvidas com as reações catabólicas de degradação de tecidos pela produção de proteases e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e também com as reações anabólicas de formação

de tecidos pela produção de fatores de crescimento, responsáveis pela recomposição da celularidade regional ou restabelecimento da sua homeostasia pela formação da cicatriz²².

Na fase de proliferação, que se inicia por volta do 3º dia após a lesão, perdura por 2 a 3 semanas, sendo o marco inicial da formação da cicatriz que se caracteriza por fibroplasia, angiogênese e reepitelização¹⁵.

Nesta fase, a migração e proliferação de fibroblastos dá-se a partir das margens livres da ferida e de células mesenquimais¹³, ao passo que os principais estímulos quimioatraentes e mitogênicos dos primeiros serão o EGF e o PDGF¹⁵. Por outro lado, PDGF e TGF- β induzirão a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos (Figura 2), os quais expressam Alfa-actina, Alfa-miosina e desmina. Estes fibroblastos diferenciados possuem capacidade de se contrair e se expandir, movimentando-se, assim, pela ferida. Durante a movimentação dos miofibroblastos, ocorre deposição de fibronectina sobre o arcabouço de fibrina (Figura 2). A nova estrutura de fibronectina é denominada de fibronexus²³.

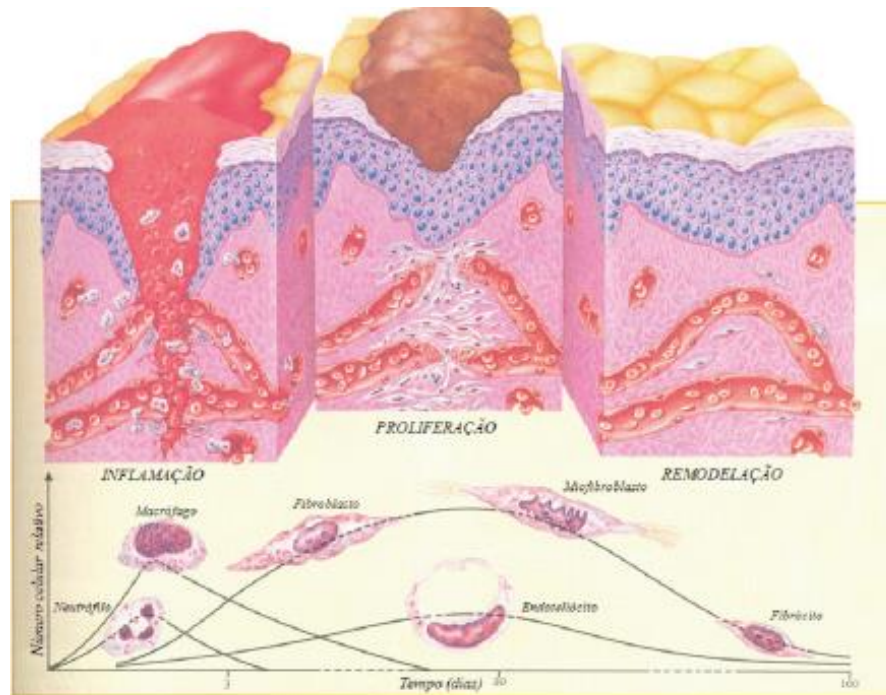


Figura 2 - Representação gráfica da resposta normal da pele a feridas, mostrando o número relativo das principais células durante as três fases do processo de cicatrização (adaptado de Gray et al.²¹).

A migração dessas células cessa pelo contato entre elas, com posterior síntese de membrana basal e moléculas de adesão, além da queda da expressão de substâncias pró-migração (ativador de plasminogênio, por exemplo)²⁴.

A fase de remodelação ocorre de 3 semanas a 1 ano após a lesão. É caracterizada por contração da ferida e remodelação do colágeno. O processo mais marcante nessa fase é a substituição do colágeno tipo III em tipo I^{25,26}.

Quando algum fator intrínseco ou extrínseco interfere nesse desencadear de eventos, o processo de cicatrização não se completará gerando a necessidade de interferência especializada para a resolução dessa ferida²⁷.

1.4 Tratamentos

O tratamento das feridas é dinâmico e depende da evolução das fases da reparação tecidual. Inclui métodos clínicos, na fase inicial, e cirúrgicos, sendo o curativo, o tratamento mais frequentemente utilizado. Um arsenal terapêutico vasto, composto por coberturas inertes, curativos com princípios ativos e curativos com capacidade de modular a resposta da MEC pode auxiliar no reparo do tegumento em várias situações²⁸.

Dentro do conceito de curativos contendo princípios ativos, um dos produtos mais utilizados é a papaína²⁹, que provém do látex do mamoeiro *Carica papaya*, encontrado comumente no Brasil. Trata-se de uma mistura complexa de enzimas proteolíticas e peroxidases, que causam a proteólise, degradação de proteínas em aminoácidos, do tecido desvitalizado e da necrose, sem alterar o tecido sadio, devido a uma antiprotease plasmática, a Alfa1-antitripsina, uma globulina humana, presente somente no tecido sadio que inativa as proteases, impedindo a degradação do tecido são³⁰.

1.4.1 Papaína

O látex da *Carica papaya* L. é um fluido de aparência leitosa, com comportamento tixotrópico³¹. Ele possui aproximadamente 15% de matéria seca, das quais 40% correspondem a enzimas, principalmente cisteínas endopeptidases, que constituem mais de 80% da fração total de enzimas^{31,32}. A papaína consiste em uma mistura de enzimas proteolíticas, papaína e quimopapaína, essencialmente. Essas enzimas são capazes de hidrolisar polipeptídeos, amidas e ésteres, principalmente

nas ligações envolvendo aminoácidos básicos, leucina ou glicina, produzindo peptídeos de baixo peso molecular³³.

Dentre as diversas endopeptidases presentes neste látex, a papaína é a que se encontra em menor quantidade (aproximadamente 8%); contudo, é a mais facilmente purificada. Foi isolada em forma cristalina a partir do látex fresco pela primeira vez em 1937, sendo o processo aprimorado por Balls e Lineweaver (1939)³⁴.

A papaína é uma tiol-proteinase, classificada como uma cisteína protease da família C1, pertencente à classe das enzimas proteolíticas³⁵, trata-se de uma mistura complexa de enzimas proteolíticas e peroxidases, que provoca a proteólise do tecido desvitalizado, constituída de uma única cadeia polipeptídica contendo 212 resíduos de aminoácidos, com uma massa molecular de 23400 Daltons e um ponto isoelétrico de 9,5³⁶. A molécula da papaína consiste em uma cadeia polipeptídica simples. Light et al.³⁷ foram os primeiros a reportar a sequência de aminoácidos dessa enzima, descrevendo a indicação da posição das ligações dissulfetos na molécula, bem como do grupo sulfidril ativo. A estrutura cristalina tridimensional da papaína indica que a cadeia polipeptídica é dobrada em dois domínios de tamanhos semelhantes, mas com informações completamente diferentes, formando uma fenda sobre a superfície da enzima, onde está localizado o seu sítio ativo (Figura 3A e B)³².

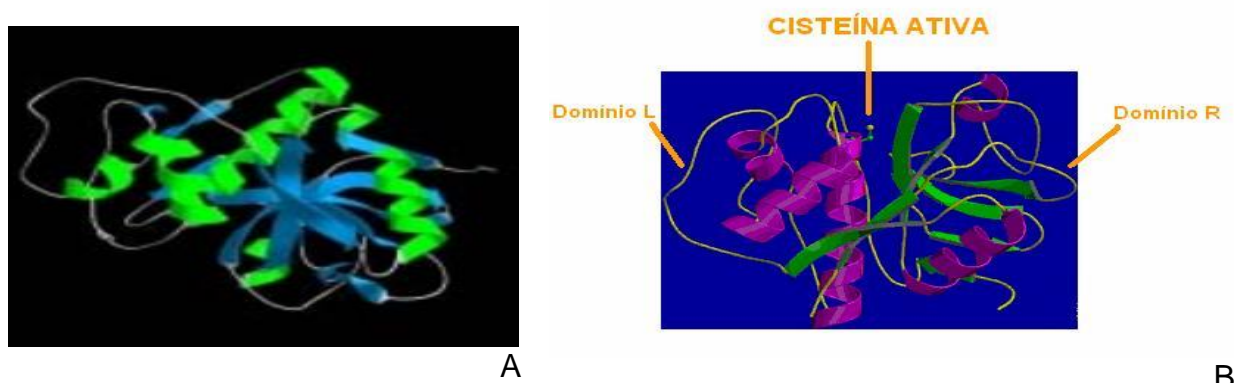


Figura 3 - A- Configuração tridimensional da papaína, na qual estão representados os dois domínios da cadeia principal (em verde) e o sítio catalítico ao meio (em azul). B -. Configuração tridimensional da papaína, na qual está representada a cisteína 25 do sítio ativo da papaína. (Capucho,2007)³²

Na papaína, a parte da cadeia em que se localiza a Cys 25 e His 159 é o sítio ativo da enzima (Figura 3B), e a interação entre esses aminoácidos é responsável pelo mecanismo catalítico sobre o substrato³⁸. Entre os domínios forma-se um profundo vale, onde se encontra o sítio ativo da enzima, composto pelos resíduos cisteína (Cys 25), Histidina (His 159) e ácido aspártico (Asp 158).

O resíduo Cys 25 possui o grupo sulfidríla essencial, que permanece livre na enzima ativa, enquanto outros seis resíduos de cisteína formam entre si pontes de dissulfeto que estabilizam a estrutura terciária da proteína^{39,40}. Os autores Sangeetha e Abraham (2006), entretanto, afirmam que o centro catalítico da enzima é formado por uma tríade composta pelos resíduos de aminoácidos Cys 25, His 159 e Asn 175³⁶.

A distribuição dos aminoácidos ocorre de modo que os resíduos 10-11 e 207-212 estão localizados no domínio L, enquanto os resíduos 1-9 e 12-206 compõem o domínio R, conferindo uma estrutura tridimensional composta por subestruturas conhecidas como alfa-hélices, folhas β -pregueadas, voltas β etc. O resíduo Cys 25 da papaína é posicionado no início da alfa-hélice no domínio L (resíduos 24-42)⁴¹.

A papaína purificada é encontrada sob a forma de um pó higroscópico, de coloração variando desde o branco até o amarelado. Apresenta-se, comercialmente, diluída com lactose ou outros diluentes. Solúvel em água, a papaína origina uma solução incolor ou amarelada, pouco opalescente. É praticamente insolúvel em álcool, clorofórmio e éter e pode ser parcialmente ou completamente inativada quando armazenada a temperatura ambiente por um mês. Devido a essas características, recomenda-se que o armazenamento da papaína obedeça a condições específicas como abrigo de luz, umidade e calor^{33,42,43}.

A utilização da papaína no tratamento de feridas tem sido amplamente estudada quanto à sua ação e ao estabelecimento de protocolos para o tratamento de diversos tipos de lesões. Ela se destaca como uma ótima alternativa para esses tipos de tratamento devido ao seu baixo custo e reduzidos efeitos colaterais⁴⁴⁻⁴⁶.

Papaína promove desbridamento químico, sendo capaz de degradar qualquer proteína que contenha resíduos de cisteína, como é o caso dos fatores de crescimento, pode ainda, ser administrada em diferentes formas farmacêuticas, como pó, gel, creme e soluções nas concentrações de 2 a 5%⁴⁷. Além disso, outras concentrações como as de 1 a 4% podem ser empregadas em tecidos fibrinosos ou de granulação e a de 10% em tecidos necrosados⁴⁸. Normalmente, são utilizadas as concentrações de 2% (p/p), para feridas com tecido de granulação; 4% a 6% (p/p), em feridas com exsudato purulento; e 8 a 10% (p/p), para tecido necrótico^{45,48}.

A papaína costuma ser utilizada como princípio ativo único. Ao contrário do que muitos pensam, a papaína pode ser utilizada durante todas as fases de cicatrização das feridas, variando apenas sua concentração^{49,50}.

