UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

JAQUELINE MARTINS GEHLEN

Desenvolvimento e caracterização de equivalentes dérmicos associados a fármaco fotossensibilizante para estudos de fotoprocessos

Ribeirão Preto
2018

JAQUELINE MARTINS GEHLEN

Desenvolvimento e caracterização de equivalentes dérmicos associados a fármaco fotossensibilizante para estudos de fotoprocessos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco

Ribeirão Preto
2018

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Gehlen, Jaqueline Martins
Desenvolvimento e caracterização de equivalentes dérmicos associados a fármaco fotossensibilizante para estudos de fotoprocessos. Ribeirão Preto, 2018.
115 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.
Orientador: Tedesco, Antonio Claudio.

1. Engenharia Tecidual. 2. Equivalentes dérmicos. 3. Fotoprocessos. 4. Ftalocianina

FOLHA DE APROVAÇÃO

Jaqueline Martins Gehlen
Desenvolvimento e caracterização de equivalentes dérmicos associados a fármaco fotossensibilizante para estudos de fotoprocessos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco, obrigada por todo aprendizado adquirido, orientações e oportunidade de fazer parte de um grupo maravilhoso.

À minha família, principalmente meus pais Gisela e Marcelo. Obrigada pelo amor, incentivo e por acreditarem no meu potencial. Sem o apoio de vocês esta etapa não seria possível!

Aos meus companheiros CNTianos, obrigada pela força, amizade e bons momentos que passamos juntos dentro e fora do laboratório. Vocês são ótimos! Um agradecimento especial às "girls do CNET" Mary, Nathy e Tácila.

Ao Apê 84 e suas moradoras, obrigada por me acolherem e serem minha casa durante estes dois últimos anos.

A todos meus amigos que torceram por mim mesmo de longe.

À Olímpia, técnica do laboratório, obrigada pela paciência, dedicação e atenção!

À Universidade de São Paulo, docentes e funcionários do Departamento de Química da FFCLRP e da FCFRP.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

RESUMO

GEHLEN, J. M. **Desenvolvimento e caracterização de equivalentes dérmicos associados a fármaco fotossensibilizante para estudos de fotoprocessos.** 2018. 114f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Processos fotodinâmicos aplicados a sistemas biológicos têm sido utilizados *in vitro* e *in vivo* como uma modalidade terapêutica seletiva e não invasiva em diversas áreas da saúde, incluindo a Medicina Regenerativa. Neste trabalho, propomos o seu estudo na reparação e regeneração tecidual, pela utilização de um fármaco fotossensibilizante associado a um sistema de veiculação e sua ação fotobiológica, monitorada pela atividade celular (sistemas 2D e 3D). Para superar limitações do modelo celular convencional em monocamada, tais como baixa interação célula-célula e célula-matriz extracelular, propomos o uso de modelos tridimensionais de pele (denominados equivalentes dérmicos). Desta forma, algumas condições existentes *in vivo* podem ser mimetizadas *in vitro*, conduzindo à observação de um comportamento mais próximo à situação real. Os equivalentes dérmicos foram preparados através do cultivo celular em uma matriz de colágeno tipo I, que foi extraído de tendões da cauda de ratos *Wistar*. Foram escolhidas duas linhagens celulares para a padronização dos modelos tridimensionais: fibroblastos NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658^{TM}) e células-tronco humanas HBMS (Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells, ATCC® PCS-500-012^{TM}). Os ED produzidos foram monitorados por um período de 14 dias para o estudo do perfil de cinética de contração e também observamos a formação da matriz tridimensional de colágeno através da microscopia óptica. O perfil de contração observado é mais acentuado nos primeiros dias e tende a se estabilizar no final do período analisado. Fatores como concentração celular e de colágeno interferem nesta cinética. Estudos de histologia, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal também foram realizados para melhor caracterizar o modelo. Em uma segunda etapa deste trabalho, estudos de fotobiomodulação foram conduzidos nestes modelos celulares, associando-se o uso de fotoprocessos com luz visível de baixa intensidade (doses 70, 140 e 300 mJ/cm^2) e o fármaco fotossensibilizante ftalocianina de cloro alumínio (ClAlPc), veiculado em um sistema de liberação nanoestruturado clássico do tipo nanoemulsão. A expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs), enzimas associadas a eventos biológicos de remodelação da matriz extracelular, foi avaliada através da técnica de zimografia.

Palavras-chave: Engenharia Tecidual, Equivalentes Dérmicos, Fotoprocessos, Ftalocianina, Reparação e Regeneração Tecidual.

ABSTRACT

GEHLEN, J. M. **Development and characterization of dermal equivalents associated with photosensitizer drug for photoprocesses studies**. 2018. 114f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Photodynamic Process applied to biological systems has been used *in vitro* and *in vivo* as selective and noninvasive modality in several areas including Regenerative Medicine. In this research project, we propose to study wound healing and tissue regeneration, induced by the use of a photosensitizer drug into 2D and 3D cellular models. In order to perform experiments with high level of biological complexity, we propose to use three-dimensional tissue models (called dermal equivalents). The aim is to mimic *in vitro*, the conditions existing in *in vivo*, such as cell-cell contact and cell-extracellular matrix interactions, which cannot be observed in monolayer cultures. The dermal equivalents were obtained combing fibroblasts cells NIH /3T3 (ATCC® CRL-1658^{TM}) or Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells (ATCC® PCS-500-012^{TM}) with collagen matrix. Collagen type I was obtained from tail tendons of *Wistar* rats. The three-dimensional model was monitored over 14 days and to study the kinetic contraction, the diameter of each disc was measured. Also, the collagen matrix was evaluated by bright field microscopy. The classical profile observed is more pronounced in the early days and tends to stabilize at the end of the period. This kinetic can be modified by the concentration of cells and collagen. Histological analyses, scanning electron microscopy (SEM) and confocal microscopy were also important to describe this model. Second, photobiology tests were performed, combining low-intensity laser (70, 140 e 300 mJ/cm^2) and a classical Chloro Aluminum Phthalocyanine photosensitizer drug encapsulated into polymeric nanoemulsion. Matrix metalloproteinases (MMPs) expression in the cell culture was evaluated by zymography. These are endopeptidases associated with wound healing and remodeling processes.

Keywords: Tissue Engineering, Dermal Equivalents, Photoprocess, Phthalocyanine, Wound healing and Tissue Regeneration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Camadas da pele e seus constituintes celulares. A pele é dividida em epiderme, derme e hipoderme. Imagem adaptada de {Brohem, 2011 249 /id}. 2

Figura 2 - Fases da cicatrização de feridas. Imagem retirada de {Isaac, 2010 294 /id}. 4

Figura 3 – Processo de formação e organização das fibras de colágeno. Imagem retirada de {Ferreira da Silva, 2012 305 /id}. 6

Figura 4 - Estrutura química da ftalocianina de cloro alumínio ($C_{32}H_{16}AlClN_8$). Imagem retirada de {Siqueira-Moura, 2013 86 /id}.....11

Figura 5 - Diagrama de Jablonski representando os processos fotofísicos e fotoquímicos que ocorrem durante os processos fotodinâmicos. Imagem adaptada de {Calixto, 2016 293 /id}. 12

Figura 6 - Desenho representativo dos sistemas nanoestruturados. (a) nanolipossoma; (b) nanoemulsão; (c) nanopartícula lipídica sólida; (d) carreador lipídico nanoestruturado; (e) nanocápsula; (f) nanoesfera. Imagem retirada de {Pohlmann, 2016 300 /id}.....17

Figura 7 – Estrutura das microemulsões água-em-óleo (A/O) e óleo-em-água (O/A). Imagem adaptada de {Oliveira, 2004 331 /id}.....18

Figura 8 – Estrutura e classificação das Metaloproteinases de Matriz (MMPs). Imagem adaptada de {Löffek, 2011 334 /id}. 19

Figura 9 - Fibroblastos BJ (ATCC® CRL-2522™) cultivados em meio DMEM suplementado a 10% com SFB. À esquerda, baixa densidade e à direita, alta densidade. 22

Figura 10 - Fibroblastos NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™) cultivados em meio DMEM suplementado a 10% de SFB. À esquerda, baixa densidade e à direita, alta densidade.....23

Figura 11 - Células-tronco humanas HBMS (ATCC® PCS-500-012™) cultivadas em meio α-MEM suplementado a 10% de SFB. 24

Figura 12 – Esquema representativo das etapas da técnica de zimografia em gel. 32

Figura 13 - Acompanhamento da estabilidade da nanoemulsão de ClAlPc em função do tempo através da análise do tamanho médio de partículas e índice de polidispersão (IPd). 34

Figura 14 - Acompanhamento da estabilidade da nanoemulsão de ClAlPc em função do tempo através da análise do Potencial Zeta. 34

Figura 15 - Ensaio de biocompatibilidade *in vitro* da formulação nanoemulsão vazia (NE vazia) em cultura de fibroblastos NIH/3T3. CT = controle; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0% = porcentagem em volume de formulação. O ensaio foi realizado em triplicata, sendo n=16 poços para cada réplica. A significância estatística foi determinada pelo teste de variância One-Way ANOVA seguido do pós-teste Tukey t-test para múltiplas comparações ($p<0,05$). *Resultados que apresentaram significância estatística comparados com o grupo controle (CT). 36

Figura 16 - Ensaio de citotoxicidade *in vitro* da formulação nanoemulsão de ClAlPc em cultura de células-tronco HBMS, na ausência de luz. CT = controle; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 = concentração de ClAlPc/NE (µmol/L). O ensaio foi realizado em triplicata, sendo n=16 poços para cada réplica. A significância estatística foi determinada pelo teste de variância One-Way ANOVA seguido do pós-teste Tukey t-test para múltiplas comparações ($p<0,05$). *Resultados que apresentaram significância estatística comparados com o grupo controle (CT). 37

Figura 17 - Ensaio de citotoxicidade *in vitro* da formulação nanoemulsão de ClAlPc em cultura de fibroblastos humanos BJ, na ausência de luz. CT = controle; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e

10,0 = concentração de ClAlPc/NE (µmol/L). O ensaio foi realizado em triplicata, sendo n=16 poços para cada réplica. A significância estatística foi determinada pelo teste de variância One-Way ANOVA seguido do pós-teste Tukey t-test para múltiplas comparações (p<0,05). Não houve significância estatística entre as amostras. 38

Figura 18 - Ensaio de citotoxicidade *in vitro* da formulação nanoemulsão de ClAlPc após 24 horas de incubação em cultura de fibroblastos NIH/3T3, na ausência de luz. CT = controle; 0,5; 1,0; 3,0; 5,0 = concentração de ClAlPc/NE (µmol/L). O ensaio foi realizado em triplicata, sendo n=16 poços para cada réplica. A significância estatística foi determinada pelo teste de variância One-Way ANOVA seguido do pós-teste Tukey t-test para múltiplas comparações (p<0,05). Não houve significância estatística entre as amostras. 38

Figura 19 - Microscopia confocal *in vitro*. DAPI (azul): núcleo celular; Faloidina (verde): citoplasma; ClAlPc (vermelho). 40

Figura 20 - Curva de linearidade do padrão de hidroxiprolina (triplicata). O coeficiente de correlação linear obtido foi de 0,9947 (Equação de reta: y = 0,2207x + 0,0256). 43

Figura 21 - Perfil de contração médio dos equivalentes dérmicos preparados com fibroblastos humanos BJ (ATCC® CRL-2522™) ($1x10^5$ células/ED) ao longo de 14 dias. Considerou-se como diâmetro inicial o tamanho interno de uma placa de Petri de 60 mm (53 mm). 45

Figura 22 - Fotografias dos equivalentes dérmicos (ED) em meio DMEM 10% completo nas placas de Petri de 60 mm de diâmetro para cultura celular em suspensão ao longo dos 14 dias de monitoramento. D1, 2, 3, 5, 7, 10 e 14 = dias após o preparo. Linhagem celular de fibroblastos humanos BJ (ATCC® CRL-2522™) $1x10^5$ células/ED. 46

Figura 23 - Micrografias mostrando a matriz tridimensional de colágeno dos equivalentes dérmicos. A = 24 horas; B = 48 horas; C = 3 dias; D = 5 dias; E = 7 dias após o preparo. Linhagem celular de fibroblastos humanos BJ (ATCC® CRL-2522™) $1x10^5$ células/ED. Imagens obtidas com conjunto de objetivas A-Plan 10x/0,25 Ph1, adaptado com uma câmera digital Canon 7.2 Mpixels. 47