Dessa forma, a papaína agiria degradando restos teciduais e constituintes insolúveis do exsudato inflamatório (fibrina, desoxirribonucleoproteínas derivadas dos

núcleos das células mortas ou degeneradas) que resultam em peptídeos, os quais são quimiotáticos para os fibroblastos, estimulando precocemente a fibroplastia⁵¹⁻⁵³. Outras características dessa substância é seu poder anti-inflamatório, bacteriostático e bactericida^{43,53,54}. A papaína atua como um agente de remoção de detritos, sem efeitos nocivos aos tecidos sadios devido à especificidade da enzima e a presença de uma anti-protease plasmática, a Alfa-1 antitripsina, que impede a ação proteolítica da enzima nesses tecidos sãos⁵⁵. Cabe destacar que, se a concentração da enzima superar esta antiprotease, ocorrerá destruição do tecido sadio que poderá ser visualizado através do sangramento e relato de dor pelo paciente. Um estudo demonstrou que os extratos dos frutos da *Carica papaya* (epicarpo, endocarpo e sementes) apresentaram atividade antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Shigella flexineri*, o mesmo não ocorreu com o extrato das folhas, o qual não foi capaz de inibir esses microrganismos⁵⁶.

Ela também é capaz de hidrolisar as ligações peptídicas do colágeno e da queratina na camada córnea da pele^{57,58}. Além de facilitar a cicatrização, ela promove o alinhamento das fibras de colágeno, resultando em um crescimento mais uniforme do tecido e, conseqüentemente, em uma cicatriz mais plana, mais próxima à estrutura original da pele^{32,43,52}.

Isso acontece porque a papaína neutraliza as interações entre os aminoácidos aglomerados em forma espiralar e que se dispõem aleatoriamente, intervindo na ruptura dessas ligações, fazendo com que os aminoácidos se disponham em cadeias lineares, evitando, assim, a formação de cicatrizes queloidianas⁵⁹.

A papaína reduz o pH no leito da ferida, o que estimula a produção de citocinas que promovem a replicação celular e deixam a área desfavorável para o surgimento de microrganismos patogênicos⁶⁰.

A reatividade cruzada entre a papaína e o látex tem sido descrita, sugerindo que os pacientes que apresentam uma reação alérgica ao látex podem ter uma reação semelhante à papaína⁶¹⁻⁶³. Apesar de saber que o mamão possui propriedades curativas, nenhum estudo sistemático foi realizado até o momento sobre o quadro clínico ou avaliação do potencial de cicatrização de feridas com o látex da *Carica papaya*.

O uso da papaína é consagrado na literatura internacional desde a década de 1950^{44,64}. No Brasil, a primeira publicação científica da utilização de papaína no tratamento de feridas foi feita por Monetta⁵⁹, usando inicialmente o fruto in natura e, posteriormente, a solução de papaína em pó.

Vários estudos tentaram quantificar a dose ideal para que a papaína exercesse um efeito estimulatório no processo de cicatrização, dentre eles, Costa, KB⁶⁵ cujo objetivo foi avaliar o efeito da papaína na formação e degradação de matriz extracelular em cultura de fibroblastos humanos tratados com papaína 1%, 2% e 10%, avaliando as metaloproteinases MMP-1, MMP-3 e MMP-9 e inibidores tissulares de metaloproteinases TIMP-1 e TIMP-2, apresentou resultados variados, porém, concluiu que células expostas a papaína 2% mostraram maior expressão de MMPs, mas não de TIMPS, quando comparadas a outras concentrações.

Outro estudo relacionando papaína à cicatrização de feridas mostrou que a solução de papaína a 2% promoveu uma reparação tecidual mais eficaz, atuando nas fases iniciais e de fibroplasia das feridas⁴³.

Em revisão sistemática com o objetivo de analisar as evidências sobre o uso da papaína no processo de cicatrização de feridas, os resultados apontaram a deficiência de um padrão de formas e apresentação para uso do produto, além do predomínio de estudos de baixa qualidade, segundo as escalas internacionais de avaliação, indicando a necessidade de desenvolvimento de pesquisas com maior rigor metodológico para a avaliação mais precisa da efetividade da papaína no processo de reparo tecidual^{3,66}.

Assim, em nosso estudo pretendemos avaliar os efeitos de diferentes concentrações de papaína em cultura de fibroblastos de pele.

2. Objetivos

2. Objetivos

Avaliar o comportamento, *in vitro*, de fibroblastos da pele na presença de papaína, quanto à:

- Capacidade de proliferação e viabilidade celular
- Síntese de colágeno envolvido no processo de cicatrização

3. Métodos

3. Métodos

3.1. Tipo de estudo

Estudo *in vitro*, prospectivo, controlado, não randomizado, não cego.

3.2. Procedimentos éticos

Esse estudo teve aprovação da CONEP/Comitê de Ética e Pesquisa HCFMUSP sob o número: CAAE 35417614.1.1001.0068 (Anexo A).

Antes do início do estudo, o pesquisador explicou às participantes os objetivos e metodologia utilizada na pesquisa, além de prestar esclarecimentos quando foram necessários. A todos os indivíduos convidados a participar do estudo foram assegurados: privacidade, sigilo, ausência de despesas pessoais, disponibilidade da equipe para eventuais esclarecimentos e possibilidade de desvinculação do protocolo a qualquer momento, sem que isso resultasse em prejuízo a continuidade de seu tratamento na instituição. Após serem suficientemente esclarecidas a respeito das informações constantes no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Anexo B) lidas ou ouvidas por elas, e estarem de acordo com elas, os pacientes assinaram o termo com a finalidade de autorizar a doação do tecido para a pesquisa.

3.3. Local do estudo

Esse estudo foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa de Cultura Celular e Cicatrização - Laboratório de Investigação Médica (LIM 04 -HCFMUSP), com colaboração do Laboratório de Genética e Hematologia Molecular (LIM 31), onde foram realizados os ensaios de imunofluorescência e caracterização celular.

3.4. População e coleta de amostras

Fibroblastos oriundos de pele normal (NHF -normal human fibroblasts) foram obtidos a partir de amostras de pele não-cicatricial, doadas por 12 pacientes do gênero feminino de idade entre 20 e 50 anos, sem comorbidades que afetem a cicatrização, como doenças inflamatórias, imunológicas ou metabólicas. As pacientes foram submetidas à mamoplastia redutora de caráter estético realizada no Centro Cirúrgico do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICHC) por cirurgião plástico membro da equipe de cirurgia plástica do Hospital das Clínicas da FMUSP e, a pele excedente que seria desprezada, foi doada ao nosso grupo com intuito exclusivo de pesquisa (Anexo C).

3.5. Padronização do Cultivo de Fibroblastos de Pele

Fibroblastos humanos foram isolados *in vitro*, com base na técnica de explante, proposta por Carrel e Burrows (1911)⁶⁷, com algumas modificações padronizadas pelo nosso grupo⁶⁸, a saber:

Em cabine de segurança biológica, amostras de tecido de pele não cicatricial, foram lavadas e desinfetadas seguindo a sequência de banhos descrita abaixo (PBS → etanol 70% → PBS → etanol 70 % → PBS → PBS).

Já desinfetadas, as amostras foram transferidas para uma placa de Petri contendo solução fisiológica, onde parte da derme reticular foi removida com auxílio de pinça e tesoura.

Em seguida, as amostras foram recortadas em fragmentos de aproximadamente 1mm². Esses fragmentos foram depositados sobre a superfície de

uma garrafa de cultivo (T25), com a face dérmica voltada para baixo. Decorrido o tempo necessário para que os fragmentos aderissem à superfície de cultivo (aproximadamente 2h), adicionamos à garrafa, 5 ml de meio por nós denominado D10, contendo 90% de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium—(Gibco: 12800-017), acrescido de 10% de soro fetal bovino/SFB (Vitrocell/Embriolife: 11), contendo 1% de solução de antibióticos e antifúngico (estreptomicina 100 µg/ml, penicilina 100 UI/ml e anfotericina B 0,25 µg/ml -Gibco: 15240-062) e 1% de L-glutamina -200 mM (Gibco: 25030-081). As culturas foram mantidas em ambiente com temperatura controlada a 37°C e atmosfera de CO₂ a 5%.

A troca de meio de cultivo foi efetuada a cada 72 horas, até que a superfície do frasco de cultivo apresentasse 70% a 80% de confluência celular (aspecto de subconfluência), momento em que foram amplificadas ou congeladas, para realização dos ensaios subsequentes.

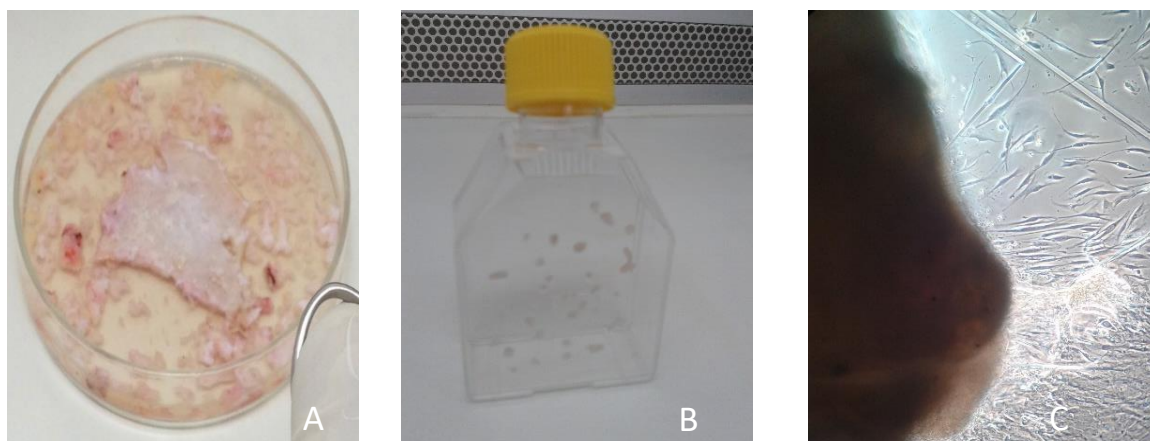


Figura 4 - Cultura primária dos fibroblastos humanos. (A) Fragmento de pele sendo submetido ao explante. (B) Frasco de cultura contendo os fragmentos de pele. (C) Imagem microscópica dos fibroblastos migrando a partir dos fragmentos de pele.

3.6 Caracterização dos NHFs

Vimentina e colágeno são proteínas com funções estruturais e funcionais sabidamente expressas por fibroblastos.

A análise de expressão de vimentina e colágeno do tipo I neste ensaio, visou auxiliar a caracterização dos fibroblastos de pele humana como tais.

Em microplaca preta de fundo chato com 96 poços (Corning 3599), foram semeadas, em meio D₁₀, aproximadamente 4×10^3 NHFs, entre 2^a e 4^a passagem, provenientes de 3 pacientes. A placa foi incubada em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por 48 horas, para que houvesse a adesão das células à superfície dos poços. Passado esse período, o meio D₁₀ foi substituído. As culturas foram então incubadas nas condições mencionadas anteriormente por 72 horas.

As células cultivadas foram então fixadas às placas de cultivo, o que aconteceu com a retirada do meio D₁₀, seguida por duas lavagens dos poços com 100 uL de DPBS (Dulbecco's Tampão Salina Fosfato), adição de paraformaldeído a 4% (Sigma-Aldrich P-6148) e manutenção da placa sob refrigeração (a 4°C) até o momento da análise.

Já fixadas, as células foram permeabilizadas com solução de Triton X-100 a 0,1% (Sigma Aldrich 93443) a 4°C por 15 minutos, lavadas com DPBS e bloqueadas com solução 5% de DPBS (Sigma Aldrich A9418) e, albumina bovina; Sigma A4503) por 40 minutos a temperatura ambiente, sob agitação constante.

Os anticorpos primários: anti-vimentina (utilizando 50µL; Flex Monoclonal mouse anti-vimentin clone 9 – ready to use. Dako IR630), anti-colágeno I (diluição 1:100; (rabbit) antibody - Rockland (600.401.103 - 0.5) foram adicionados aos poços e então, a placa foi mantida sob refrigeração (4°C) por 24 horas.

Após esse período, os poços foram lavados com DPBS e acrescidos de uma solução contendo DPBS + intercalante (Hoechst, Thermo Fisher Scientific 33342, diluição 1:1000 + anticorpo secundário 1:1000). Para vimentina, o anticorpo secundário utilizado foi (R-phycoeritrina goat anti mouse - Invitrogen P852 - 1:1000) e para colágeno do tipo I (Alexa Fluor TM 488 goat anti-rabbit IgG (H+L), Invitrogen/Thermo Fisher Scientific A11008 – 1:1000).

Seguiu-se então novo período de incubação por 1 hora em temperatura ambiente sob agitação constante, após o qual os poços foram lavados com DPBS e mantidos em 100 uL dessa solução para análise feita em equipamento ImageXpress – Molecular Devices. As células positivas e suas respectivas intensidades foram determinadas usando o software MetaXpress – Molecular Devices. Os resultados foram expressos em intensidade de fluorescência.

3.7 Ensaio de tempo de duplicação celular (Doubling Time) de fibroblastos

Esse teste foi realizado na intenção de conhecer o tempo médio de duplicação celular, para NHF e dessa forma, estimar o tempo de estímulos que as células receberiam.

Em placas de 24 poços (Corning Costar 3524) 3 amostras de NHF, foram semeadas (aproximadamente 10×10^3 /poço) em triplicatas. Após a adesão, os fibroblastos foram mantidos em meio de cultura D10. Nos momentos 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas, as células foram soltas dos poços de cultura e contadas em câmara hemocitométrica. Os resultados foram analisados no programa GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc, USA) e expressos em horas.

3.8 Teor de pureza da papaína por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

Eletroforese de papaína foi realizada em gel de poliacrilamida, 15%, em presença de dodecilsulfato de sódio (SDS). Tampão de amostra 2x (5x concentrado: 0,2mM Tris-HCL pH 6,8, 50% glicerol, 5% SDS, 0,25M dithiothreitol (DDT), 250mg azul de bromofenol) foi adicionado às amostras que, em seguida, foram aquecidas a 95°C por 5 minutos. A eletroforese foi realizada segundo o método de Laemmli (LAEMMLI, 1970). Para visualização das bandas o gel foi corado com Coomassie Blue.

3.9 Cálculo da dose de papaína para ensaios *in vitro*

Inicialmente, os fibroblastos humanos foram semeados em microplacas de 96 poços na densidade de $1 \cdot 10^4$ células/poço e incubados por 24 horas.

Após 24 horas, foi preparada a solução de papaína livre ($6000 \text{ USP} \cdot \text{mg}^{-1}$) em meio na concentração inicial de $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($428 \mu\text{M}$) e a partir dessa solução, foram realizadas 7 diluições seriadas. Em seguida, os meios dos poços foram retirados e foi

aplicado 100 µL de cada diluição em sextuplicata e a microplaca foi incubada por 24 ou 48 horas (OECD 129, 2010)⁶⁹. Como controle positivo, utilizada uma solução a 1% (v/v) de Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich®).

Posteriormente, para avaliação da viabilidade celular, utilizou-se o corante MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Thermo Fisher Scientific). O meio de cultura foi retirado, foi aplicado 100 µL da solução de MTT (0,5 mg. mL⁻¹) e as microplacas foram incubadas por 2 horas. Após esse período, a solução de MTT foi retirada e adicionou-se 100 µL de álcool isopropílico gelado (Synth®). Em seguida, as microplacas foram agitadas por 10 minutos para a completa solubilização dos cristais de formazan e a leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro de microplacas (Biotek® modelo Synergy™ HT) no comprimento de onda de 570 nm (MOSMANN, 1983)⁷⁰.

Para determinação de morte celular e, conseqüentemente a IC₅₀ do fármaco, fizemos diluições para as concentrações 0,1%, 0,075% e 0,050% de papaína. Para o estudo do metabolismo celular elegemos doses inferiores à IC₅₀, utilizando, então, concentrações à 0,050%, 0,025% e 0,0125% dessa solução.

3.10 Teste de Viabilidade e Citotoxicidade Celular por MTT

O teste com MTT (3-(4,5 -dimethylthiazol -2 -yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide) é um método colorimétrico no qual enzimas mitocondriais de células metabolicamente ativas, reduzem os componentes do tetrazólio a produtos formazan corados. A intensidade da coloração, que pode ser lida em espectrofotômetro, é proporcional a atividade metabólica das mitocôndrias, o que nos permite inferir se o produto em estudo teve alguma ação positiva ou negativa sobre a viabilidade celular⁷⁰.

Em placas de 96 poços (Corning –CLS 3599), foram semeadas, 4×10^3 NHF (n=06) de 2^a a 4^a passagem, usando meio D₁₀. As culturas foram incubadas em incubadora a 37°C e atmosfera de CO₂ 5% por 48h. Passado esse tempo o meio D10 foi substituído por meio D10 fresco nos poços controle e por papaína diluída em D10 nas concentrações de 0,1%, 0,075%, 0,050%) nos demais poços. As mesmas soluções de papaína foram mantidas em poços sem células durante todo o experimento. A leitura de absorvância destes, correspondeu ao valor “background”, descontado da leitura nos valores de absorvância de seus respectivos pares. Após 24h, 48h, 72h, os poços tiveram meio de cultura removidos e foram adicionados uma solução composta por 90% de DMEM e 10% de solução MTT (Sigma C2674) na concentração de 5 mg/ml. Seguiu-se então novo período de incubação (temperatura 37°C –atmosfera de CO₂–5%) por 3 horas, após o qual a solução de MTT foi removida e substituída por dimetil sulfóxido (DMSO-Sigma Aldrich –D5879), mantendo incubação por mais 30 minutos.

Após a agitação por 1 minuto, a absorvância foi medida em leitor automático de placas de cultura (Promega) com comprimento de onda de 560 nm, e filtro de referência de 560 nm. Os poços com meio de cultura, sem células, foram considerados como background e o seu valor descontado dos valores obtidos para as demais amostras. Os resultados foram expressos em absorvância.

3.11 Teste de adesão celular à superfície de cultivo com Alfa-1 antitripsina

A Alfa-1 antitripsina (AAT) impede a ação das proteases nos tecidos saudáveis, devido a isso, a papaína age apenas no tecido necrótico e desvitalizado, não interferindo na integridade do tecido sã⁷¹.

Em placas de 96 poços (Corning –CLS 3599), foram semeadas, 4×10^3 NHF de 2^a a 4^a passagem, usando meio D₁₀. As culturas foram incubadas em incubadora a 37^oC e atmosfera de CO₂ 5% por 48h. Passado esse tempo o meio D10 foi substituído por meio D10 fresco nos poços controle (CO), por Alfa-1 antitripsina (AAT) nas concentrações 0,5%, 0,3%, 0,1% e por papaína na concentração de 0,05% associada ou não a Alfa-1 antitripsina concentrações acima citadas e analisadas com 48 horas após as diluições como mostrada na figura 5.

1	2	3	4	5	6
CO	CO	CO			
P 0,05%	P 0,05%	P 0,05%			
AAT 0,5%	AAT 0,5%	AAT 0,5%	AAT0,5% +P 0,05%	AAT0,5% +P 0,05%	AAT0,5% +P 0,05%
AAT 0,3%	AAT 0,3%	AAT 0,3%	AAT0,3% +P 0,05%	AAT0,3% +P 0,05%	AAT0,3% +P 0,05%
AAT 0,1%	AAT 0,1%	AAT 0,1%	AAT0,1% +P 0,05%	AAT0,1% +P 0,05%	AAT0,1% P 0,05%

Figura 5 - Distribuição dos fibroblastos (CO) e das diluições feita com a papaína(P) e com a Alfa-1 antitripsina e suas respectivas concentrações na placa de cultivo.

Baseado nos resultados obtidos nesse ensaio realizou-se um novo experimento, onde a Alfa-1 antitripsina foi adicionada à cultura de células(HNF) duas horas antes da papaína, como mostrada na figura 6.

	PAPAÍNA	ALFA-1 ANTITRIPSINA + PAPAÍNA (imediate)	ALFA-1 ANTITRIPSINA + PAPAÍNA (2 horas após)
CONCENTRAÇÕES	0,1%	AAT 1% + P 0,1%	AAT 1% + P 0,1%
CONCENTRAÇÕES	0,075%	AAT 0,75% + P 0,075%	AAT 0,75% + P 0,075%
CONCENTRAÇÕES	0,050%	AAT 0,5% + P 0,05%	AAT 0,5% + P 0,05%
CONCENTRAÇÕES	0,025%	AAT 0,25% + P 0,025%	AAT 0,25% + P 0,025%
CONTROLE	HNF	ALFA-1 ANTITRIPSINA (adicionada aos HNF)	

Figura 06 – Segunda coluna- Concentrações de papaína adicionadas aos fibroblastos. Terceira coluna- Concentrações de papaína adicionadas aos fibroblastos colocadas junto com a Alfa-1 antitripsina(imediato). Quarta coluna- Concentrações de papaína adicionadas aos fibroblastos colocadas duas horas após ter colocado a Alfa-1 antitripsina. Controle - representa os fibroblastos sem adição de papaína e Alfa-1 antitripsina adicionada aos fibroblastos normais.

3.12 Metabolismo Celular por Imunofluorescência indireta para detecção de síntese de colágeno I

Esse ensaio foi realizado para avaliar possíveis efeitos de modulação da papaína, nas concentrações de 0,05%, 0,025%, 0,0125%, sobre a expressão do colágeno tipo I, pelos NHF, após 24 e 48h de exposição. Em microplaca preta de fundo chato com 96 poços (Corning 3603), foram semeadas, em meio D10, aproximadamente 4×10^3 , entre 2^a e 4^a passagem, provenientes de 2 pacientes. A placa foi incubada à 37°C com atmosfera de 5% CO₂ por 48 horas, para que houvesse a adesão das células à superfície dos poços. Passado esse período, o meio D10 foi substituído. As culturas foram então incubadas nas condições mencionadas anteriormente por 24 e 48 horas. As células cultivadas foram então fixadas às placas de cultivo, à semelhança do que foi realizado no teste de caracterização celular (item 3.6)

O anticorpo primário: anti-colágeno I utilizado foi; (rabbit) antibody -Rockland (600.401.103 -0.5) diluição 1:50. O anticorpo secundário utilizado foi Alexa Fluor TM 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, A11008) para colágeno do tipo I na diluição 1:1000. Os resultados foram expressos em intensidade de fluorescência.

3.13 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram organizados em tabelas usando planilha eletrônica MS-Excel (Microsoft-Office, Microsoft, INC2013). Para os resultados do ensaio de doubling time foi calculada a média das triplicatas e os dados inseridos no software GraphPad Prism 7 software (GraphPad Software, Inc, USA) utilizando-se as funções regressão

linear e não-linear. Para os ensaios de MTT foi usado o pacote estatístico SAS (Statistical Analysis System) em sua versão 9 (SAS Institute Inc., USA). Com a finalidade de avaliar se houve diferença significativa entre os grupos, utilizamos um teste de Análise de Variância para modelos mistos (ANOVA Mixed Models), considerando a ocorrência de efeitos significativos quando o valor $p < 0,05$. Partindo desse princípio, para identificar quais foram os grupos diferentes entre si, fizemos um teste de comparação múltipla pelo método de Turkey. Para os ensaios de imunofluorescência indireta (3.12) foram empregados os testes ANOVA One Way e Dunnett., utilizando GraphPad Prism Software, Inc., USA, na versão 5.

4. Resultados

4. Resultados

4.1 Obtenção de fibroblastos de pele não cicatricial – NHF

À microscopia óptica foi observado aspecto morfológico das células obtidas a partir do método de explante dos fragmentos de pele, que apresentam formato afunilado regular e com maior índice de confluência celular na placa de cultura. Compatível com fibroblastos de pele humana (Figura 7).