Figura 24 - Desenho esquemático do processo de contração em uma matriz de colágeno. (a) inicialmente as células estão espalhadas na matriz extracelular (b) as células adquirem morfologia alongada e se aderem às fibras de colágeno através de proteínas de membrana como a integrinas (c) as células "puxam" as fibras fazendo com que estas se curvem (d) as células de desprendem e se aderem às outras fibras resultando no processo de contração. Imagem retirada e adaptada de ({Ahearne, 2014 306 /id}. 48

Figura 25 - Gráfico do inverso do diâmetro D (mm) dos equivalentes dérmicos *versus* tempo de contração em dias. 49

Figura 26 - Microscopia eletrônica de varredura dos equivalentes dérmicos 14 dias após o preparo. Linhagem de células-tronco HBMS ($6x10^5$ células/ED). Aumento de 500 X, 1.50 K X e 5.00 K X. 51

Figura 27 - Microscopia eletrônica de varredura dos equivalentes dérmicos 14 dias após o preparo. Linhagem de fibroblastos NIH/3T3 ($6x10^5$ células/ED). Aumento de 500 X, 1.50 K X e 5.00 K X. 51

Figura 28 - Imagens de histologia dos equivalentes dérmicos 14 dias após o preparo. Acima com a linhagem de fibroblastos NIH/3T3 ($6x10^5$ células/ED) e abaixo com a linhagem de células-tronco HBMS ($6x10^5$ células/ED). Cortes horizontais e verticais de 9µm. Coloração hematoxilina-eosina e Tricromo de Masson. 53

Figura 29 - Perfil de contração dos equivalentes dérmicos ao longo de 14 dias. Considerou-se como diâmetro inicial o tamanho interno de uma placa de Petri de 60 mm (53 mm). G2 =

$3x10^5$ células/ED; G3 = $6x10^5$ células/ED e G4 = $1x10^6$ células/ED. Linhagem celular de fibroblastos NIH/3T3.....54

Figura 30 - Fotografias dos equivalentes dérmicos (ED) em meio DMEM 10% completo nas placas de Petri de 60 mm de diâmetro ao longo dos 14 dias de monitoramento. Linhagem celular de fibroblastos NIH/3T3. G2 = $3x10^5$ células/ED; G3 = $6x10^5$ células/ED e G4 = $1x10^6$ células/ED. D1, D2, D3, D5, D7, D10 e D14 = dias após o preparo dos ED. 55

Figura 31 - Micrografias da matriz tridimensional de colágeno nos equivalentes dérmicos variando a concentração celular inicial. Linhagem celular de fibroblastos NIH/3T3. G2 = $3x10^5$ células/ED; G3 = $6x10^5$ células/ED e G4 = $1x10^6$ células/ED. D1, D2, D3, D5 e D7 = dias após o preparo dos ED. Imagens obtidas com conjunto de objetivas A-Plan 10x/0,25 Ph1, adaptado com uma câmera digital Canon 7.2 Mpixels.....57

Figura 32 - Perfil de contração dos equivalentes dérmicos ao longo de 14 dias. Considerou-se como diâmetro inicial o tamanho interno de uma placa de Petri de 60 mm (53 mm). Colágeno 1 = lote recente; colágeno 2 e 3 = lotes antigos. Linhagem celular de fibroblastos NIH/3T3 ($6x10^5$ células/ED).....58

Figura 33 - Fotografias dos equivalentes dérmicos (ED) em meio DMEM 10% completo nas placas de Petri de 60 mm de diâmetro ao longo dos 14 dias de monitoramento. D3, D5, D7 e D14 = dias após o preparo. Linhagem celular de fibroblastos NIH/3T3 ($6x10^5$ células/ED). Colágeno 1 = lote recente; colágeno 2 e 3 = lotes antigos. 59

Figura 34 - Micrografias da matriz tridimensional de colágeno dos equivalentes dérmicos no 5º dia após o preparo. COL1 = lote recente; COL2 e 3 = lotes antigos. Linhagem celular de fibroblastos NIH/3T3 ($6x10^5$ células/ED). Imagens obtidas com conjunto de objetivas A-Plan 10x/0,25 Ph1, adaptado com uma câmera digital Canon 7.2 Mpixels. 60

Figura 35 - Perfil de contração dos equivalentes dérmicos ao longo de 14 dias. Considerou-se como diâmetro inicial o tamanho interno de uma placa de Petri de 60 mm (53 mm). Colágeno 2 e 3 = lotes antigos. Linhagem celular de células-tronco HBMS ($6x10^5$ células/ED).....60

Figura 36 - Fotografias dos equivalentes dérmicos (ED) em meio DMEM 10% completo nas placas de Petri de 60 mm de diâmetro ao longo dos 14 dias de monitoramento. D1, D3, D5, D7 e D14 = dias após o preparo. Linhagem celular de células-tronco HBMS ($6x10^5$ células/ED). Colágeno 2 e 3 = lotes antigos.....61

Figura 37 - Micrografias da matriz tridimensional de colágeno dos equivalentes dérmicos no 1º, 3º e 5º dias após o preparo. COL1 = lote recente; COL2 e 3 = lotes antigos. Linhagem celular de células-tronco HBMS ($6x10^5$ células/ED). Imagens obtidas com conjunto de objetivas A-Plan 10x/0,25 Ph1, adaptado com uma câmera digital Canon 7.2 Mpixels. 63

Figura 38 - Perfil de contração dos equivalentes dérmicos ao longo de 14 dias. Considerou-se como diâmetro inicial o tamanho interno de uma placa de Petri de 60 mm (53 mm). G1 = $1x10^5$ células/ED; G2 = $3x10^5$ células/ED e G3 = $6x10^5$ células/ED. Linhagem celular de fibroblastos NIH/3T3.....64

Figura 39 - Imagens de histologia dos equivalentes dérmicos preparados com $1x10^5$ células/ED e $3x10^5$ células/ED de fibroblastos NIH/3T3, sete dias após o preparo. Coloração hematoxilina-eosina (HE). Aumento de 10X. 65

Figura 40 - Perfil de contração dos equivalentes dérmicos ao longo de 14 dias de acordo com a concentração de colágeno. Considerou-se como diâmetro inicial o tamanho interno de uma placa de Petri de 60 mm (53 mm). G1 = 1,5 mL de colágeno; G2 = 2,0 mL de colágeno e G3 = 2,5 mL de colágeno. Linhagem celular de fibroblastos NIH/3T3. Acima, $1x10^5$ células/ED e abaixo, $2x10^5$ células/ED.....66

Figura 41 – Micrografias da matriz tridimensional de colágeno dos equivalentes dérmicos no 5º e 10º dias após o preparo. G1 = 1,5 mL de colágeno; G2 = 2,0 mL de colágeno e G3 = 2,5 mL de colágeno. Linhagem celular de fibroblastos NIH/3T3 $1x10^5$ células/ED. Imagens obtidas com conjunto de objetivas A-Plan 10x/0,25 Ph1, adaptado com uma câmera digital Canon 7.2 Mpixels.....67

Figura 42 - Imagens de histologia dos equivalentes dérmicos com variação da concentração de colágeno, sete dias após o preparo. Linhagem de fibroblastos NIH/3T3 ($2x10^5$ células/ED). Coloração hematoxilina-eosina (HE). Aumento de 10X.....68

Figura 43 - Diâmetro dos equivalentes dérmicos. D-1 = Dia de incubação com ClAlPc/NE; D0 = Dia de aplicação da luz de baixa intensidade nas diferentes doses (20, 40 e 70 mJ/cm^2). D1; D2; D3; D5; D7; D10; D12; D14 = dias após irradiação. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste de variância One-Way ANOVA seguido do pós-teste Tukey t-test para múltiplas comparações ($p<0,05$).....70

Figura 44 - Micrografias dos equivalentes dérmicos mostrando a matriz tridimensional de colágeno. Grupo CONTROLE = meio DMEM 10 % completo. D1; D3; D5 e D7 = dias após irradiação. 71

Figura 45 - Micrografias dos equivalentes dérmicos mostrando a matriz tridimensional de colágeno. Grupo CONTROLE ESCURO = somente incubação com ClAlPc/NE por 30 minutos. D1; D3; D5 e D7 = dias após irradiação.....71

Figura 46 - Micrografias dos equivalentes dérmicos mostrando a matriz tridimensional de colágeno. Grupo 70 mJ/cm^2 = incubação com ClAlPc/NE por 30 minutos e aplicação da dose de energia 70 mJ/cm^2 após 24 horas. D1; D3; D5 e D7 = dias após irradiação. 71

Figura 47 - Fotografias dos equivalentes dérmicos (ED) em meio DMEM 10% completo nas placas de Petri de 60 mm de diâmetro ao longo dos 14 dias de monitoramento. Linhagem celular de fibroblastos NIH/3T3 ($3x10^5$ células/ED). CT = controle (sem tratamento); NE VAZIA = nanoemulsão sem ClAlPc; ClAlPc/NE = nanoemulsão com ClAlPc na concentração 3µmol/L; Pc livre = ClAlPc dissolvida em DMSO; CT DMSO = somente DMSO 0,2% (v/v). O tratamento foi realizado do D4 após preparo dos ED. D3, D5, D7, D10 e D14 = dias após o preparo. 73

Figura 48 - Perfil de contração dos equivalentes dérmicos ao longo de 14 dias. Considerou-se como diâmetro inicial o tamanho interno de uma placa de Petri de 60 mm (53 mm). Linhagem celular de fibroblastos NIH/3T3 ($3x10^5$ células/ED). CT = controle (sem tratamento); NE VAZIA = nanoemulsão sem ClAlPc; NEPc = nanoemulsão com ClAlPc na concentração 3µmol/L; Pc livre = ClAlPc dissolvida em DMSO; CT DMSO = somente DMSO 0,2% (v/v). O tratamento foi realizado do D4 após preparo dos ED.....74

Figura 49 - Diâmetro dos equivalentes dérmicos. D1; D3; D5; D7; D12; D18; D21 = dias após o preparo dos equivalentes dérmicos. D4 = Dia de incubação com ClAlPc/NE 3µmol/L; D5 = Dia de aplicação da luz de baixa intensidade nas diferentes doses (70, 140 e 300 mJ/cm^2). Linhagem celular de fibroblastos NIH/3T3 ($2x10^5$ células/ED).....75

Figura 50 – Microscopia confocal dos equivalentes dérmicos 24 horas após irradiação (D6 após o preparo). Linhagem celular de fibroblastos NIH/3T3 ($2x10^5$ células/ED). Grupo controle no escuro (CTE) = 3µmol/L ClAlPc/NE. Excitação da ClAlPc em 610-675 nm (vermelho). 76

Figura 51 – Gel de zimografia das amostras de meio de cultura da linhagem de fibroblastos NIH/3T3, coletados no D8. O fibrosarcoma HT-1080 foi utilizado como padrão para determinação das bandas de referencia. 78

Figura 52 - Gel de zimografia das amostras de meio de cultura da linhagem de fibroblastos NIH/3T3, coletados no D13. O fibrosarcoma HT-1080 foi utilizado como padrão para determinação das bandas de referência. 78

Figura 53 - Diâmetro dos equivalentes dérmicos. D1; D2; D3; D6; D8; D12; D14; D16; D21 = dias após o preparo dos equivalentes dérmicos. D4 = Dia de incubação com ClAlPc/NE 3µmol/L; D5 = Dia de aplicação da luz de baixa intensidade nas diferentes doses (70, 140 e 300 mJ/cm^2). Linhagem de células-tronco HBMS (2x10^5 células/ED). 80

Figura 54 - Fotografias dos equivalentes dérmicos (ED) em meio DMEM 10% completo nas placas de Petri de 60 mm de diâmetro 1 dia após o preparo e após 21 dias de monitoramento. Linhagem células-tronco HBMS (2x10^5 células/ED). CT = controle (sem tratamento); CTL = controle luz; CT Pc livre = ClAlPc dissolvida em DMSO; CTE = ClAlPc/NE 3µmol/L sem irradiação; e grupos tratados com ClAlPc/NE 3µmol/L + 70, 140 e 300 mJ/cm^2..... 81

Figura 55 – Imagens de microscopia confocal dos equivalentes dérmicos 24 horas após irradiação (D6 após o preparo) e no D13. Linhagem células-tronco HBMS (2x10^5 células/ED). Excitação da ClAlPc (vermelho) em 610-675 nm e GFP (verde) em 500-524 nm. 83

Figura 56 – Imagens de microscopia confocal no D13 em regiões diferentes do mesmo equivalente dérmico (grupo controle). Linhagem células-tronco HBMS (2x10^5 células/ED). Excitação do GFP (verde) em 500-524 nm. 84

Figura 57 - Gel de zimografia das amostras de meio de cultura da linhagem de células-tronco HBMS, coletados no D8. O fibrosarcoma HT-1080 foi utilizado como padrão para determinação das bandas de referência 85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais substitutos cutâneos encontrados comercialmente no mundo. *EpiSkin produz tecidos humanos somente para análises *in vitro*. 8

Tabela 2 – Diâmetro (em cm) dos equivalentes dérmicos monitorados por 14 dias após o preparo (D0 = dia do preparo). 44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
α – MEM	*Minimum Essential Medium Alpha Medium*
ATCC	American Type Culture Colection
ANOVA	Análise de Variância
ClAlPc	Ftalocianina de cloro alumínio
ClAlPc/NE	Nanoemulsão de cloro alumínio ftalocianina
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CT	Controle
CTE	Controle no escuro
CTL	Controle luz
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DMEM	*Dulbecco´s Modified Eagle Medium*
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade óptica ou absorbância
ED	Equivalente dérmico
EHL	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
GFP	Green fluorescent protein
HE	Hematoxilina-eosina
HeNe	Hélio-Neônio
IPd	Índice de polidispersão
ISO	International Organization
kDa	Kilodalton
LED	Light Emitting Diode
LOX	Lisil oxidase
ME	Microemulsão
MEC	Matriz extracelular
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MMPs	Metaloproteinases de matriz

MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazolio
NE	Nanoemulsão
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
pH	Potencial hidrogeniônico
RENAMA	Rede Nacional de Métodos Alternativos
RHE	Epiderme humana reconstituída
Rpm	Rotação por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TFD	Terapia Fotodinâmica
TIMPS	Inibidores teciduais de metaloproteinases
TM	Tricromo de Masson
UV-VIS	Ultravioleta visível

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
λ	Comprimento de onda de radiação eletromagnética
ε	Coeficiente de absortividade molar
ξ	Potencial zeta
r	Coeficiente de correlação
™	Trademark
®	Marca Registrada
V	Volts
v/v	volume/volume

SUMÁRIO

RESUMO ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
LISTA DE FIGURAS ..... **iii**
LISTA DE TABELAS ..... **viii**
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS ..... **ix**
LISTA DE SÍMBOLOS ..... **xi**
SUMÁRIO ..... **xii**

I- INTRODUÇÃO **1**
1.1- Anatomia da pele e o processo de cicatrização 1
1.2- O colágeno e a matriz extracelular 4
1.3- Engenharia tecidual e o modelo celular tridimensional de pele 7
1.4- Os fármacos fotossensibilizantes: Ftalocianinas 10
1.5- Fotobiomodulação: Uso dos Processos Fotodinâmicos 13
1.5.1- Mecanismos moleculares da ação da luz de baixa intensidade 15
1.6- Nanotecnologia e o desenvolvimento de sistemas carreadores de fármacos 16
1.7- As Metaloproteinases de Matriz (MMPs) 18
II- OBJETIVOS **21**
III- MATERIAIS E MÉTODOS **22**
3.1- Cultura celular 22
3.1.1- Protocolo de cultivo celular dos fibroblastos BJ 22
3.1.2- Protocolo de cultivo celular dos fibroblastos NIH/3T3 22
3.1.3- Protocolo de cultivo celular das células-tronco HBMS 23
3.1.4- Micrografias das culturas celulares 24
3.1.5- Procedimento para contagem celular (Azul de Tripan) 24
3.2- Sistema de veiculação nanoestruturado 25
3.2.1- Preparo da nanoemulsão de ftalocianina 25
3.2.2- Caracterização físico-química da nanoemulsão 25
3.3- Ensaio de viabilidade celular pelo teste de MTT 26
3.4- Colágeno tipo I 27
3.4.1- Extração do colágeno do tipo I 27
3.4.2- Diálise da solução de colágeno 27
3.4.3- Dosagem do colágeno 27
3.5- Protocolo de preparo dos Equivalentes Dérmicos (ED) 28
3.5.1- Monitoramento dos equivalentes dérmicos 29
3.6- Estudos aplicados de fotobiomodulação nos equivalentes dérmicos 29
3.7- Microscopia Confocal (monocamada) 30

3.8- Histologia 30
3.9- Microscopia Eletrônica de Varredura 31
3.10- Zimografia 31
IV- RESULTADOS E DISCUSSÃO 33
4.1- Acompanhamento da estabilidade da nanoemulsão de ClAlPc 33
4.2- Ensaio de biocompatibilidade da nanoemulsão 35
4.3- Ensaio de citotoxicidade da nanoemulsão de ClAlPc 36
4.4- Microscopia Confocal em monocamada 39
4.5- Extração do colágeno tipo I 40
4.6- Quantificação do colágeno do tipo I 43
4.7- Preparo dos Equivalentes Dérmicos e determinação da cinética de contração 44
4.8- Microscopia Eletrônica de Varredura 50
4.9- Histologia 52
4.10- Estudos com os Equivalentes Dérmicos: fatores que influenciam a cinética de contração 54
4.10.1- Influência da concentração celular na contração dos ED 54
4.10.2- Influência do colágeno na cinética de contração dos ED 58
4.10.3- Comportamento da linhagem celular na cinética de contração dos ED 60
4.10.4- Influência da concentração de colágeno na cinética de contração dos equivalentes dérmicos 63
4.11- Estudos aplicados de fotobiomodulação nos equivalentes dérmicos 69
4.11.1- Tratamento dos ED com nanoemulsão de ClAlPc 10 µmol/L e luz de baixa intensidade 69
4.11.2- Comportamento dos equivalentes dérmicos na presença de ClAlPc sem irradiação 72
4.11.3- Tratamento dos ED com nanoemulsão de ClAlPc 3µmol/L e luz de baixa intensidade 74
4.11.4- Zimografia: Avaliação da expressão das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 77
4.12- Estudos aplicados de fotobiomodulação nos equivalentes dérmicos com a linhagem de células-tronco HBMS 79
V- CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS 87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 89

I- INTRODUÇÃO

1.1- Anatomia da pele e o processo de cicatrização

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano e ela está histologicamente organizada em três camadas superpostas: epiderme (camada mais externa), derme e hipoderme, além dos anexos como pelos, glândulas sudoríparas e sebáceas. Sua principal função está relacionada com a proteção dos tecidos subjacentes e também regulação da temperatura corporal (KANITAKIS, 2002; WICKETT e VISSCHER, 2006; BOUWSTRA e PONEC, 2006).

A epiderme compõe a camada mais externa da pele e é um tecido estratificado que está em constante renovação. Ela geralmente é subdividida em 5 estratos, que são organizados de acordo com o grau de diferenciação dos queratinócitos: basal, espinhoso, granuloso, lúcido e córneo (mais externo). A etapa final na maturação dos queratinócitos está associada a mudanças na sua estrutura e composição e ocorre a sua transformação em corneócitos. Os corneócitos são células anucleadas e achatadas constituídas principalmente de queratina e água, envolvidas por lipídeos lamelares. Por isso, o estrato córneo funciona como uma barreira à perda de água e à entrada de moléculas estranhas, impedindo a desidratação e protegendo o organismo do ambiente externo, respectivamente. Na epiderme também existem os melanócitos e algumas células do sistema imunológico, como as células de Langerhans (WICKETT e VISSCHER, 2006; BROHEM et al., 2011; BOUWSTRA e PONEC, 2006).

A derme é um tecido conjuntivo composto principalmente de fibroblastos, elementos fibrilares (como colágeno tipo I e elastina) e outros elementos da matriz extracelular, como por exemplo, proteínas estruturais, glicosaminoglicanos, ácido hialurônico e outros (VENUS , WATERMAN e MCNAB, 2010; WONG , MCGRATH e NAVSARIA, 2007). Há também a presença de vários apêndices, como folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas, além de terminações nervosas e vasos sanguíneos e linfáticos.

Abaixo da derme, encontra-se a hipoderme que é composta principalmente de células adiposas. O tecido adiposo proporciona proteção mecânica, mantém a temperatura corporal regulada e funciona como um reservatório de energia (BARONI et al., 2012).

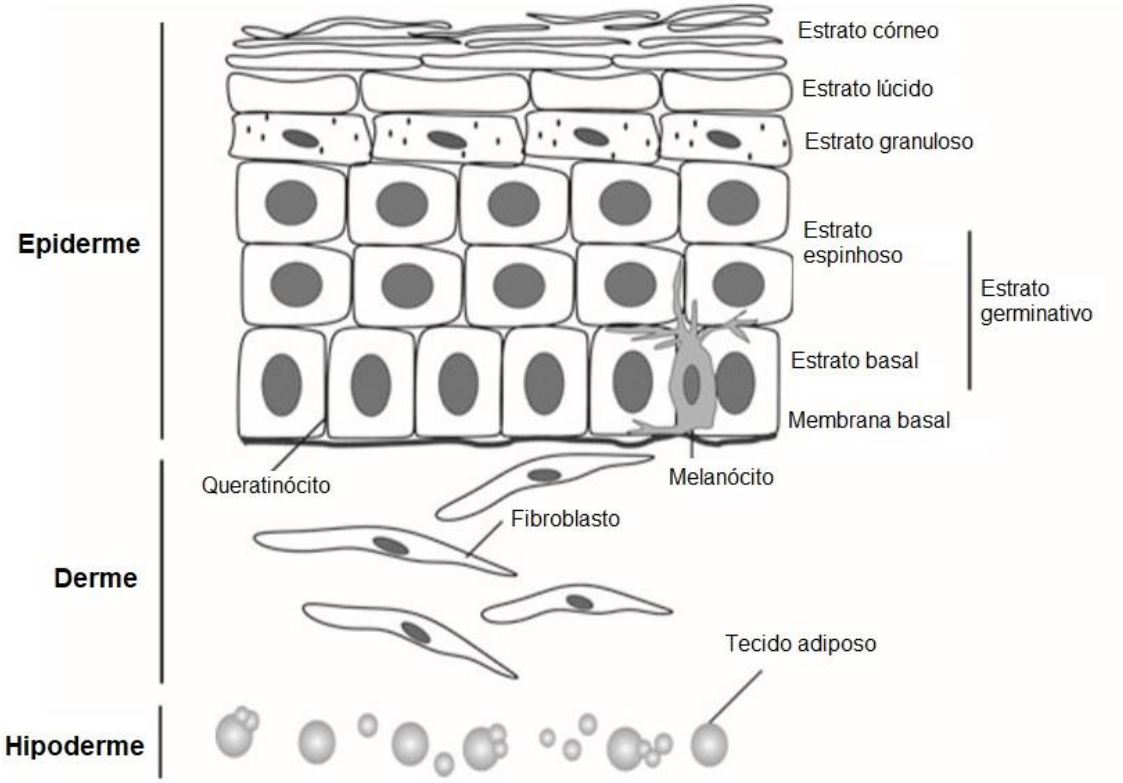

Figura 1 - Camadas da pele e seus constituintes celulares. A pele é dividida em epiderme, derme e hipoderme. Imagem adaptada de (BROHEM et al., 2011).

A cicatrização de feridas é um processo complexo que compreende uma sequência de eventos celulares e moleculares para que ocorra a restauração do tecido lesado e será brevemente descrito aqui. Alguns autores dividem o processo de cicatrização em 5 fases principais que podem se sobrepor de forma contínua e temporal:

1. Coagulação
2. Inflamação
3. Proliferação
4. Contração da ferida
5. Remodelação

A fase de coagulação inicia-se imediatamente após o surgimento da ferida. A agregação plaquetária e a coagulação formam um tampão rico em fibrina, que age como uma barreira contra a invasão de microrganismos e funciona como uma matriz provisória para a migração celular. Intimamente ligada à fase anterior, a inflamação depende da liberação de inúmeros mediadores químicos e migração de células inflamatórias como leucócitos

polimorfonucleares, linfócitos e macrófagos que irão fagocitar bactérias, corpos estranhos e fragmentos celulares (MENDONÇA e COUTINHO-NETTO, 2009)

A fase proliferativa é responsável pelo fechamento da feriada propriamente dita, e compreende três eventos: reepitelização, fibroplasia e angiogênese. A reepitelização inicia-se horas após a lesão com a migração de células epiteliais (queratinócitos) a partir das bordas da ferida e dos apêndices epidérmicos. A segunda fase da proliferação inclui a fibroplasia e formação da matriz que irá compor o tecido de granulação. Nesta etapa, os fibroblastos desempenham um papel crítico na síntese da nova matriz, produzindo colágeno, elastina, fibronectina, glicosaminoglicanas e proteases (MANDELBAUM , DI SANTIS e MANDELBAUM, 2003). Ocorre também o aumento da permeabilidade vascular e a produção de novos vasos sanguíneos a partir de vasos já pré-existentes (processo denominado angiogênese) para suprir a demanda de nutrientes e oxigênio do tecido em crescimento (MENDONÇA e COUTINHO-NETTO, 2009).