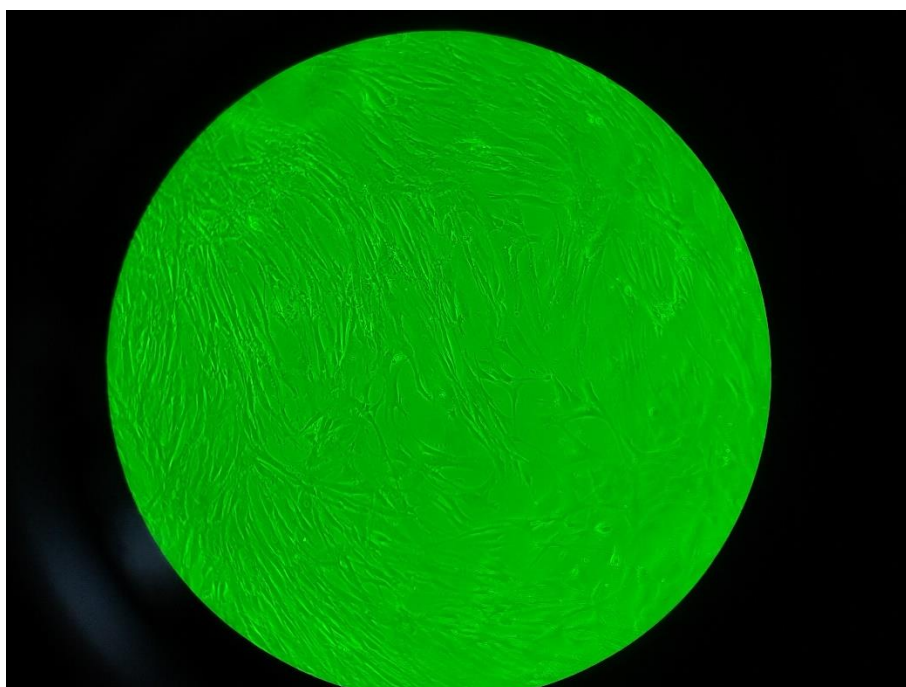


Figura 7 - Imagem representativa de fibroblastos de pele normal (NHF) M.O. 100X

4.2 Caracterização dos NHFs por imunofluorescência indireta – vimentina, colágeno do tipo I

Após cultivo celular, verificou-se a positividade na fluorescência para sinalização de vimentina e colágeno tipo I como apresentado na Figura 8.

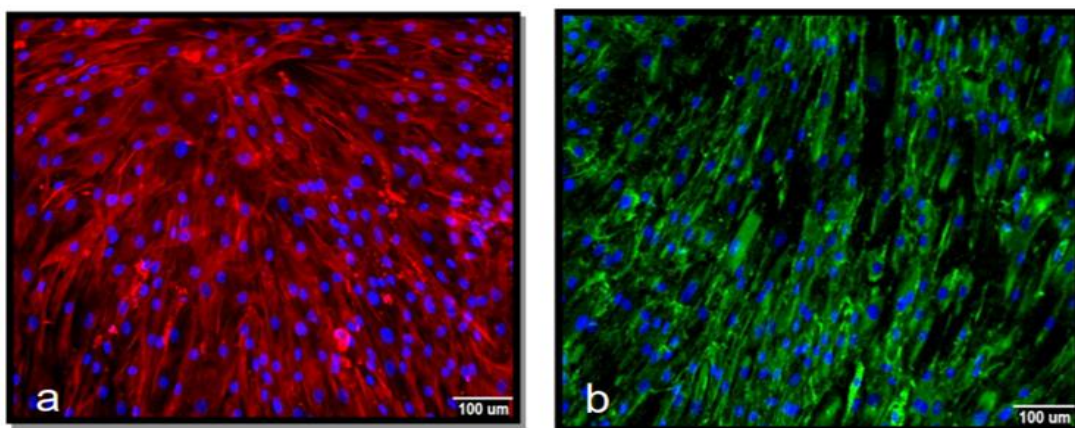


Figura 8 - Imagem representativa de fluorescência da sinalização para: (A) Vimentina, (B) Colágeno tipo I por NHF após 72h. de cultivo em meio padrão (D10).

4.3 Ensaio de tempo de duplicação celular de fibroblastos

O tempo de duplicação dos NHFs foi 50 ± 8 h, assim, determinou-se 48 horas como tempo de estímulo suficiente para promover alterações celulares morfofuncionais.

4.4 Teor de pureza da papaína por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) - Avaliação Massa Molecular

A massa molecular da papaína utilizada em nossos testes foi de uma precipitação em 23KDa. (Figura 9). Se comparada à massa molecular da papaína que é de 23.400 Daltons essa papaína foi considerada pura³⁶.

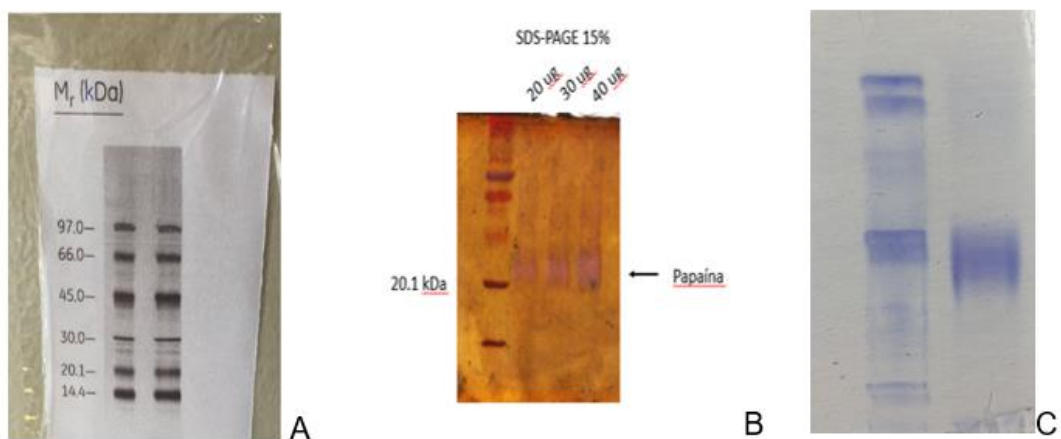


Figura 9 - A) – Mostra a tabela dos valores em KDa, (B) localização da precipitação ideal da Papaína e (C) nossa substância, papaína, confirmando a precipitação em 23KDa³⁶.

4.5 Cálculo da dose de papaína para ensaios *in vitro*

Baseado no ensaio de citotoxicidade a IC₅₀ encontrada foi de aproximadamente 57µM para 24 horas e 87µM para 48 horas (Figura 10).

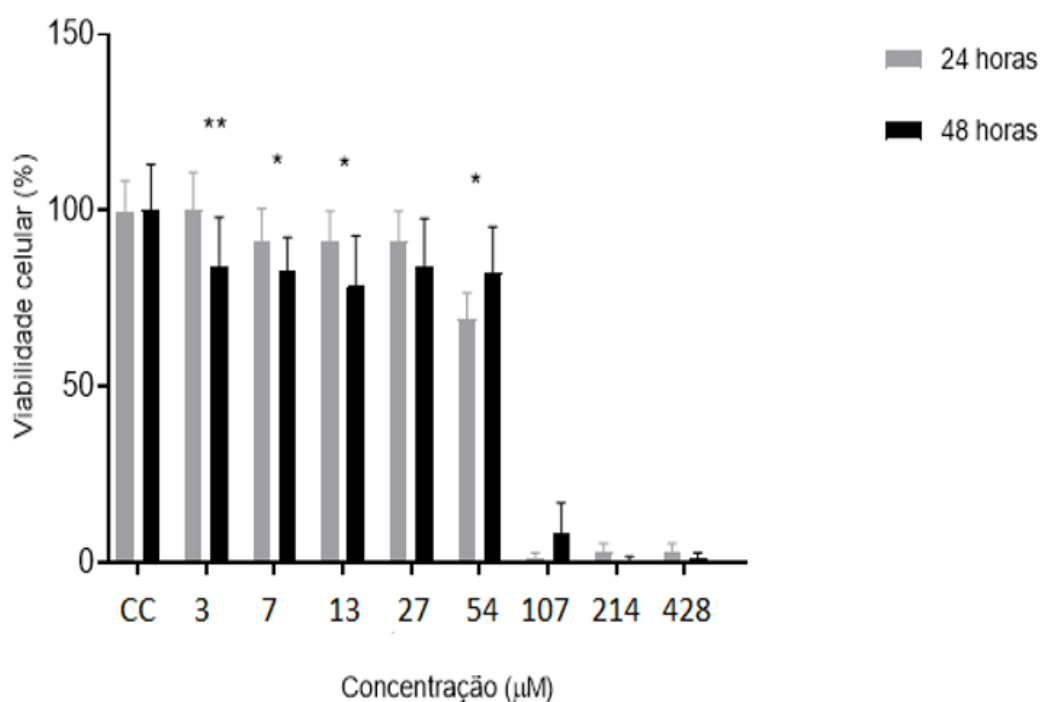


Figura 10 - Citotoxicidade da papaína livre em fibroblastos humanos em 24 e 48 horas. Os dados representam média \pm desvio padrão de três ensaios independentes. (** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$ vs. controle positivo seguido de análise de variância one-way anova e teste de bonferroni). cp: controle positivo (1% (v/v) de tritontm x-100).

4.6 Teste de Viabilidade e Citotoxicidade Celular por MTT

A partir do cálculo de IC50 realizamos ensaios de viabilidade celular com soluções de papaína à 0,1%, 0,075%, 0,05%, e escolhemos as doses de 0,075%, 0,05% e 0,025% para estimulação celular (Figuras 11 e 12).

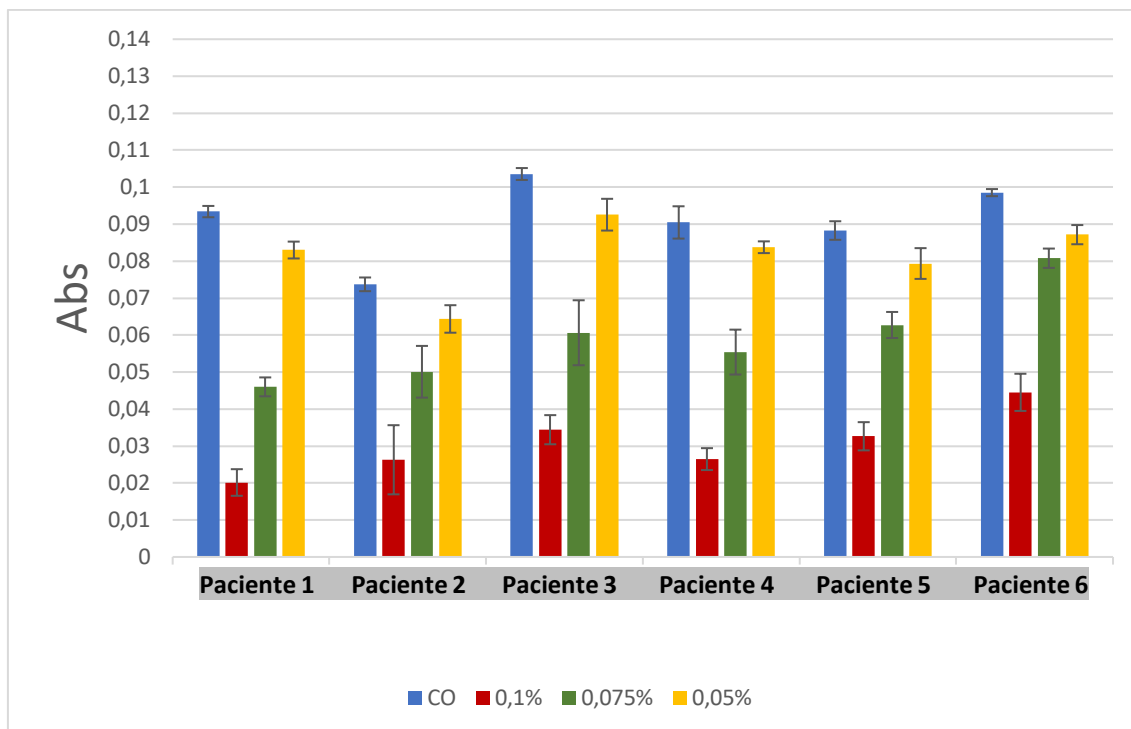


Figura 11 - Viabilidade de NHFs expostos as concentrações de papaína (0,1%, 0,075%, 0,05%) em comparação ao controle (CO) ao longo de 24h. Valores expressos em absorbância (Abs).