A contração da ferida é caracterizada pelo movimento centrípeto das bordas da ferida, reduzindo a quantidade e o tamanho da cicatriz desordenada. Este evento é importante, principalmente, para o fechamento das feridas classificadas como “abertas” (MARIA DE FÁTIMA , ANDRADE e MORIYA, 2008).

Seguindo o processo de maturação da ferida, ocorre a fase de remodelação que é caracterizada principalmente pelo aumento da resistência do tecido. Primeiramente ocorre a mudança do tipo de colágeno que compõem a matriz. Nas fases iniciais do processo de cicatrização ocorre o estímulo para síntese de colágeno tipo III, que posteriormente é substituído pelo tipo I. Há, portanto, um equilíbrio de produção e destruição das fibras de colágeno por ação de colagenases (tipo de metaloproteinases de matriz). (ISAAC et al., 2010) (MARIA DE FÁTIMA , ANDRADE e MORIYA, 2008).

Juntamente com esta substituição, ocorre uma alteração na organização das fibrilas de colágeno, as quais mudam sua disposição de fibras paralelas para fibras entrelaçadas ao longo das linhas de tensão, devido ao aumento das ligações transversais. Em suma, a fase de remodelamento da cicatriz envolve eventos sucessivos de produção, digestão e orientação das fibrilas de colágeno (BALBINO , PEREIRA e CURI, 2005).

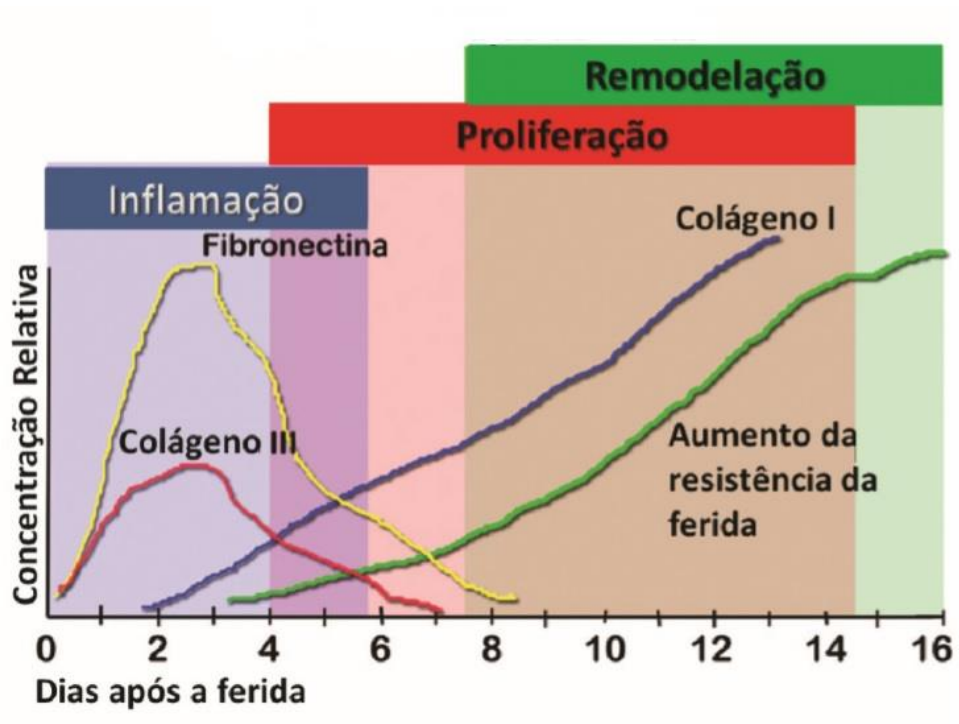

Figura 2 - Fases da cicatrização de feridas. Imagem retirada de (ISAAC et al., 2010).

1.2- O colágeno e a matriz extracelular

O colágeno é a proteína estrutural mais abundante presente na matriz extracelular. Ele é encontrado nos tecidos conjuntivos, tais como, pele, cartilagens, tendões, veias, ossos, dentes, músculos e camada córnea dos olhos (FERREIRA DA SILVA e BARRETTO PENNA, 2012).

A molécula de colágeno é constituída de três cadeias α polipeptídicas paralelas, cada uma contendo uma sequência característica de aminoácidos e dispostas em uma conformação helicoidal denominada poliprolina tipo II. Estas três cadeias se enovelam umas sobre as outras formando uma tripla hélice rígida com orientação para a direita. Esta conformação é estabilizada por ligações de hidrogênio que podem ser quebradas por desnaturação química ou térmica, resultando no desempacotamento da molécula de colágeno (SHOULDERS e RAINES, 2009; KNAGGS, 1992).

Por sua vez, as cadeias α da molécula de colágeno são compostas por uma sequência repetitiva de 3 aminoácidos, sendo a glicina o terceiro resíduo de aminoácido encontrado (XYGly). Os aminoácidos mais comuns nas posições X e Y são a 2S-prolina (28%) e a (2S,

4R)-4-hidroxiprolina (38%) respectivamente, formando a sequência tripla de aminoácidos (ProHypGly) mais comum encontrada no colágeno (10.5%) (SHOULDERS e RAINES, 2009; KNAGGS, 1992).

A estrutura de tripla hélice é estabilizada por ligações de hidrogênio entre o NH do resíduo de glicina com a carbonila (C=O) do polipeptídeo adjacente. Os resíduos pequenos de glicina encontram-se arranjados no interior da tripla hélice, enquanto que os outros aminoácidos geralmente estão dispostos no exterior. Além disso, a repulsão estérica entre uma prolina e uma hidroxiprolina gera um ângulo (C-N) fixo que permite que as cadeias α se entrelacem formando a tripla hélice (HOLMES et al., 2017).

As triplas hélices de colágeno individuais são denominadas de tropocolágeno, que se organizam de forma complexa para formar fibrilas e fibras de colágeno encontradas nos tecidos (Figura 3).

Na maioria dos tipos de colágeno (principalmente nos fibrilares), as moléculas produzidas são secretadas na forma de procolágeno, que possui peso molecular maior que a forma processada encontrada normalmente na matriz extracelular. Nestas moléculas precursoras (procolágeno), cada cadeia polipeptídica possui duas estruturas globulares de peptídeos contendo NH2- e COOH-terminais nas extremidades, denominados propeptídeos (KNAGGS, 1992).

Na matriz extracelular, ocorre a ação de pelo menos duas peptidases diferentes (C- e N-peptidades) para clivar os propeptídeos e transformar o procolágeno em colágeno.

Estas estruturas globulares ligadas ao procolágeno ocupam um grande espaço ao redor da molécula gerando impedimento estéreo, por isso, para que ocorra o processo de fibrilogênese (formação das fibrilas de colágeno) é necessária a ação destas enzimas (FERREIRA DA SILVA e BARRETTO PENNA, 2012; KNAGGS, 1992).

O alinhamento das moléculas de colágeno e sua organização supramolecular ocorrem espontaneamente, porém a força e resistência das fibras de colágeno somente são obtidas após o estabelecimento de ligações covalentes entre as moléculas. As ligações cruzadas mais comuns encontradas entre as moléculas de colágeno tipo I ocorrem nos resíduos de lisina e hidroxilisina. Primeiramente, ocorre a síntese de resíduos de aldeído, através da reação enzimática catalisada pela ação de uma lisil oxidade (LOX), na qual ocorre a remoção de um grupamento ε-amino dos resíduos de lisina e hidroxilisina. Este aldeído então reage com o grupo amino de uma molécula de colágeno adjacente formando uma ligação cruzada do tipo base de Schiff (YAMAUCHI e SHIIBA, 2008; RUCKER e MURRAY, 1978).

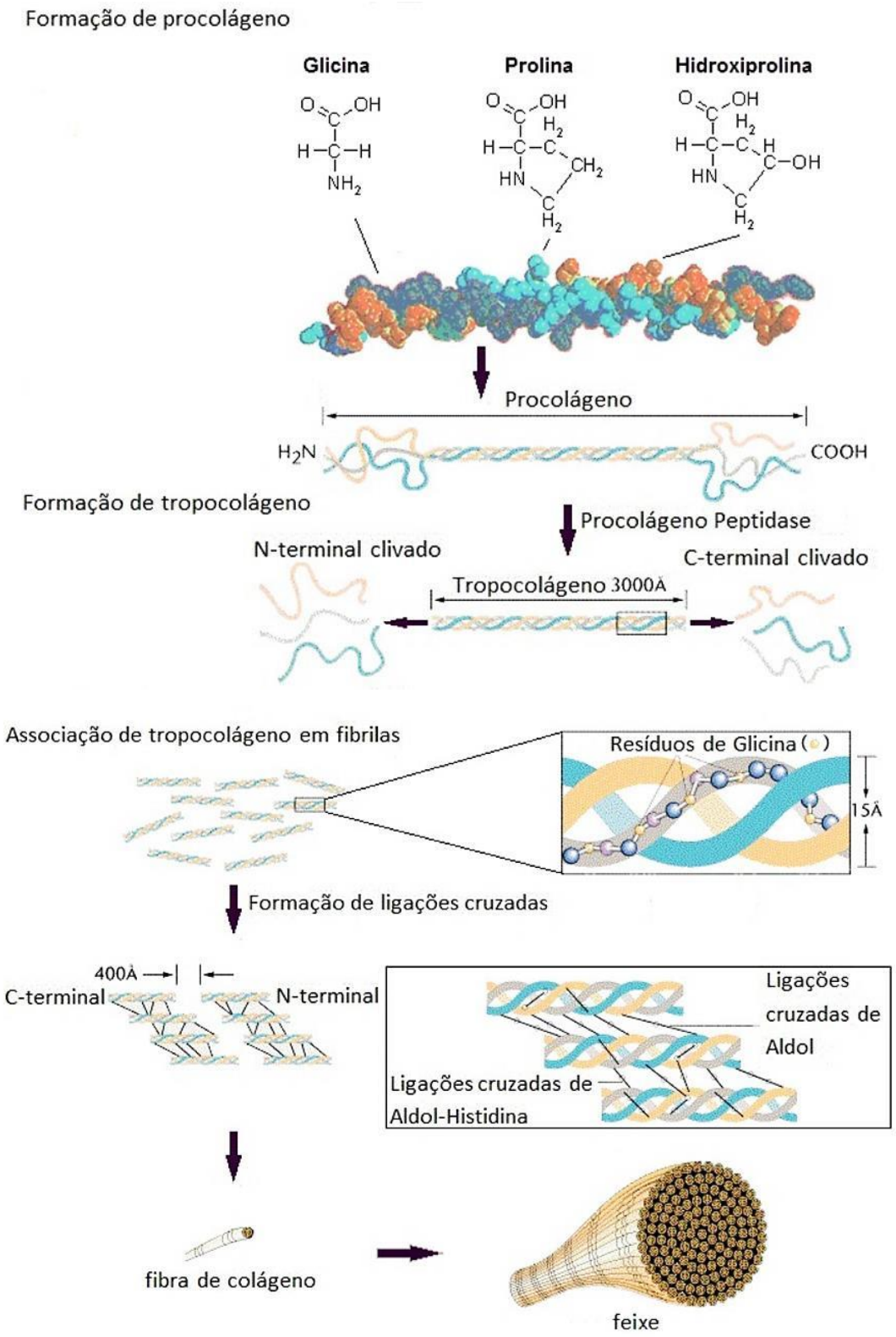

Figura 3 – Processo de formação e organização das fibras de colágeno. Imagem retirada de (FERREIRA DA SILVA e BARRETTO PENNA, 2012).

1.3- Engenharia tecidual e o modelo celular tridimensional de pele

A engenharia tecidual é um campo multidisciplinar formado pela interação das ciências da vida, ciências físicas e engenharia, cujo objetivo principal é o desenvolvimento de opções terapêuticas para a reparação, manutenção ou substituição da função biológica (LANGER e VACANTI, 2016).

Embora o cultivo de células *in vitro* seja realizado há muitos anos, a possibilidade de cultivar tecidos tridimensionais complexos é recente (Madureira et al., 2010). A cultura em monocamada é uma ferramenta muito importante para o desenvolvimento científico, porém, as respostas obtidas nem sempre são satisfatórias, uma vez que o comportamento das células em monocamada quase sempre difere daquele observado *in vivo*. Uma das limitações deste método experimental é a falta de interações célula-célula e célula-matriz (HERRMANN et al., 2014). Já nos modelos de cultura celular 3D, o contato da matriz extracelular com as culturas celulares simples ou mistas, permitem um entendimento muito mais complexo do processo.

A pele foi o primeiro tecido humano a ser reconstruído *in vitro* através da engenharia tecidual, por volta de 1980. Bell e colaboradores (BELL , IVARSSON e MERRILL, 1979; BELL et al., 1983) foram os pioneiros na preparação de modelos com estrutura tridimensional (3D). O modelo proposto foi uma combinação de fibroblastos, queratinócitos e matriz de colágeno, formando duas camadas: uma derme (composta por fibroblastos e colágeno) e uma epiderme (composta por queratinócitos). Este modelo permitiu o estudo de funções dos fibroblastos, como contração e remodelamento da matriz extracelular, que não podiam ser avaliadas no modelo de cultura em monocamada, além de ajudar a entender as interações de derme-epiderme (SMALLEY et al., 2008; BROHEM et al., 2011).

A vantagem do modelo de Equivalente Dérmico (3D) é que várias interações célula-célula e célula-matriz, existentes *in vivo*, são recuperadas *in vitro*, conduzindo à observação de um comportamento mais próximo à situação real. Além disso, as células são morfologicamente mais semelhantes às células *in vivo*, pois formam matrizes tridimensionais especializadas. Atualmente, os Equivalentes Dérmicos podem ser utilizados como substitutos da pele humana em diferentes áreas tecnológicas, como na biologia molecular, farmacologia, dermatologia (cosméticos) e medicina regenerativa (PRIMO e TEDESCO, 2013; BROHEM et al., 2011; Cheung et al., 2015).

Na área da medicina regenerativa, por exemplo, há muito interesse para o desenvolvimento de substitutos cutâneos sintéticos ou biológicos que possam ser utilizados no

tratamento de feridas crônicas ou em pacientes que tiveram grandes perdas de pele (queimaduras, traumatismos, doenças autoimunes, etc.). Atualmente estão disponíveis os aloenxertos (derivados da pele de outros indivíduos), xenoenxertos (derivados da pele de animais) ou os materiais sintéticos, desenvolvidos pela engenharia tecidual (NYAME , CHIANG e ORGILL, 2014; HUGHES et al., 2016; DEBELS et al., 2015a; FERREIRA et al., 2011). Na tabela abaixo foram reunidos os principais substitutos cutâneos encontrados na literatura.

Tabela 1 - Principais substitutos cutâneos encontrados comercialmente no mundo. *EpiSkin™ produz tecidos humanos somente para análises *in vitro*.

Produto	**Composição**	
Acelular		
Integra®	Colágeno bovino e glicosaminoglicano (condroitina-6-sulfato), recoberto por fina lâmina de silicone	
Biobrane®	Rede de náilon preenchido com colágeno porcino tipo I, coberto por fina lâmina de silicone	
Alloderm®	Matriz dérmica derivada de pele humana de cadáver	
Matriderm®	Matriz de colágeno e elastina	
Celular	**Tipo celular**	**Matriz**
TransCyte®	Fibroblastos neonatais	Membrana de silicone-nylon ligada a peptídeos de colágeno (semelhante à Biobrane®)
ICX-SKN®	Fibroblastos neonatais	Fibrina
Hyalograft-3D®	Fibroblastos autólogos	Fibras de ácido hialurônico esterificadas. Coberto por uma membrana de silicone
Apligraft®	Fibroblastos e queratinócitos neonatais	Colágeno tipo I bovino

Produto	Composição	
Orcel®	Fibroblastos e queratinócitos humanos	Colágeno tipo I bovino
Dermagraft®	Fibroblastos neonatais	Matriz absorvível de ácido glicólico (poliglactina 910)
EpiCel®	Queratinócitos autólogos	Cultivados em uma camada de fibroblastos de rato (3T3)
TheraSkin®	Fibroblastos e quaratinócitos humanos	Aloenxerto fabricado a partir de células humanas doadas
*EpiSkin™	Queratinócitos humanos	Matriz de colágeno

Fonte: (NYAME , CHIANG e ORGILL, 2014; HUGHES et al., 2016; DEBELS et al., 2015a; FERREIRA et al., 2011).

Existe também um grande interesse pelas indústrias farmacêuticas, cosméticas e químicas em utilizar modelos celulares tridimensionais e testes *in vitro* durante o processo de desenvolvimento de novos fármacos. Estima-se que de 5.000 a 10.000 moléculas em triagem para o desenvolvimento de um novo fármaco, apenas uma possui aprovação final pela Food and Drug Administration (FDA) e esta pesquisa gera um investimento de mais de 1 bilhão de dólares às industrias farmacêuticas, grande parte desse custo devido a testes de eficácia e segurança em animais (LEE et al., 2012).

Além disso, há uma tendência mundial em seguir o principio dos 3R's (Reduction ou redução, Refinement ou refinamento, Replacement ou substituição) no que diz respeito à utilização de animais em práticas de pesquisa e ensino e faz-se necessário encontrar alternativas cientificamente válidas para os testes feitos em animais.

No Brasil, atualmente existem vinte e quatro métodos alternativos ao uso de animais reconhecidos pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). Em 2014, através da Resolução Normativa nº18/2014, o CONCEA reconheceu 17 métodos validados pela Organização pela Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, do inglês Organisation for Economic Cooperation and Development) e estabeleceu um prazo de até cinco anos (portanto, até 2019) como limite para a substituição obrigatória dos métodos

originais por métodos alternativos. Destes, dois guias (OECD 431 e OECD 439) utilizam a epiderme humana reconstituída (RHE). Posteriormente, a resolução normativa nº31/2016 incluiu mais sete métodos (BRASIL, 2014; BRASIL 2016).

Porém, um grande problema limitante é que estes modelos alternativos de pele são produzidos comercialmente somente no exterior e por se tratar de um material biológico seu transporte torna-se difícil principalmente devido a questões de logísticas e alfandegárias. O produto mais conhecido é o fabricado pela marca francesa EpiSkin^{TM}, que possui modelos de pele reconstituída (derme e epiderme), epiderme reconstituída e outros tipos de epitélio (córneo, vaginal, mucosa oral). No Brasil, a criação do RENAMA (Rede Nacional de Métodos Alternativos) em 2012 alavancou as pesquisas neste âmbito, e atualmente existem Laboratórios Centrais e Associados desenvolvendo projetos de pesquisa no desenvolvimento e disseminação de modelos alternativos como, por exemplo, a pele reconstituída.

Neste contexto, a pesquisa que vem sendo desenvolvida pelo nosso grupo, no intuito de recriar modelos tridimensionais, como os equivalentes dérmicos, seguem as tendências mundiais de desenvolver novos protocolos para engenharia tecidual.

1.4- Os fármacos fotossensibilizantes: Ftalocianinas

Os fármacos fotossensibilizantes são compostos químicos que absorvem a energia luminosa (em comprimentos de ondas específicos) induzindo a formação de moléculas em estados excitados, que após seguirem um complexo mecanismo de reações fotoquímicas clássicas levam à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou outras espécies ativas como oxigênio singlete, durante o processo fotodinâmico (FOOTE, 1991; MEHRABAN e FREEMAN, 2015; ROBERTSON , EVANS e ABRAHAMSE, 2009).

Entre as características ideais de um fotossensibilizante podemos citar a pureza química, seletividade pelo tecido alvo, intervalo pequeno entre a administração do fármaco e o acúmulo máximo no tecido, farmacocinética favorável (tempo de meia-vida curto), características fotofísicas favoráveis e baixa toxicidade no escuro (baixa citotoxicidade) (ISSA e MANELA-AZULAY, 2010; SIMPLICIO , MAIONCHI e HIOKA, 2002).

Quanto às características fotofísicas favoráveis, um fator importante é o comprimento de onda da luz. Na região visível, quanto maior o comprimento de onda da luz incidente, maior é o seu grau de penetração no tecido, e consequentemente, maior eficiência no tratamento do tecido (SIMPLICIO , MAIONCHI e HIOKA, 2002). Portanto, as drogas desenvolvidas para uso em processos fotodinâmicos devem ser cromóforos que absorvam na

região próxima ao infravermelho, onde ocorre a maior absorção. Porém, acima de 800 nm ocorre a absorção da radiação pela água, restringindo o comprimento de onda a este limite superior (MEHRABAN e FREEMAN, 2015).

A primeira geração de fotossensibilizadores utilizada em processos fotodinâmicos foram os derivados de hematoporfirina. Embora estes fotossensibilizadores tenham sido extensivamente utilizados em estudos clínicos e feito sucesso, essa primeira geração de fotossensibilizadores apresentou algumas desvantagens como baixa seletividade, fotossensibilidade cutânea a longo prazo e composição indefinida dos produtos comerciais, que eram vendidos como uma mistura complexa da hematoporfirina (JIANG et al., 2014). Neste contexto, surgiram os fotossensibilizadores de segunda geração, como as porfirinas modificadas, ftalocianinas, clorinas e bacterioclorinas.

As ftalocianinas vêm sendo consideradas excelentes fármacos fotossensibilizantes com aplicação nos processos fotodinâmicos devido à sua estabilidade físico-química, pureza química e alta capacidade de gerar oxigênios reativos (EROs). Possuem vantagens comparando-se aos compostos de primeira geração pelo fato de possuírem uma alta taxa de absorção de luz nos comprimentos de onda de 670 a 780 nm, exatamente na janela terapêutica (CASTANO , DEMIDOVA e HAMBLIN, 2004; BENOV, 2015), além de baixa toxicidade *in vitro*.

As ftalocianinas podem apresentar uma variedade de íons metálicos em sua estrutura química. A associação com metais, mais usualmente o alumínio e o zinco, promovem melhores propriedades fotofísicas (SIQUEIRA-MOURA et al., 2013).

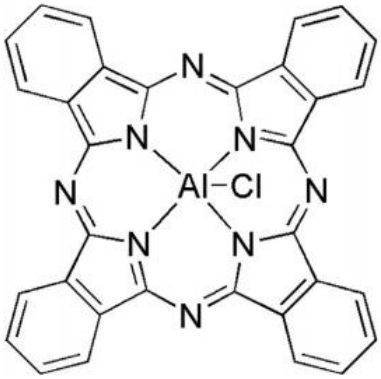

Figura 4 - Estrutura química da ftalocianina de cloro alumínio ($C_{32}H_{16}AlClN_8$). Imagem retirada de (SIQUEIRA-MOURA et al., 2013).

A interação do fármaco fotossensível e luz monocromática geram uma complexa resposta fotoquímica e fotofísica que pode ser explicada pelo Diagrama de Jablonski, representado na figura abaixo (Figura 5).

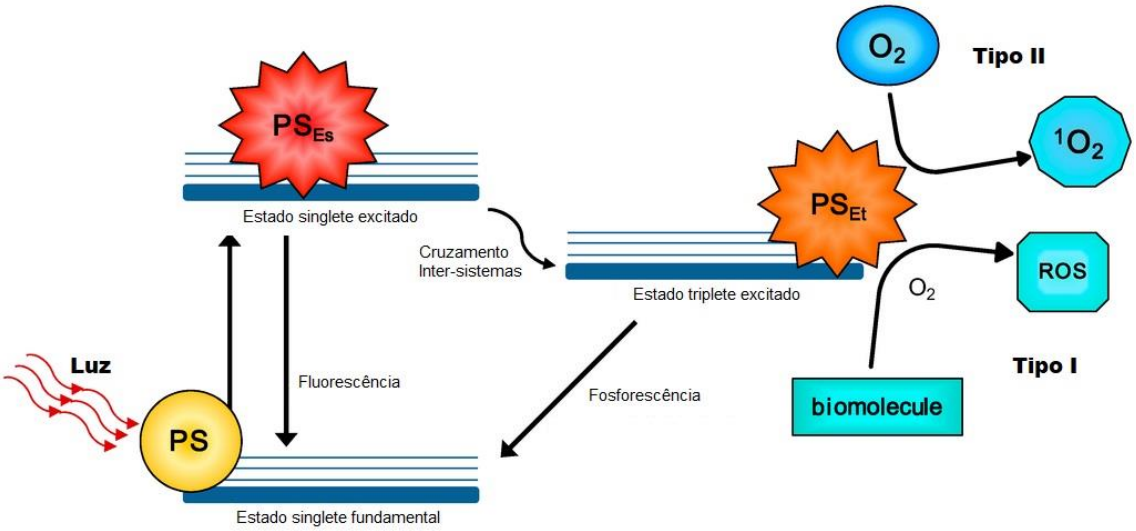

Figura 5 - Diagrama de Jablonski representando os processos fotofísicos e fotoquímicos que ocorrem durante os processos fotodinâmicos. Imagem adaptada de (CALIXTO et al., 2016).