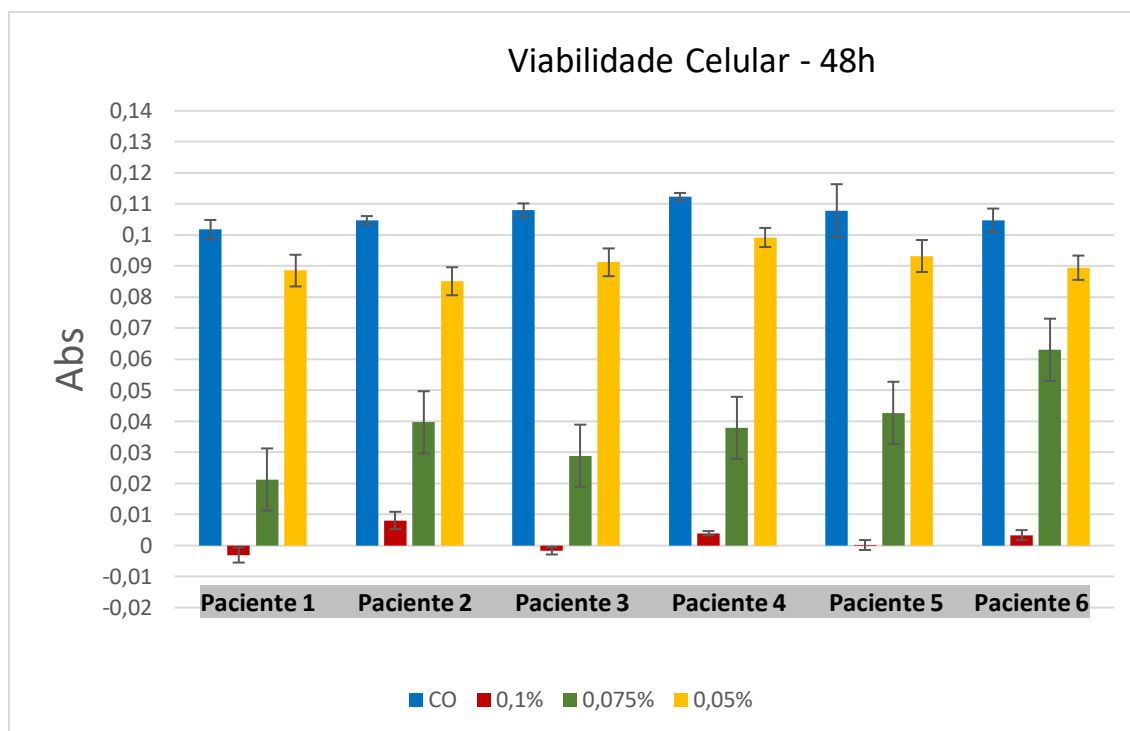


Figura 12 - Viabilidade de NHFs expostos as concentrações de papaína (0,1%, 0,075%, 0,05%) em comparação ao controle (CO) ao longo de 48h. Valores expressos em absorbância (Abs).

4.7 Ensaio de adesão celular à superfície de cultivo - Alfa-1 antitripsina

Como a Alfa-1 antitripsina não se mostrou efetiva na inibição da soltura de fibroblastos da superfície de cultivo celular (Figura 13), optamos por seguir o ensaio de avaliação de metabolismo celular sem a adição da mesma.















	PAPAÍNA	AAT +PAPAÍNA (imediate)	AAT + PAPAÍNA (2 horas após)
0,1%			
0,075%			
0,050%			
0,025%			
controle		Alfa 1 antitripsina	

Figura 13 - Primeira coluna - Concentrações de papaína adicionadas aos fibroblastos. Segunda coluna- Concentrações de papaína adicionadas aos fibroblastos colocadas junto com a Alfa-1 antitripsina. Terceira coluna- Concentrações de papaína adicionadas aos fibroblastos colocadas duas horas após ter colocado a Alfa-1 antitripsina. Controle - representa os fibroblastos sem adição de papaína. Alfa-1 antitripsina adicionada aos fibroblastos.

4.8 Síntese de colágeno do tipo I – Imunofluorescência indireta

Não houve diferença estatística significativa nas concentrações de 0,05%, 0,025%, 0,0125%, sobre a expressão do colágeno tipo I, pelos NHF, após 24 e 48h de exposição (Figuras 14,15 e 16).

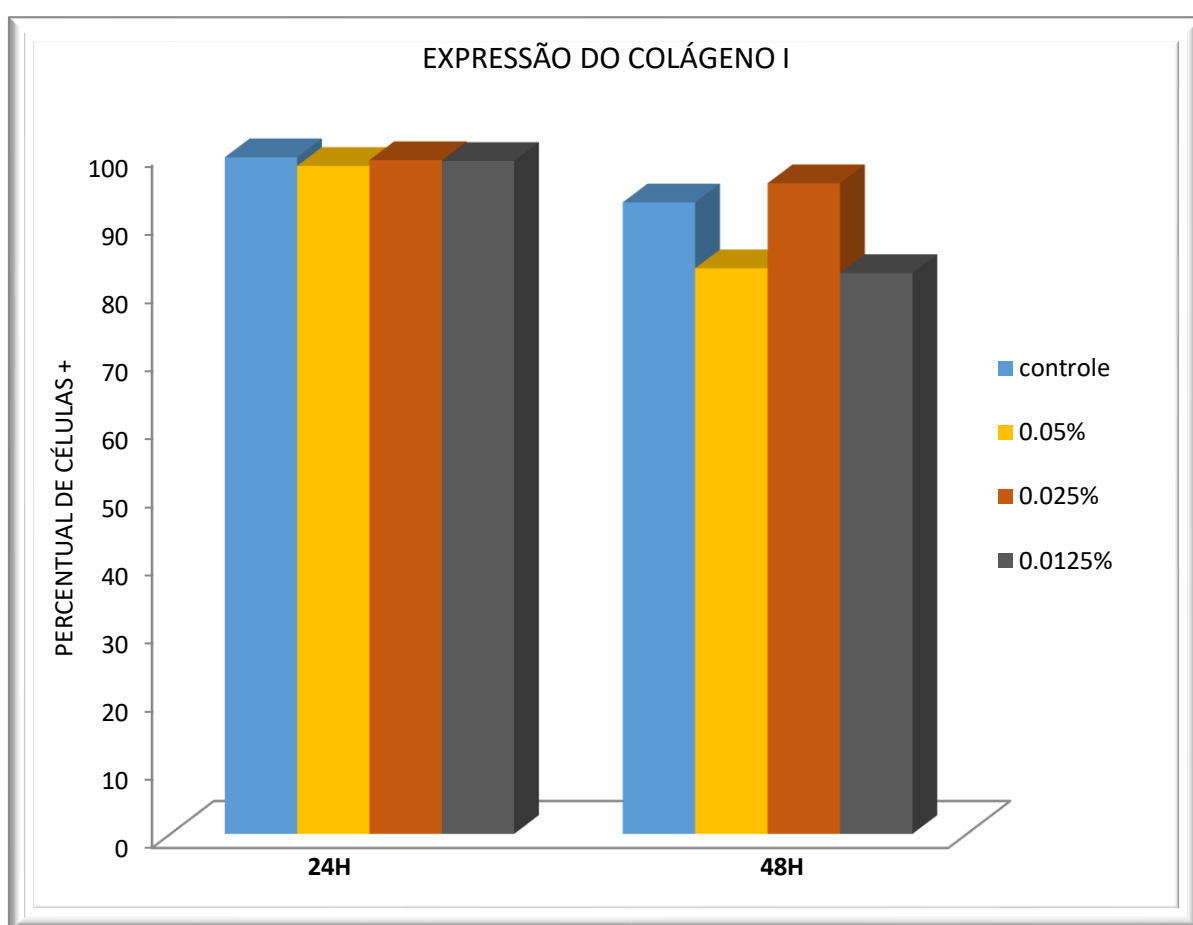


Figura 14 - Expressão de colágeno tipo I frente à exposição de diferentes concentrações de papaína sendo: controle, papaína a 0,05%, papaína a 0,025%, papaína a 0,0125%. Em 24 e 48 horas.

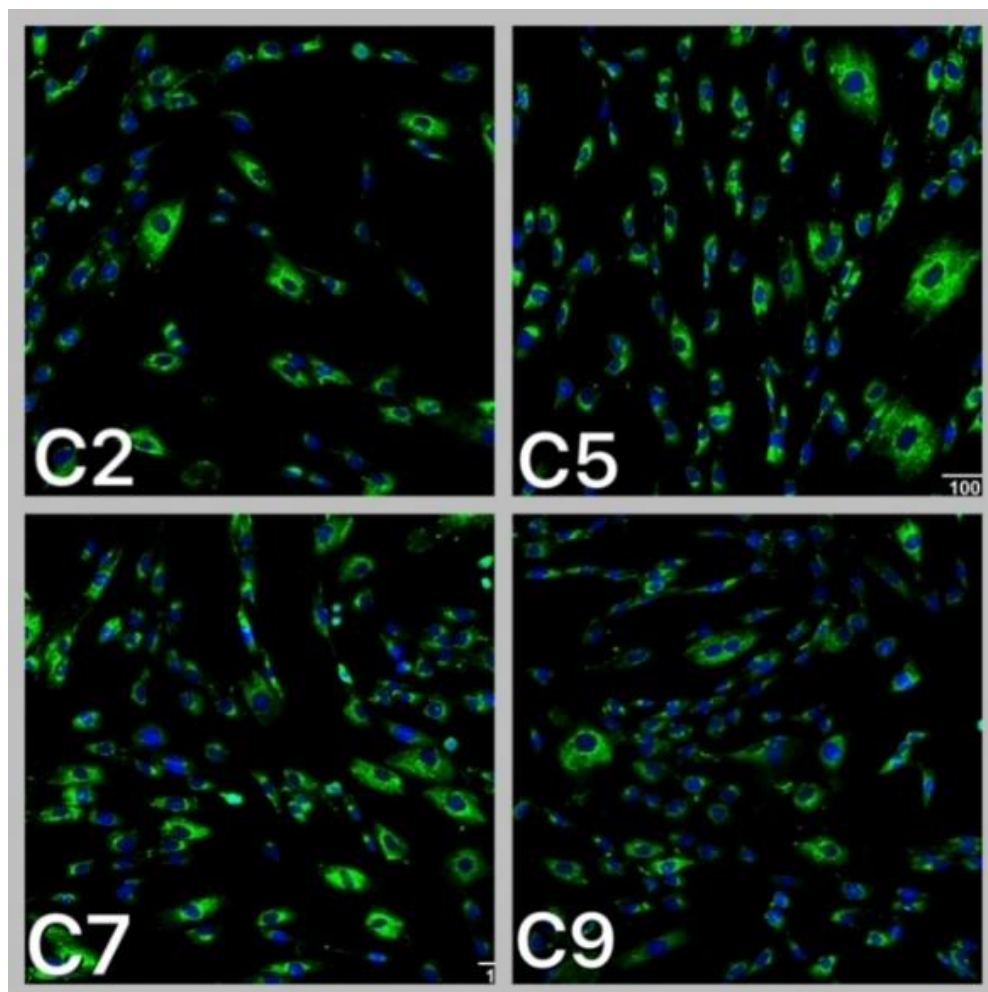


Figura 15 - Avaliação da expressão de colágeno tipo I frente a exposição dos NHFs ao meio D₁₀ (C₂) e às diferentes concentrações de papaína, por um período de 24 horas, sendo: (C₂) controle, (C₅) concentração de papaína de 0,05%, (C₇) concentração de papaína de 0,025%, (C₉) concentração de papaína de 0,0125%.