Quando um fóton é direcionado à uma molécula, ele pode ser absorvido, refletido ou transmitido. Se for refletido ou transmitido não ocorre mudança alguma na energia da molécula, porém se for absorvido, ocorre aumento de sua energia de orbital molecular.

O fármaco fotossensibilizante que inicialmente encontra-se no estado fundamental possui dois elétrons de spin opostos situados no orbital molecular de menor energia.

Após absorção da energia luminosa (fótons), um destes elétrons passa a habitar um orbital de maior energia, porém ainda mantém o seu spin. Este é o primeiro estado excitado da molécula fotossensibilizante e possui tempo de vida muito curto (na ordem de nanosegundos), podendo retornar ao seu estado fundamental (estado singlete) através da emissão de fluorescência ou pela conversão interna em calor.

A molécula em seu estado singlete excitado pode ainda sofrer um processo denominado cruzamento intersistemas, na qual o spin do elétron excitado é invertido dando origem ao estado triplete excitado (elétrons com spin paralelos). Este estado triplete excitado é mais estável e possui tempo de vida maior (microssegundos).

O fármaco fotossensibilizante no seu estado triplete excitado pode então desencadear reações fotoquímicas de dois tipos, Tipo I e Tipo II:

No mecanismo tipo I, ocorre a transferência de um próton ou elétron para moléculas biológicas, formando radicais aniônicos ou catiônicos, respectivamente. Posteriormente, estes radicais podem reagir com o oxigênio molecular presente no meio para produzir espécies reativas de oxigênio (EROs), como peróxidos de hidrogênio, ânion superóxidos, etc. No mecanismo tipo II, o fármaco fotossensibilizante transfere a sua energia diretamente para um oxigênio molecular, formando oxigênio singlete excitado, espécie altamente reativa que pode oxidar vários substratos biológicos (CALIXTO et al., 2016; CASTANO , DEMIDOVA e HAMBLIN, 2004).

1.5- Fotobiomodulação: Uso dos Processos Fotodinâmicos

Fotobiomodulação pode ser caracterizada como o efeito da utilização de luz monocromática de baixa potência, com a intenção de estimular ou inibir funções biológicas e que não resulta em danos irreversíveis ao tecido (LIU et al., 2014; MA et al., 2012). Nas últimas décadas, numerosos estudos têm demonstrado os efeitos benéficos da terapia com laser de baixa potência. Como exemplos podemos citar a estimulação do crescimento neuronal e aumento da função neuronal pós-trauma, efeitos protetores em cardiomiócitos pós-isquemia, regeneração de nervos e músculos, modulação do sistema imune, remodelação e reparo do tecido ósseo (ALGHAMDI , KUMAR e MOUSSA, 2012; PEPLOW , CHUNG e BAXTER, 2010; PRINDEZE , MOFFATT e SHUPP, 2012).

Embora os mecanismos biológicos a respeito dos efeitos bioestimulatórios da luz de baixa potência não sejam totalmente elucidados, diversos autores têm reportado que esta terapia é capaz de modular processos celulares metabólicos e estudos indicam o seu potencial regenerativo em tecidos biológicos (ALGHAMDI , KUMAR e MOUSSA, 2012; LAU et al., 2015; JESUS , SAEKI e TEDESCO, 2016a; DOURADO et al., 2015; FARFARA et al., 2015; TURRIONI et al., 2017; AHMED e SAYED, 2012; DAWOOD e SALMAN, 2013; NOVAES et al., 2014; MARTINS et al., 2017; ELSON e FORAN, 2015). Além disso, estudos apontam que esta modalidade possui efeitos celulares na proliferação de fibroblastos, matriz extracelular, produção de colágeno, formação do tecido de granulação e redução da resposta inflamatória, tornando-se uma terapia alternativa para os processos de cicatrização e reparação tecidual (DEYHIMI et al., 2016).

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica não invasiva, que embora tenha sido originalmente desenvolvida visando à terapia do câncer em suas diversas

formas, tem ficado cada vez mais evidente sua aplicação em diversas áreas da medicina como na cardiologia, imunologia, oftalmologia, odontologia e dermatologia (BENOV, 2015). O mecanismo se dá pela junção de três componentes: agente fotossensibilizante, luz e oxigênio molecular. A técnica, em geral, consiste na administração tópica ou sistêmica de um agente fotossensibilizante que se acumula nas células alvo. Em seguida, o tecido é exposto à luz de comprimento de onda específico, que coincide com o espectro de absorção do agente fotossensibilizante aplicado. Os fotossensibilizantes são então ativados pela luz e transferem energia ao oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) (ISSA e MANELA-AZULAY, 2010; TOREZAN , NIWA e FESTA NETO, 2009).

Sabe-se que altas concentrações de EROs apresentam efeitos citotóxicos levando a apoptose celular (SIQUEIRA-MOURA et al., 2013). Entretanto, em concentrações baixas, ou seja, em concentrações fisiológicas, EROs têm sido apontados como sinalizadores e estimuladores de processos biológicos, como na diferenciação celular, modulação de canais de íons, aumento do influxo de cálcio, proliferação celular e ativação de kinases (MAPK) (PRINDEZE , MOFFATT e SHUPP, 2012).

Lubart e colaboradores estudaram a hipótese de que a fotobioestimulação poderia ser mediada pela produção de pequenas quantidades de espécies reativas de oxigênio e para tal, concentrações baixas de derivados de hematoporfirina foram adicionados às culturas de fibroblastos que foram irradiadas com laser de HeNe. O resultado obtido foi um aumento da proliferação celular (LUBART et al., 1995; LUBART et al., 2005). Outros estudos posteriores também demostraram este potencial estimulatório (FARIA et al., 2015; SILVA et al., 2004; DEYHIMI et al., 2016; MENDOZA-GARCIA et al., 2015; SPERANDIO et al., 2010; JAYASREE et al., 2001; SAHU et al., 2013).

Além disso, estudos prévios realizados pelo nosso grupo demonstraram que a combinação sinérgica entre laser de baixa potência, fármaco fotossensibilizante e um sistema de veiculação nanoestruturado apresentam potencial terapêutico no processo de reparação tecidual. Utilizando um modelo *ex vivo*, Jesus et al. observou um aumento de mais de 20% na produção de colágeno e elastina, 14 dias após o tratamento (JESUS , SAEKI e TEDESCO, 2016b). Anteriormente, Primo et al. já havia estudado os efeitos bioestimulatórios do uso de laser de baixa potência e o fotossensibilizante cloro alumínio de ftalocianina e obteve alguns resultados preliminares (PRIMO et al., 2011; PRIMO et al., 2012).

Durante o processo, a seletividade e eficácia do tratamento dependem, entre outros fatores, da área exposta à luz e do acúmulo preferencial do agente fotossensibilizante nas células alvo (ALLISON et al., 2008; MEHRABAN e FREEMAN, 2015), sendo este um

obstáculo que tem levado ao estudo de variados sistemas de veiculação. Recentemente, os avanços na tecnologia farmacêutica (nanotecnologia) contribuíram para o desenvolvimento de sistemas de veiculação de fármacos fotossensibilizantes com aplicação nos processos fotodinâmicos, como por exemplo, as nanoemulsões de cloro alumínio ftalocianina (PRIMO et al., 2012; PRIMO e TEDESCO, 2013).

1.5.1- Mecanismos moleculares da ação da luz de baixa intensidade

A energia luminosa pode ser absorvida pelas células através de seus cromóforos endógenos. Podemos citar como exemplos as porfirinas, riboflavinas, citocromos mitocondriais e o sistema NADPH oxidase presente na membrana plasmática. Esta interação depende do espectro de absorção destes cromóforos, comprimento de onda da fonte luminosa e parâmetros como intensidade e dose da luz.

Estes cromóforos agem como fotossensibilizantes, transferindo a energia para moléculas de oxigênio presentes no meio e produzindo espécies reativas de oxigênio. Em baixas concentrações (níveis não citotóxicos) estas moléculas de EROs, podem produzir efeitos positivos nas células (LUBART et al., 2005).

Os mecanismos do laser de baixa intensidade foram elucidados a nível molecular por Karu e colaboradores em 1988 que sugeriram a cadeia respiratória como sendo o primeiro fotorreceptor celular. A absorção de luz visível monocromática por componentes celulares como citocromo c e citocromo c oxidase pode ocasionar a ativação da cadeia respiratória, gerando mudanças no estado redox citoplasmático e na própria mitocôndria (KARU, 1988). A ativação de canais iônicos como a bomba de prótons Na^+/H^+ situados na membrana citoplasmática podem desencadear uma cascata de eventos celulares. Karu e colaboradores correlacionaram a transmissão de sinais de aumento da mitose celular com o controle intracelular do pH, ou seja, o efeito estimulatório do laser de baixa potência pode ser explicado pela rápida alcalinização do citoplasma que ocorre como resultado da fotoativação da cadeia respiratória. Além disso, o aumento intracelular de H^+ pode causar a ativação de outros transportadores de membrana como Na^+/K^+ e Ca^{2+}. O íon Ca^{2+} é citado como componente celular envolvido em diversos processos e por isto, sugere-se também que seu aumento em concentração esteja envolvido em etapas da fotobioestimulação (PRINDEZE , MOFFATT e SHUPP, 2012).

1.6- Nanotecnologia e o desenvolvimento de sistemas carreadores de fármacos

Nas últimas três décadas, a nanotecnologia tem sido discutida como uma nova área multidisciplinar da ciência, que contribuiu para a ascensão da pesquisa e desenvolvimento de nanoestruturas e nanomateriais com aplicações biomédicas e farmacêuticas, mais especificamente, sistemas de veiculação de fármacos, diagnósticos e biomarcadores (GESZKE-MORITZ e MORITZ, 2016).

Muitos fatores podem contribuir para o fracasso de uma terapia: baixa solubilidade do fármaco, limitando as vias de administração; concentração insuficiente do fármaco no tecido-alvo, ocasionada pela baixa absorção ou rápida metabolização e/ou eliminação; biodistribuição inespecífica (baixa seletividade) do fármaco para outros órgãos, podendo causar toxicidade; etc.(MEHNERT e MADER, 2012a).

Nos últimos anos, os avanços na nanomedicina têm proporcionado o desenvolvimento de sistemas carreadores de fármacos, contribuindo para aumento da eficácia terapêutica e diminuição de efeitos adversos (KULKARNI e FENG, 2013). Isto significa que o destino final do fármaco não depende mais somente das propriedades intrínsecas ao fármaco, mas agora, principalmente das propriedades do sistema carreador, que deve permitir uma liberação controlada e alvo-específica, de acordo com a terapia desejada (MEHNERT e MADER, 2012b). Outras vantagens destes nanocarreadores são: proteção dos fármacos da degradação antecipada no ambiente biológico, aumento da absorção por um tecido específico (seletividade), maior biodisponibilidade e tempo de retenção (KUMARI , YADAV e YADAV, 2010).

De acordo com a Organização Internacional para Padronização (em inglês, International Organization for Standardization – ISO), nanopartículas são materiais com as três dimensões externas na nanoescala de 1 – 100 nm. Porém, no campo da nanomedicina são consideradas nanopartículas as partículas com tamanho na escala sub-micron (<1000 nm, <1µm), tamanho tal expresso em nanômetros, por isso o hábito de chamá-las de “nano”. Exemplos destes sistemas são as nanopartículas poliméricas, nanoemulsão, lipossomas e nanopartículas lipídicas sólidas.

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos e incluem as nanocápsulas e as nanoesferas. As nanocápsulas são vesículas formadas por uma parede polimérica que envolve um núcleo geralmente oleoso, sendo que o fármaco pode estar dissolvido neste núcleo ou e/ou adsorvido à parede polimérica. As nanoesferas são

constituídas apenas de uma matriz polimérica, onde o fármaco encontra-se retido dentro da matriz ou adsorvido na superfície da esfera (SCHAFFAZICK et al., 2003; RAO e GECKELER, 2011).

As nanopartículas lipídicas sólidas são compostas de lipídeos que são sólidos tanto na temperatura ambiente quanto no meio biológico. Elas apresentam algumas vantagens em relação aos lipídios líquidos, pois promovem uma liberação mais lenta do fármaco já que a mobilidade do fármaco na matriz sólida é relativamente menor, e desta forma promovem uma liberação controlada do fármaco (GESZKE-MORITZ e MORITZ, 2016).

Lipossomas são vesículas esféricas constituídas de uma ou mais bicamadas fosfolipídica (geralmente, fosfatidilcolina). Fármacos lipofílicos podem ser incorporados na bicamada lipídica e ao contrário, fármacos hidrofílicos estão dissolvidos no interior do núcleo aquoso (MEHNERT e MADER, 2012a).

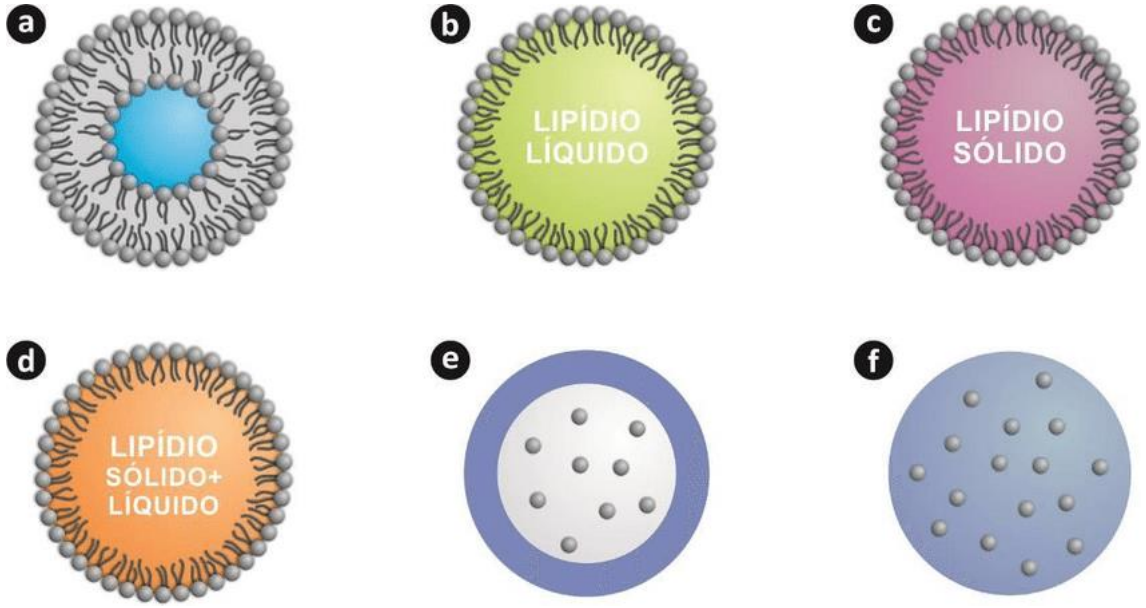

Figura 6 - Desenho representativo dos sistemas nanoestruturados. (a) nanolipossoma; (b) nanoemulsão; (c) nanopartícula lipídica sólida; (d) carreador lipídico nanoestruturado; (e) nanocápsula; (f) nanoesfera. Imagem retirada de (POHLMANN et al., 2016).

As emulsões consistem em uma dispersão de dois líquidos imiscíveis entre si (geralmente água e óleo) estabilizados por um surfactante, podendo ser de dois tipos: óleo-em-água (O/A) e água-em-óleo (A/O).

O termo microemulsão (ME) foi introduzido na literatura por Hoar e Schulman, em 1943, para descrever um sistema fluido e translúcido obtido espontaneamente pela mistura de óleo e água com quantidades relativamente grandes de tensoativo iônico misturado a um

álcool de cadeia média. Observou-se através de microscopias eletrônicas que as dispersões formadas eram constituídas de microglóbulos de tamanhos variando entre 100 e 600 nm, ou seja, significativamente menores que as emulsões simples (HOAR e SCHULMAN, 1943).

O desenvolvimento de uma microemulsão geralmente envolve a mistura de três componentes principais: tensoativo, fase aquosa, fase oleosa e quando necessário, a utilização de um co-tensoativo. A orientação e formação dos sistemas A/O ou O/A depende das propriedades físico-químicas do tensoativo escolhido e é determinado pelo seu equilíbrio hidrófilo/lipófilo (EHL) (OLIVEIRA et al., 2004). O sistema pode produzir gotículas com tamanhos suficientemente pequenos, por isso, alguns autores também utilizam a denominação de "submicron emulsion" ou nanoemulsão.

Os tensoativos do tipo não iônicos, como por exemplo, os Spans e Tweens, são geralmente mais hidrofóbicos e tendem a produzir emulsões mais estáveis, pois são menos susceptíveis à precipitação na presença de meios com altas concentrações de íons. Além disso, apresentam a vantagem de serem menos tóxicos que a maioria dos surfactantes (TADROS, 2005).

As microemulsões, de forma geral, são sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos e transparentes. Nas ME do tipo O/A, o fármaco pouco solúvel pode estar dissolvido no núcleo oleoso e/ou adsorvido na interface óleo-água (SILVA et al., 2009).

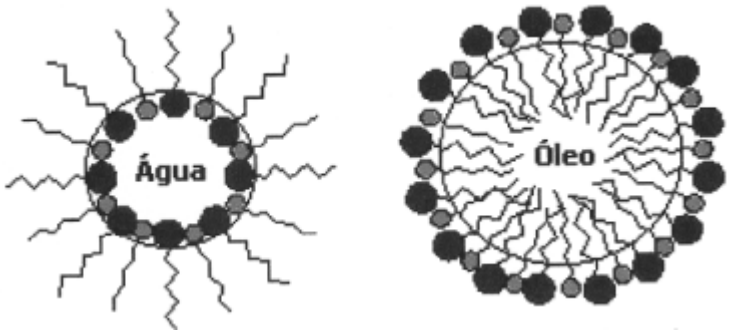

Figura 7 – Estrutura das microemulsões água-em-óleo (A/O) e óleo-em-água (O/A). Imagem adaptada de (OLIVEIRA et al., 2004).

1.7- As Metaloproteinases de Matriz (MMPs)

As Metaloproteinases de Matriz extracelular constituem uma família de endopeptidases com atividade proteolítica e cuja atividade é dependente de zinco. Elas diferem entre si estruturalmente e em sua habilidade de degradar grupos particulares de

proteínas da matriz extracelular (MEC). Atualmente, mais de 20 tipos diferentes de MMPs humanas foram identificados e são classificadas em 7 grandes grupos de acordo com a especificidade do substrato e organização dos domínios: colagenases, gelatinases, estromelisinas, matrilisinas, tipo-membrana (MT-MMPs), metaloelastases e outras (LAZARO et al., 2016).

Em geral, todas as MMPs são constituídas por uma estrutura básica que é formada por 3 domínios: sequência de sinal de peptídeos, prodomínio e domínio catalítico que contém o sítio ativo de Zn^{2+}. Além disso, a maioria delas possui o domínio de hemopexina, responsável pela interação com os substratos e que por isso confere especificidade a estas enzimas. A região de dobra também é comum e faz a conexão entre os domínios catalítico e de hemopexina (RICCI et al., 2016).

As MMP-2 e MMP-9, que são denominadas gelatinases devido a sua especificidade pelo colágeno desnaturado, contém um domínio de fibronectina repetido, que é responsável pela ligação ao substrato.

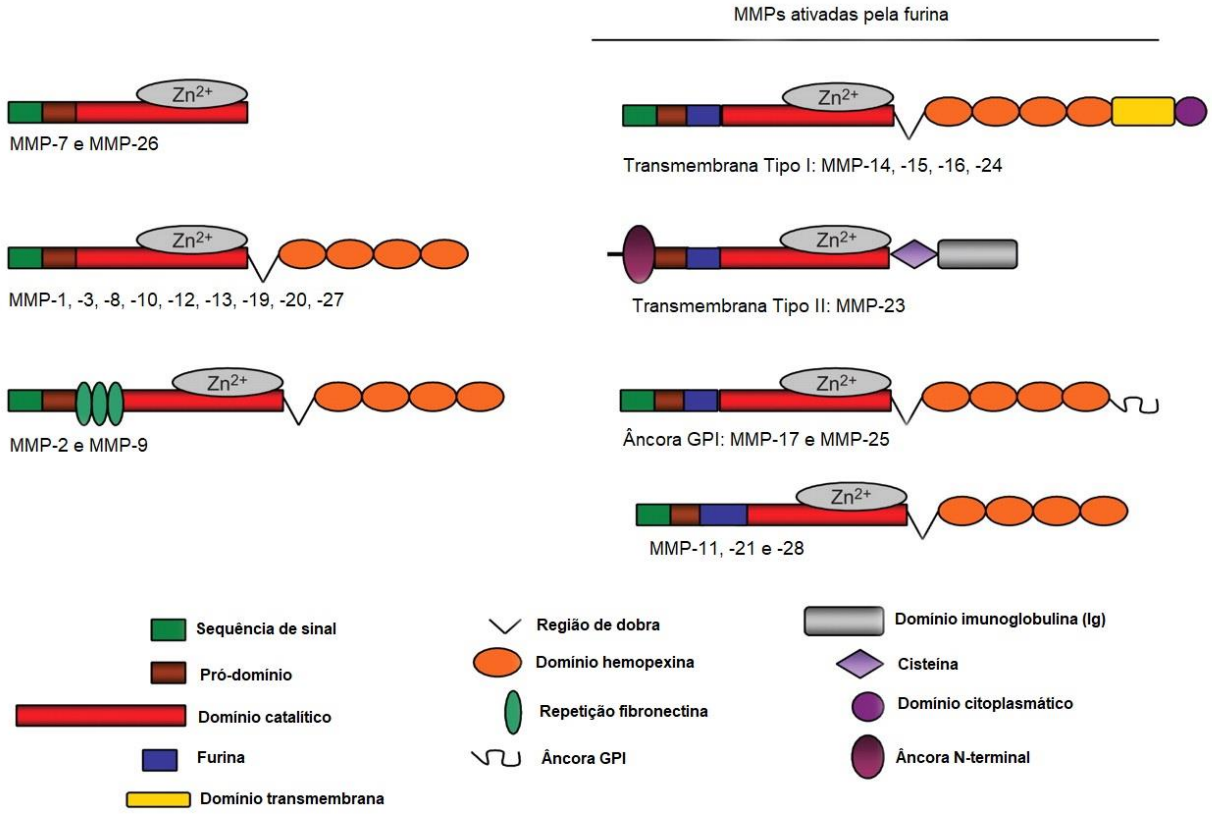

Figura 8 – Estrutura e classificação das Metaloproteinases de Matriz (MMPs). Imagem adaptada de (Löffek;Schilling;Franzke, 2011).

As MMPs foram inicialmente descobertas e descritas pela sua capacidade de degradar componentes da matriz extracelular, incluindo colágeno, laminina, fibronectina, elastina e proteoglicanos, entre outros. Mais recentemente, estudos demostraram que elas são capazes também de clivas diversos tipos de peptídeos e proteínas e, além disso, desempenham inúmeras funções biológicas que não são consequência direta de sua atividade proteolítica.

A atividade catalítica das MMPs é controlada em diversos níveis através de mecanismos que envolvem a expressão gênica, ativação do zimogênio, compartimentalização e inibição da atividade enzimática pelos TIMPs (Inibidores Teciduais de Metaloproteinases) (ARPINO , BROCK e GILL, 2015). As MMPs são produzidas e secretadas como proenzimas em sua forma inativada (zimogênio), sendo ativadas através de mecanismos que causam a quebra do sítio de cisteína através da clivagem do prodomínio (autólise ou por outras proteínas). Além disso, o sítio de cisteína pode ser ativado através de reações químicas, na qual espécies reativas de oxigênio (EROs) causam a oxidação do prodomínio, seguido de clivagem autolítica (KLEIN e BISCHOFF, 2011; RA e PARKS, 2007; TOKITO e JOUGASAKI, 2016).