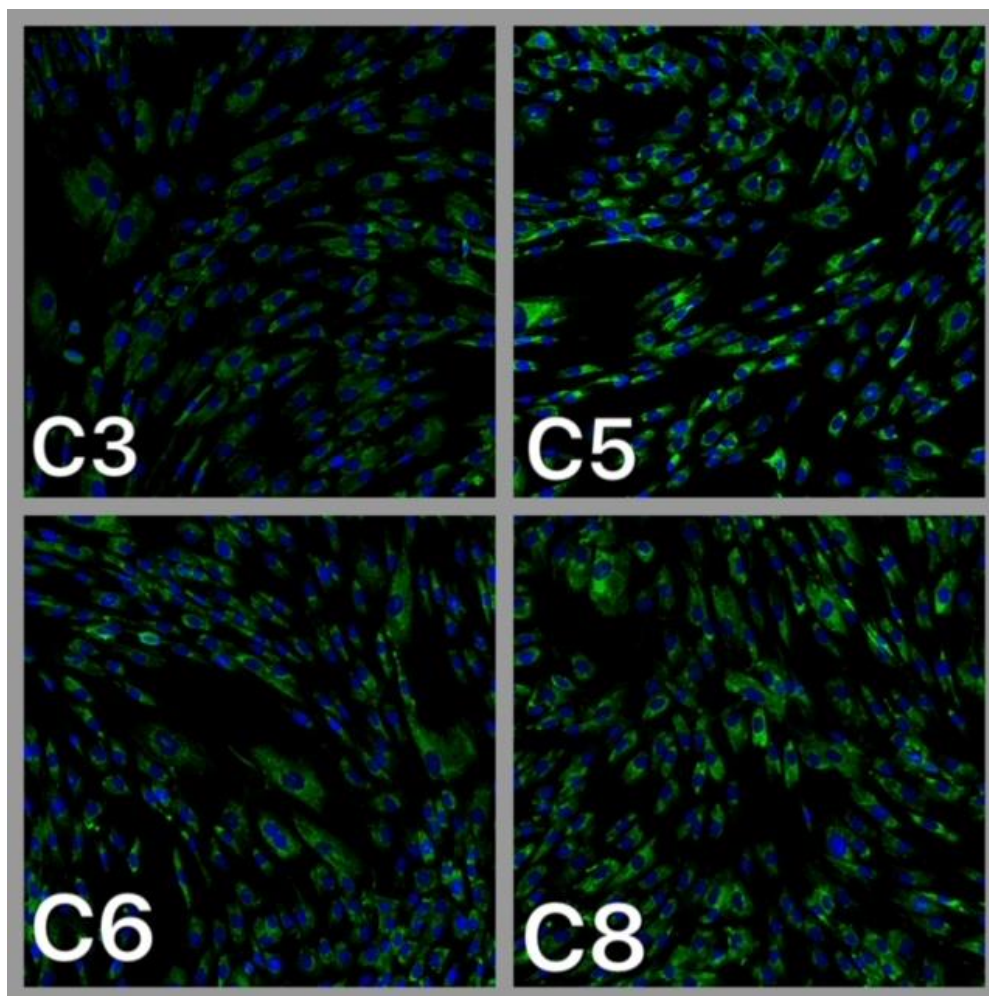


Figura 16 - Avaliação da expressão de colágeno tipo I frente a exposição às diferentes concentrações de papaína, no período de 48 horas, sendo (C3) controle, (C5) concentração de papaína de 0,05%, (C6) concentração de papaína de 0,025%, (C8) concentração de papaína de 0,0125%.

5. Discussão

5. Discussão

A ação e o estabelecimento de protocolos para utilização da papaína, no tratamento de feridas, têm sido amplamente estudados no tratamento de lesões cutâneas de diferentes etiologias, devido ao seu baixo custo e reduzidos efeitos colaterais⁴⁴⁻⁴⁶.

A papaína promove desbridamento químico, sendo capaz de degradar qualquer proteína que contenha resíduos de cisteína. Ela pode ser administrada em diferentes formas farmacêuticas, como pó, gel, creme e soluções nas concentrações de 2 a 5%⁴⁷. Concentrações entre 1 a 4% podem ser empregadas em tecidos fibrinosos ou de granulação^{30,43} e 10% para limpeza de feridas que apresentem tecidos necróticos⁴⁸.

Apesar da farta descrição de sua utilização clínica há pouquíssimos estudos que comprovem a sua atividade sobre o microambiente do leito da ferida.

Em revisão sistemática para analisar as evidências sobre o uso da papaína no processo de cicatrização de feridas, os resultados apontaram a deficiência de padrão de formas e apresentação para uso do produto, além do predomínio de estudos de baixa qualidade, segundo as escalas internacionais de avaliação, indicando a necessidade de desenvolvimento de pesquisas com maior rigor metodológico para a avaliação mais precisa da efetividade da papaína no processo de reparo tecidual^{3,66}.

Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o comportamento, *in vitro*, de fibroblastos da pele na presença de papaína, quanto à: capacidade de proliferação, viabilidade celular e a síntese de colágeno envolvido no processo de cicatrização

Para tanto, foram obtidos fibroblastos oriundos do excedente de pele não-cicatricial de mulheres submetidas à mamoplastia redutora de caráter estético.

Utilizando-se como base a técnica de explante, proposta por Carrel e Burrows (1911)⁶⁷, com algumas modificações padronizadas pelo nosso grupo⁶⁸.

Uma vez obtidas, as células foram caracterizadas avaliando-se as expressões de vimentina e colágeno que são proteínas estruturais e funcionais sabidamente expressas por fibroblastos. A positividade de expressão para ambas as proteínas é compatível com o que descreve a literatura⁷².

Determinadas quem são as células objeto de estudo, partimos para avaliar o tempo de duplicação delas. Essa informação nos permitiu calcular o tempo de exposição dos fibroblastos à papaína na avaliação das modificações morfofuncionais promovidas pela droga. O tempo de duplicação dos NHFs obtido foi 50 ± 8 h, o que é compatível com os achados de literatura⁷³. Assim, determinamos 48 horas como tempo máximo de estímulo celular.

A etapa subsequente foi determinar o teor de pureza da papaína. É sabido que a papaína utilizada habitualmente na indústria é veiculada em pó e sua principal utilização é na indústria alimentar. Então a determinação desse percentual de pureza teve influência direta na confecção da solução mãe e todas as diluições necessárias para a realização dos ensaios celulares. O resultado obtido foi de um peso molecular próximo a 23400 Daltons, peso este, compatível com o peso molecular citado na literatura³⁶.

O resultado obtido foi de uma precipitação da papaína analisada para os nossos ensaios em 23KDa. Como a massa molecular da papaína pura é de 23.400 Daltons e um ponto isoelétrico de 9,5³⁶. Consideramos esse fármaco como puro.

Uma vez conhecido seu grau de pureza passamos ao cálculo da dose de papaína para ensaios *in vitro*, utilizando-se como parâmetro a avaliação da viabilidade celular por absorbância do corante MTT.

O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular, de acordo com o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization), ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer fármaco e, depois de comprovada a sua não toxicidade é que o estudo da biocompatibilidade do produto pode ter continuidade realizando-se os ensaios necessários em animais de laboratório⁷⁴.

O estudo da citotoxicidade é um passo inicial útil na determinação da toxicidade potencial de uma substância de teste, incluindo extratos de plantas ou composto biologicamente ativos isolados de plantas. Toxicidade mínima ou nenhuma é essencial para o desenvolvimento bem-sucedido de uma preparação farmacêutica e, a esse respeito, os estudos de toxicidade celular desempenham um papel crucial⁷⁵.

Para determinação de morte celular e, conseqüentemente a IC₅₀ do fármaco, foram utilizadas diluições para as concentrações 0,1%, 0,075% e 0,050% de papaína. Nossos resultados demonstraram que o efeito citotóxico máximo (95%) ocorreu na solução a 107 µM de papaína enquanto a IC₅₀ foi de aproximadamente 57µM para 24 horas e 87µM para 48 horas

Akila et al⁷⁶ publicaram um estudo sobre a citotoxicidade da papaína na linhagem de células de câncer de fígado HepG2, utilizando o ensaio MTT e cálculo do percentual de viabilidade celular. Concluindo que 1000 µg / ml de papaína tem efeito citotóxico máximo (85%) contra a linhagem de células de câncer de fígado hepG2.) E a IC₅₀ de 125µg / mL e sua porcentagem de viabilidade celular foi de 49,20. Apesar de uma célula estudada ser diferente de fibroblastos de pele, esse estudo confirma nossa escolha metodológica.

Em nossos ensaios de viabilidade celular houve redução no número de células, quando comparadas ao controle, em todos os pacientes e todas as concentrações

estudadas. Células estimuladas com papaína 0.05% mostraram viabilidade mais próxima ao controle, porém em nenhuma situação foi observado aumento da absorvância que nos permitisse inferir aumento da viabilidade celular.

A Alfa1-antitripsina, uma globulina humana, presente somente no tecido sadio inativa as proteases, impedindo a degradação do tecido sã³⁰. Dessa forma a papaína age apenas no tecido necrótico e desvitalizado, não interferindo na integridade do tecido sã⁷¹. *In vitro*, a papaína exerce efeito semelhante à enzima tripsina (efeito *tripsina like*) que solta as células da superfície de cultivo dos frascos ou placas. Assim, no teste de adesão celular à superfície de cultivo, acrescentamos Alfa-1 antitripsina às culturas para avaliar se a soltura das células de tal superfície se daria por clivagem enzimática ou consequente à morte celular.

Nesse ensaio houve desprendimento de todas as células em contato com papaína, independentemente da concentração utilizada. Para afastar a possibilidade de inativação imediata da Alfa-1 antitripsina pela papaína, adicionamos a Alfa-1 antitripsina à cultura celular 2 horas antes da papaína. Mesmo assim houve desprendimento celular. Assim, como a Alfa-1 antitripsina não se mostrou efetiva na inibição da soltura de fibroblastos da superfície de cultivo celular, optamos por seguir o ensaio de avaliação de metabolismo celular sem a adição dela.

Infelizmente não há dados semelhantes descritos na literatura indexada com os quais pudéssemos confrontar nossos resultados.

Na matriz dérmica há essencialmente dois tipos de colágeno: tipo I e colágeno tipo III, correspondendo respectivamente a cerca de 80-85% e 15-20% do total desta proteína⁷⁷. O tipo I é formado por duas cadeias α_1 e uma cadeia α_2 , diferentes, quanto à sequência de aminoácidos. Apresenta diâmetro total de 1 a 20 μm e está localizado

principalmente na derme reticular, a mais profunda da pele. Esses tipos de colágeno são sintetizados por fibroblastos^{13,78,79}.

O colágeno é o principal produto excretado pelos fibroblastos. A principal função do fibroblasto é sintetizar colágeno e elastina, além de proteoglicanos, glicosaminoglicanos e glicoproteínas, além de fatores de crescimento celular que compõe parte da matriz extracelular¹⁵.

Avaliar a síntese dos tipos colágenos é uma maneira de avaliar o metabolismo desses fibroblastos.

Para o ensaio de metabolismo celular elegemos doses inferiores à IC₅₀, utilizando, então, concentrações à 0,050%, 0,025% e 0,0125% dessa solução.

Não houve alteração estatisticamente significativa, na síntese de colágeno quando comparada ao controle, independente da concentração de papaína ou do tempo de exposição dos fibroblastos. O que sugere que a papaína não modifica o metabolismo celular das células estudadas. Não há na literatura indexada dados com os quais pudéssemos confrontar nossos resultados.

Estudos *in vitro* sobre a participação da papaína no processo de cicatrização de feridas apontam para uma deficiência de padrão, de formas e apresentação para uso do produto³.

Para exemplificar, Costa, KB⁶⁵ que estudou o efeito da papaína na formação e degradação de matriz extracelular em cultura de fibroblastos humanos tratados com papaína 1%, 2% e 10%, avaliando metaloproteinases MMP-1, MMP-3 e MMP-9 e inibidores de metaloproteinases TIMP-1 e TIMP-2, apresentou resultados variados. Porém, concluiu que células expostas a papaína 2% mostraram maior expressão de MMPs, mas não de TIMPs, quando comparadas a outras concentrações. Vale ressaltar que a metodologia apresentada não traz detalhes da construção das

diferentes soluções de papaína. Isso impossibilitou que pudéssemos usar tal estudo como baliza em nosso estudo.

A falta de clareza metodológica foi um dificultante na escolha das concentrações de papaína a serem utilizadas em nossos ensaios. Já nos primeiros experimentos descobrimos que não seria possível fazer a transposição direta das doses clínicas para os ensaios *in vitro*. Como alternativa, nos propusemos a calcular a IC₅₀ e, a partir desse achado, encontrar as doses a serem testadas.

Tivemos muita dificuldade por não compreender se a papaína matava os fibroblastos e por consequência eles se soltavam da superfície de cultivo ou se a papaína soltava essa célula ainda viva e por consequência provocava sua morte.

Não encontramos na literatura métodos de análise de mecanismos de morte celular que pudessem ser utilizados em nossos ensaios *in vitro*.

Nossa principal constatação foi a de que a grande maioria dos estudos *in vitro* relacionando papaína e cura da ferida é de baixa qualidade, segundo as escalas internacionais de avaliação. Isso indica a necessidade de desenvolvimento de pesquisas com maior rigor metodológico.

Acreditamos que os efeitos pró-inflamatórios, observados clinicamente que auxiliam a cicatrização de feridas cutâneas não se devam à estímulo direto sobre fibroblastos presentes no leito dessas feridas. Mais estudos que tentem elucidar tais mecanismos são necessários.

6. Conclusão

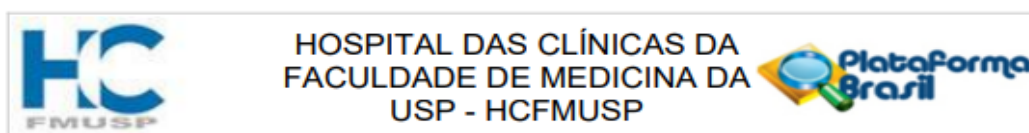
6. Conclusão

Papaína em concentrações inferiores à IC_{50} , não são citotóxicas, porém não estimulam proliferação e/ou metabolismo celular em cultura de fibroblastos oriundos de pele. Não existe correlação direta entre doses de utilização clínica da papaína e doses *in vitro*. Efeitos pró-cicatrizantes observados clinicamente não ocorrem à custa de estímulo direto sobre fibroblastos.

7. Anexos

7. Anexos

7.1 Anexo A - Aprovação CONEP/CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Comparação da efetividade do uso tópico de papaína veiculada em gel nas concentrações de 4%, 6% e 8% como adjuvante no processo de cicatrização de úlceras venosas crônicas

Pesquisador: Cesar Isaac

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 35417614.1.1001.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 836.020

Data da Relatoria: 04/11/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma avaliação clínica e laboratorial, para identificar a concentração de papaína mais eficiente como fator adjuvante no tratamento do leito de feridas complexas de origem venosa, em dois serviços - HCFMUSP (público) e Hospital Belo Horizonte (privado)

Objetivo da Pesquisa:

Comparar a efetividade do uso tópico de papaína veiculada em gel nas concentrações de 4%, 6% e 8% como adjuvante no processo de cicatrização de úlceras venosas crônicas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O participante poderá apresentar desconforto com anestesia local, eventual dor e possível dolorimento no pós-operatório, que será atendido pela equipe, se necessário.

O principal benefício será a promoção da cura das feridas crônicas dos indivíduos participantes

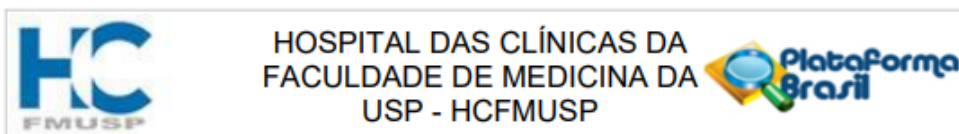
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem comentários adicionais

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Sem comentários adicionais

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 836.020

Recomendações:

sem recomendações adicionais

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Os pesquisadores atenderam e esclareceram o que foi solicitado no parecer anterior

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

SAO PAULO, 17 de Outubro de 2014

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
 (Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05 403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cnpq@hcfm.usp.br

7.2 Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pacientes submetidas a mastoplastia

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1.NOME:.....
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M F
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO Nº
 APTO: BAIRRO: CIDADE
 CEP: TELEFONE:
 DDD (.....)

2.RESPONSÁVEL LEGAL

.....
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

 DOCUMENTO DE IDENTIDADE:.....SEXO: M F
 DATA NASCIMENTO.:/...../.....
 ENDEREÇO: Nº
 APTO:..... BAIRRO:
 CIDADE: CEP:
 TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA.” Comparação da efetividade do uso tópico de papaína veiculada em gel nas concentrações de 4%, 6% e 8% como adjuvante no processo de cicatrização de úlceras venosas crônicas”.

2. PESQUISADOR: Dr Cesar Isaac (cargo/função: Pesquisador Responsável, Médico, responsável pelo Laboratório de Pesquisas em Cultura Celular e Feridas Cutâneas - Divisão de Cirurgia Plástica (LIM04) HC-FMUSP e professor colaborador da Disciplina de Cirurgia Plástica da FMUSP, CRM SP: 56.601, Mário Múcio Maia de Medeiros (cargo/função: Pesquisador Executante, médico, doutorando em Ciências pela Universidade de São Paulo, CRM-MG: 37.289).

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA: RISCO MINÍMO

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 36 meses

Rubricas: _____ Representante _____ legal: _____
 Pesquisador: _____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP.

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa testar um novo material de curativo para o tratamento de feridas crônicas de pacientes portadores de insuficiência venosa. Como você decidiu se submeter a uma cirurgia de mastoplastia com finalidade estética gostaríamos de solicitar a doação da pele retirada, que, nesses casos, é geralmente desprezada, porém, pode ter utilidade em estudos como o nosso que visa à obtenção de células da pele para testar no laboratório a ação da substância. Somente a pele que seria descartada na sua cirurgia será recolhida e utilizada na pesquisa. Não haverá nenhuma alteração no procedimento cirúrgico da mamoplastia, que será realizado da forma proposta pelo seu cirurgião. Nenhum desconforto ou risco é possível uma vez que nada se altera na cirurgia. Apenas o destino da pele retirada será modificado. Neste projeto não haverá benefício direto para o participante, pois se trata de estudo experimental para avaliar o comportamento das células presentes na pele do corpo humano. O benefício esperado com o estudo será o maior conhecimento da ação de partículas emissoras de radiação infravermelha longa sobre tais células. Dessa forma, essas informações poderão auxiliar os profissionais de saúde a conhecerem melhor essas partículas e utilizá-las para melhorar a assistência prestada no tratamento de feridas. Caso você deseje e autorize doação do excedente de pele, necessitamos assine esse termo de consentimento livre e esclarecido. Nenhum outro procedimento em você será realizado. A pesquisa será realizada em laboratório com o excedente de pele que você doou. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Dr. Cesar Isaac e Mário Múcio Maia de Medeiros, poderão ser encontrados no Laboratório de Cultura de Células do LIM dentro da Faculdade de Medicina da USP localizado na Av. Dr. Arnaldo, 455 –sala 1216, Cerqueira César, Telefones: 11 3062-0415. Caso tenha alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) –Rua Ovídio Pires de Campos, 225 –5º andar –tel.: 2661-6442 ramais 17,18 ou 20, FAX: 2661-6442 ramal 26 –E-mail: cappesq@hcnnet.usp.br . É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade do seu tratamento na Instituição; as informações obtidas serão analisadas em conjunto com a de outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

Rubricas:
 Representante _____ legal: _____
 Pesquisador: _____

Você possui o direito de se manter atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores; não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Os pesquisadores se comprometem a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa. Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que

foram lidas para mim, descrevendo o estudo: “Comparação da efetividade do uso tópico de papaína veiculada em gel nas concentrações de 4%, 6% e 8% como adjuvante no processo de cicatrização de úlceras venosas crônicas”. Eu discuti com um dos pesquisadores (Mário Múcio Maia de Medeiros, Dr. Cesar Isaac sobre a minha decisão em consentir minha participação nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido ou no atendimento neste Serviço.

Assinatura do representante legal

Data / /

Assinatura da testemunha

Data / /

(Para casos de pacientes analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual). Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou letra legível)

Data / /

BANCO DE TECIDOS ICHC

Laboratório de Investigação Médica – LIM 04 - FMUSP.

TERMO DE DOAÇÃO DE TECIDOS / CÉLULAS – IN VIVO

Eu _____
 Nascida (o) em ____/____/____ portadora do RG no. _____
 CIC no. _____, residente e domiciliada à Rua _____
 Cidade _____ Estado _____ CEP: _____
 Telefone () _____ estando no juízo de minhas atribuições, **APÓS ESCLARECIMENTOS**
 feitos pela equipe médica acerca da necessidade da retirada de
 _____ como parte integrante do ato cirúrgico ao qual serei
 submetido(a) e do destino dado normalmente a este tecido .

ACEITO: doar, gratuitamente, este tecido e/ou seus componentes para finalidade de pesquisas, atuais e futuras de técnicas em ciências da saúde e biotecnologia, para cultivo e criopreservação de células, para transplante autólogo ou alógeno (todo ou partes) a receptor, ou para outro destino que o Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas ou o Laboratório de Investigação Médica LIM 04 – FMUSP, venha a considerar de interesse científico ou terapêutico. Autorizo o armazenamento e distribuição destes tecidos ou células por tempo indeterminado.

Entendo que o procedimento cirúrgico e tratamentos complementares dispensados pela equipe médica e para médica NÃO serão modificados em caso de aceite ou recusa desta solicitação para a doação.

ASSINATURA DO (A) DOADOR(A):

São Paulo, de de 200

1ª Testemunha: Nome _____
 RG.: _____ Ass.: _____

2ª Testemunha: Nome _____
 RG.: _____ Ass.: _____

COLAR ETIQUETA DO DOADOR

8. Referências

8. Referências

1. Jones JE, Nelson EA. Skin grafting for venous leg ulcers. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; (1): CD001737.
2. Salomé GM, Ferreira LM. Qualidade de vida em pacientes com úlcera venosa em terapia compressiva por bota de Unna. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica* 2012; **27**(3): 466-71.
3. Medeiros MMM, Isaac C, Altran SC, Nicolosi JT, Costa A, Aguiar Jr, Yagi LH, Paggiaro AO, Gemperli R. Study of the effectiveness of papain in wound healing and specific approach to its application in patients with venous ulcers: a systematic review. *Adv Plast Reconstr Surg*, 2018; 2(2): 183-187.
4. Kanj LF, Wilking SV, Phillips TJ. Pressure ulcers. *J Am Acad Dermatol* 1998; **38**(4): 517-36; quiz 37-8.
5. Tazima M de F, Andrade Vicente Y, Moriya T. Biologia da ferida e cicatrização. *Medicina (Ribeirao Preto Online)* [Internet]. 30set.2008 [citado 1set.2020];41(3):259-64. Available from: <https://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/271>.
6. Mimi Leong MD, Linda G, Philips MD. Cicatrização. In: Sabiston - tratado de cirurgia - Courtney M. Townsend Jr MD et al. 17a. ed. Elsevier, p. 183-207, 2005.
7. Ali-Bahar M, Bauer B, Tredget EE, Ghahary A. Dermal fibroblasts from different layers of human skin are heterogeneous in expression of collagenase and types I and III procollagen mRNA. *Wound Repair Regen*. 2004;12(2):175-82.
8. Traversa, B., Sussman, G. (2001). The Role of Growth Factors, Cytokines and Proteases in Wound Management. *Primary Intention: The Australian Journal of Wound Management*, 9(4), 161–167. <https://search.informit.org/doi/10.3316/informit.772529655703465>.
9. Stadelmann W, Digenis A & Tobin G. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *Am J Surg* 1998; 176(Suppl.2A):26S-38S.
10. Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg* 1993; **165**(6): 728-37.
11. Sporn MB, Todaro GJ. Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *N Engl J Med* 1980; **303**(15): 878-80.
12. Greenhalgh, David G. MD The Role of Growth Factors in Wound Healing, *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*: July 1996 - Volume 41 - Issue 1 - p 159-167.
13. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999; **341**(10): 738-46.
14. Eming, S.A., Krieg, T., Davidson, J.M., 2007. Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology* 127, 514–525.
15. Broughton G, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2006; **117**(7 Suppl): 12S-34S.
16. Tanaka T: Comparison of stromal remodeling and keratocyte response after corneal incision and photorefractive keratectomy. *Jpn J Ophthalmol* 2000, 44:579–590.
17. Ali-Bahar M, Bauer B, Tredget EE, Ghahary A. Dermal fibroblasts from different layers of human skin are heterogeneous in expression of collagenase and types I and III procollagen mRNA. *Wound Repair Regen* 2004; **12**(2): 175-82.
18. Kiwanuka E, Junker J, Eriksson E. Harnessing growth factors to influence wound healing. *Clin Plast Surg* 2012; **39**(3): 239-48.

19. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am* 1997; **77**(3): 509-28.
20. Kurkinen M, Vaheri A, Roberts PJ, Stenman S. Sequential appearance of fibronectin and collagen in experimental granulation tissue. *Lab Invest* 1980; **43**(1): 47-51.
21. Diegelmann RF, Cohen IK, Kaplan AM. The role of macrophages in wound repair: a review. *Plast Reconstr Surg* 1981; **68**(1): 107-13.
22. Riches D.W.H. (1988) Macrophage Involvement in Wound Repair, Remodeling, and Fibrosis. In: Clark R.A.F. (eds) *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. Springer, Boston, MA.
23. Kierszenbaum AL. *Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004. p.103-8.
24. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997; **276**(5309): 75-81.
25. Romo T, Pearson JM, Yalamanchili H, et al. Wound healing, skin. E-medicine specialties. Available at: <http://www.emedicine.com/ent/topics13.htm>. Accessed May 12, 2016.
26. Gailit J, Xu J, Bueller H, Clark RA. Platelet-derived growth factor and inflammatory cytokines have differential effects on the expression of integrins alpha 1 beta 1 and alpha 5 beta 1 by human dermal fibroblasts in vitro. *J Cell Physiol* 1996; **169**(2): 281-9.
27. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008;453:314-21.
28. Harding KG, Morris HL, Patel GK. Science, medicine and the future: healing chronic wounds. *BMJ* 2002; **324**(7330): 160-3.
29. Feijó E, Cruz ICF, Lima DVM. Infecção da ferida – revisão sistematizada da literatura. *Online Braz J Nurs*. [Internet]. 2008[citado 2010 nov 29];7(3). Disponível em: <http://www.objnursing.uff.br/index.php/nursing/article/view/j.1676-4285.2008.1819/433>.
30. Monetta L. Uso da papaína nos curativos feitos pela enfermagem. *Rev Bras Enferm*. 1987;40 (1):66-73.
31. Azarkan M, El Moussaoui A, van Wuytswinkel D, Dehon G, Looze Y. Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of *Carica papaya*. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2003; **790**(1-2): 229-38.
32. Capucho, HC. Desenvolvimento de formulações tópicas contendo papaína para o tratamento de feridas. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2007.
33. Pinto C, Green D, Baby AR, et al. Determination of papain activity in topical dosage forms: Single laboratory validation assay. *Latin American Journal of Pharmacy* 2007; **26**(5): 771-5.
34. Balls AK, Lineweaver H. Isolation and properties of crystalline papain. *Journal of Biological Chemistry* 1939; **130**(2): 669-86.
35. Darlenne LE, Werneck AS, Oliveira Neto M, Bisch, PM. Electrostatic properties in the catalytic site of papain: a possible regulatory mechanism for the reactivity of the ion pair. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, v. 52, p. 236–253, 2003.
36. Sangeetha, K, Abraham, TE. Chemical modification of papain for use in alkaline medium. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. V38 p. 171-177. 2006.

37. Naeem A, Fatima S, Khan RH. Characterization of partially folded intermediates of papain in presence of cationic, anionic, and nonionic detergents at low pH. *Biopolymers* 2006; **83**(1): 1-10.
38. Golan R, Zehavi U, Naim M, Patchornik A, Smirnoff P, Herchman M. Inhibition of Papaya latex papain by photosensitive inhibitors. 1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)-2-nitroethene and 1,1-dicyano-2-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)-ethene. *Journal of Protein Chemistry* 2000; **19**(2): 117-22.
39. Kamphuis IG, Kalk KH, Swarte MB, Drenth J. Structure of papain refined at 1.65 Å resolution. *J Mol Biol* 1984; **179**(2): 233-56.
40. Kim MJ, Yamamoto D, Matsumoto K, et al. Crystal-structure of papain-e64-c complex - binding diversity of e64-c to papain s(2) AND S(3) SUBSITES. *Biochemical Journal* 1992; **287**: 797-803.
41. Drenth J, Jansonius JN, Koekoek R, Swen HM, Wolthers BG. Structure of papain. *Nature* 1968; **218**(5145): 929-+.
42. Merck index. 12 Edição. Whitehouse Station. p.1205. 1996.
43. Sanchez Neto, R.; Barone, B.; Teves, D. C.; Simões, M. J.; Novo, N. F.; Juliano, Y. – Aspectos morfológicos e morfométricos da reparação tecidual de feridas cutâneas de ratos com e sem tratamento com solução de papaína a 2%. *Acta Cir Bras.* 1993, **8**(1);18-23.
44. Ferreira AM Vieira LC, Rol JL. Revisão de estudos clínicos de enfermagem: Utilização de papaína para o tratamento de feridas. *Revista de enfermagem* 2005; **13**: 382-9.
45. Hax, G. Comparando os efeitos da utilização da papaína e AGE em lesões cutâneas: estudo experimental. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica e Ciências da Saúde, PUC-RS, 2009.
46. LM. S. Efeitos benéficos da papaína no processo terapêutico de lesões de pele. Abordagem multiprofissional do tratamento de feridas: São Paulo: Atheneu; 2003.
47. De Paola MVRV, Rodrigues LB, Dazzi C, Yamamoto JK, Kaneko TM. Avaliação da estabilidade da solução de papaína 2% p/v pelo método da coagulação do leite. *Farmácia & Química.* 1999; **32**(4):8-13.
48. Pieper B, Caliri MH. Nontraditional wound care: A review of the evidence for the use of sugar, papaya/papain, and fatty acids. *J Wound Ostomy Continence Nurs* 2003; **30**(4): 175-83.
49. Monetta L. – Análise evolutiva do processo de cicatrização em Úlceras diabéticas, de pressão e venosa com uso da papaína. Dissertação de Mestrado. São Paulo: EEUSP, 1998.
50. Otuka ES, et al. [The use of papain in plantar ulcers]. *Rev Bras Enferm* 1996; **49**(2):207-14. Portuguese.
51. Ferreira AM PN, Pereira APS, Ribeiro RCHM. O curativo de lesões abdominais por deiscência de sutura. *Rev Nursing.* 2002; **29**-34.
52. Monetta, L. A importância da atuação científica do enfermeiro na execução dos curativos feitos com papaína. *Revista Paulista de Enfermagem*, v. 9, n. 3, p. 83-87, 1990.
53. MVR. V. Desenvolvimento e padronização de gel contendo papaína para uso tópico. [dissertação de mestrado]. 1993. .
54. Monetta L. [The use of new dressing resources in the nursing consultation]. *Rev Paul Enferm* 1992; **11**(1): 19-26.
55. Flindt ML. Allergy to alpha-amylase and papain. *Lancet* 1979; **1**(8131): 1407-8.
56. Emeruwa AC. Antibacterial Substance from Carica-papaya fruit extract. *Journal of Natural Products* 1982; **45**(2): 123-7.

57. Lopes PS, Ruas GW, Baby AR, et al. In vitro safety assessment of papain on human skin: A qualitative Light and Transmission Electron Microscopy (TEM) study. *Revista Brasileira De Ciências Farmaceuticas* 2008; **44**(1): 151-6.
58. Velasco MVR. Desenvolvimento e padronização de gel contendo papaína para uso tópico [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; 1993.
59. Masini E, Calamo MA . Uma forma de tratamento de lesões cutâneas com papaína e sacarose . *Rev Bras Clin Terap.* 1986 ;15:208-13.
60. Falanga V. Wound bed preparation and the role of enzymes: a case for multiple actions of therapeutic agents. *Wounds* 2002;14(2):47-74.
61. Diez-Gomez ML, Quirce S, Cuevas M, et al. Fruit-pollen-latex cross-reactivity: implication of profilin (Bet v 2). *Allergy* 1999; **54**(9): 951-61.
62. Soto-Mera MT, Lopez-Rico MR, Filgueira JF, Villamil E, Cidras R. Occupational allergy to papain. *Allergy* 2000; **55**(10): 983-4.
63. Hewitt H, Wint Y, Talabere L, Lopez S, Bailey E, Parshad O, et al. The use of papaya on pressure ulcers. *Am J Nurs* 2002;102;73-7.
64. L. M. Uso da papaína nos curativos feitos pela enfermagem. *Rev bras enferm.* 1987 **66 -73**.
65. Costa, KB. Principais dosagens de papaína utilizadas em tratamentos de feridas em fibroblastos humanos in vitro e suas consequências nas MMPS E TIMPS. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de Enfermagem 2 da Faculdade de Ceilândia - Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Enfermagem. Brasília, 2016.
66. Leite, AP, Oliveira, BGRB, Soares MF, Barrocas DLR. Uso, e, et al. Uso e efetividade da papaína no processo de cicatrização de feridas: uma revisão sistemática. vol.33
67. Carrel A, Burrows MT. Cultivation of tissues in vitro and its technique. *J exp med* 1911; **13**(3): 387-96.
68. Isaac, C. Estudo in vitro da ação de pentoxifilina em fibroblastos oriundos de cicatrizes hipertróficas pós-queimadura e de pele não-cicatrizal [tese]. São Paulo: , Faculdade de Medicina; 2007 [citado 2021-09-25]. doi:10.11606/T.5.2007.tde-19022009-101816.
69. Organisation for economic co-operation and development (oecd/ocde). Series on testing and assessment Test No. 129: guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests, 2010.
70. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v.65, n.1-2, p.55-63, 1983.
71. Flindt M. Health and safety aspects of working with enzymes. *Process Biochemistry* 1978; **13**(8): 3-7.
72. Altran, SC. Efeitos in vitro da radiação infravermelha longa em fibroblastos humanos oriundos do leito de feridas crônicas de etiologia venosa [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina; 2018 [citado 2021-09-25]. doi:10.11606/T.5.2019.tde-08052019-111620.
73. Nicolosi, JT. Efeito in vitro da celulose oxidada regenerada, colágeno e prata na função dos fibroblastos oriundos de úlcera venosa [tese]. São Paulo: , Faculdade de Medicina; 2018 [citado 2021-09-25]. doi:10.11606/T.5.2019.tde-03012019-104351.
74. Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz ÁS. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research* 2003; **6**(3): 317-20.

75. McGaw LJ, Elgorashi EE, Eloff JN. 8 - Cytotoxicity of African Medicinal Plants Against Normal Animal and Human Cells. In: Kuete V, ed. *Toxicological Survey of African Medicinal Plants*: Elsevier; 2014: 181-233.
76. Akila, M., Sushama, A. and Kumaresan, R. 2014. Study on in vitro cytotoxicity of papain against liver cancer cell line hep g2. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* . 6, 9 (Sep. 2014), 160–161.
77. Gray H, et al. *Gray's anatomy: the anatomical basis of medicine and surgery*. Nova lorque: Churchill Livingstone; 1995. p.395-416.
78. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia molecular da célula*. Porto Alegre: Artmed; 2004. p.1090-125.
79. Kuhn K. Structure and biochemistry of collagen. *Aesthetic Plast Surg*. 1988;9(2):141-4.