Nos últimos anos, têm-se estudado a participação das MMPs na regulação de diversos processos celulares. Através de suas propriedades proteolíticas, como por exemplo, clivagem de citocinas, quimiocinas, peptídeos antimicrobianos e proteínas de membranas, as MMPs podem desempenhar funções críticas nos processos de imunidade, reparação tecidual, diferenciação e transformação celular (APTE e PARKS, 2015; Löffek;Schilling;Franzke, 2011).

No processo de cicatrização de feridas, as MMPs estão presentes durante as três fases do processo (inflamação, reepitelização e formação da cicatriz), desempenhando funções regulatórias importantes (DE MEDEIROS et al., 2016; ROHANI e PARKS, 2015; GILL e PARKS, 2008). Na fase inflamatória, as MMPs modulam mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, ativando a resposta inflamatória e também estabelecem gradientes quimiotáticos que regulam a migração de leucócitos para o tecido injuriado (MANICONE e MCGUIRE, 2008). Na etapa denominada reepitelização, na qual ocorre o fechamento da ferida e a diferenciação celular, é necessário que as células epiteliais percam os sítios de contato célula-célula e célula-MEC e assumam características migratórias (MARTIN e NUNAN, 2015). Na fase final, ocorre a remodelação da matriz extracelular e contração da ferida, sendo que estes processos resultam da participação direta das MMPs na síntese e degradação contínua das fibrilas de colágeno (LINDLEY et al., 2016; GILL e PARKS, 2008).

II- OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um modelo celular tridimensional *in vitro*, denominado equivalente dérmico, a partir de duas linhagens celulares (fibroblastos e células-tronco) e sua caracterização através de técnicas como a histologia, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal, visando o estudo de processos fotobiológicos com o fármaco fotossensibilizante ftalocianina de cloro alumínio veiculado em um sistema nanoestruturado e luz visível de baixa intensidade.

III- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Cultura celular

3.1.1- Protocolo de cultivo celular dos fibroblastos BJ

Os fibroblastos BJ (ATCC® CRL-2522™) foram cultivados em frascos para cultura de 75 cm^2 (Corning), utilizando-se meio *Dulbecco´s Modified Eagle Medium* (DMEM) 1X alta glucose (Gibco®) suplementado com soro fetal bovino (SFB) inativado estéril (Cultilab) a 10%, penicilina\estreptomicina (Gibco®) a 1,0%, anfotericina (Gibco®) a 0,25% e aminoácidos não essenciais (Gibco®) a 1,0%. Os frascos de cultura foram mantidos em incubadora com controle digital de temperatura a 37 ^oC, com atmosfera úmida e 5% de CO_2.

As células foram cultivadas até atingirem confluência de no mínimo 70%, sendo então soltas do frasco de cultivo por tripsinização (adição de 1 mL de tripsina, Sigma) e incubação por 3-5 minutos. O processo de tripsinização foi interrompido pela adição de meio DMEM suplementado a 10% com SFB e em seguida, centrifugação do meio por 10 minutos a 1200 rpm. As células foram ressuspendidas em 10 mL de meio DMEM suplementado 10% e replaqueadas. O meio foi renovado duas vezes por semana.

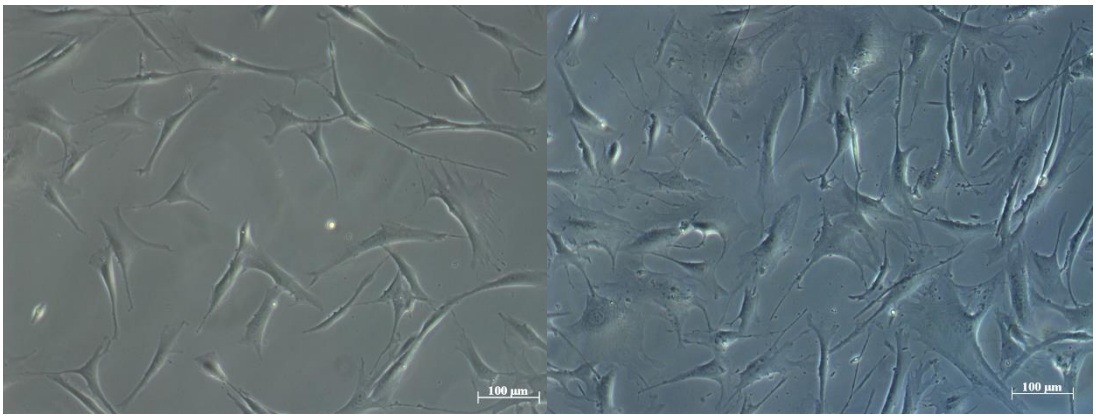

Figura 9 - Fibroblastos BJ (ATCC® CRL-2522™) cultivados em meio DMEM suplementado a 10% com SFB. À esquerda, baixa densidade e à direita, alta densidade.

3.1.2- Protocolo de cultivo celular dos fibroblastos NIH/3T3

Os fibroblastos NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™) foram cultivados em frascos para cultura de 75 cm^2 (Corning), utilizando-se meio *Dulbecco´s Modified Eagle Medium*

(DMEM) 1X alta glucose (Gibco®) suplementado com soro fetal bovino (SFB) inativado estéril (Cultilab) a 10%, penicilina\estreptomicina (Gibco®) a 1,0%, anfotericina (Gibco®) a 0,25% e aminoácidos não essenciais (Gibco®) a 1,0%. Os frascos de cultura foram mantidos em incubadora com controle digital de temperatura a 37 ^{o}C, com atmosfera úmida e 5% de CO_2. Os protocolos de tripsinização e repique celular utilizados foram os mesmos descritos no Item anterior (3.1.1).

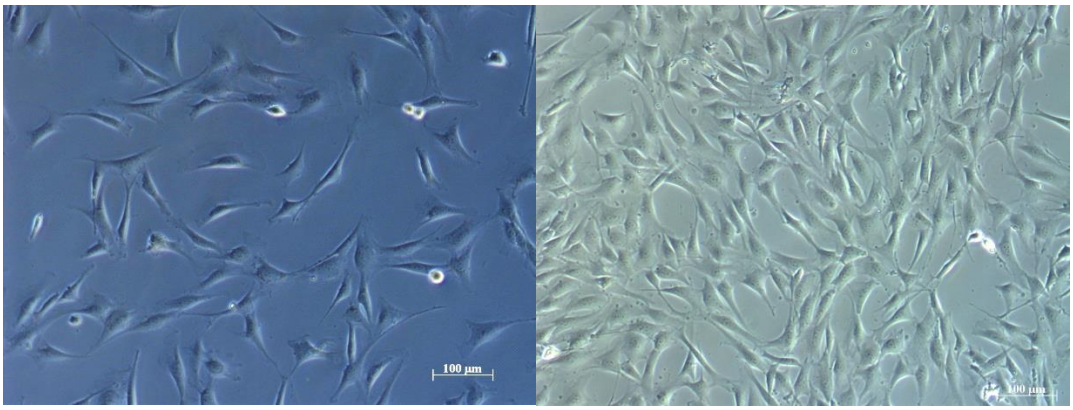

Figura 10 - Fibroblastos NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658^{TM}) cultivados em meio DMEM suplementado a 10% de SFB. À esquerda, baixa densidade e à direita, alta densidade.

A vantagem de se trabalhar com linhagens de células imortalizadas é que elas proporcionam maior reprodutibilidade, diminuindo as variações durante os experimentos. Outro problema encontrado é que as linhagens de células primárias possuem tempo de vida limitado e após muitas passagens podem entrar em senescência (BROHEM et al., 2011; BUSKERMOLEN et al., 2016).

3.1.3- Protocolo de cultivo celular das células-tronco HBMS

As células-tronco humanas HBMS (Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells, ATCC® PCS-500-012^{TM}) foram cultivadas em frascos para cultura de 75 cm^2 (Corning), utilizando-se meio *Minimum Essential Medium Alpha Medium* (α-MEM) 1X (Gibco®) suplementado com soro fetal bovino (SFB) inativado estéril (Cultilab) a 10%, penicilina\estreptomicina (Gibco®) a 1,0% e gentamicina (Gibco®) a 0,5%. Os frascos de cultura foram mantidos em incubadora com controle digital de temperatura a 37 ^{o}C, com atmosfera úmida e 5% de CO_2. Os protocolos de tripsinização e repique celular utilizados foram os mesmos descritos no Item 3.1.1.

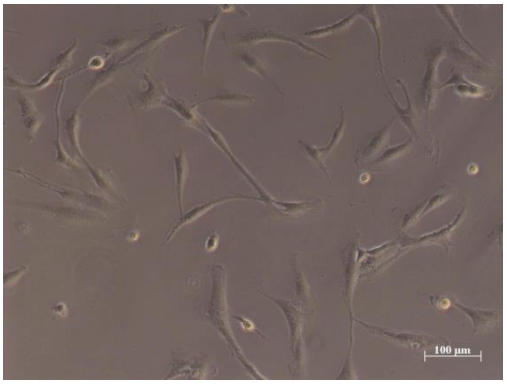

Figura 11 - Células-tronco humanas HBMS (ATCC® PCS-500-012™) cultivadas em meio α-MEM suplementado a 10% de SFB.

3.1.4- Micrografias das culturas celulares

O crescimento celular (do momento do descongelamento até total confluência) foi monitorado através de micrografias em microscópio invertido Carl Zeiss de alta resolução. As imagens foram obtidas utilizando-se um conjunto de objetivas A-Plan 10x/0,25 Ph1, adaptado com uma câmera digital Canon 7.2 Mpixels.

3.1.5- Procedimento para contagem celular (Azul de Tripan)

Após tripsinização e centrifugação, o pellet celular foi ressuspendido em 10 mL de meio de cultura completo, aliquotou-se 50 µL da suspensão homogeneizada e fez-se uma diluição 1:1 com solução de Azul de Tripan 0,4%.

O número de células foi contado em uma Câmara de Neubauer e aplicou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Nº de células\mL} = \frac{\text{Nº de células contadas}}{\text{Nº de quadrantes contados}} \text{ x fator de diluição (2) x } 10^4$$

Este procedimento foi importante para as etapas seguintes do trabalho, as quais dependem da concentração celular obtida.

3.2- Sistema de veiculação nanoestruturado

3.2.1- Preparo da nanoemulsão de ftalocianina

A ftalocianina de cloro alumínio (ClAlPc) foi escolhida como fármaco fotossensibilizante para ser utilizado nos estudos de fotobiomodulação deste projeto. O sistema de veiculação utilizado foi uma nanoemulsão do tipo óleo em água (O/A) obtida pelo processo de emulsificação por deposição interfacial, como descrito por Primo (PRIMO et al., 2012; PRIMO et al., 2011).

A fase aquosa é composta pelo tensoativo não iônico Polaxamer 188 (Pluronic F68) em solução aquosa sob agitação magnética em temperatura ambiente a 25 ^{o}C. A fase orgânica (acetona) foi preparada com fosfatidilcolina de soja (Lipoid S100), óleo Miglyol 812N (Stallergenes) e ftalocianina de cloro alumínio sob agitação magnética a 55 ^{o}C.

Em seguida, a fase orgânica foi adicionada lentamente, com auxílio de uma seringa, diretamente na fase aquosa (55 ^{o}C). Ao final do processo, o solvente orgânico (acetona) foi totalmente removido utilizando-se um rotaevaporador com banho a 55 ^{o}C e pressão reduzida até um volume final de 10 mL de formulação.

3.2.2- Caracterização físico-química da nanoemulsão

Acompanhou-se a estabilidade fisico-química da nanoemulsão de ftalocianina através da análise do tamanho médio de partícula, índice de polidispersão (IPd) e potencial zeta durante seis meses. Estes parâmetros foram determinados pelo equipamento Zetasizer® (Nano ZS, Malvern, PCS Instruments, UK) que emprega a espectroscopia de correlação de fótons por espalhamento dinâmico de luz.

As amostras foram preparadas em água Milli-Q utilizando-se um fator de diluição 1:100. As análises de diâmetro de partícula foram realizadas utilizando-se cubetas de acrílico padronizadas do próprio equipamento, e as amostras foram lidas em triplicata a 25º. O índice de refração para a leitura da amostra foi ajustado em 1,59.

Além da distribuição do tamanho de partículas foi registrado também o índice de polidispersão (IPd).

Para a análise do potencial zeta das partículas foi utilizada uma cubeta eletroforética com eletrodos externos para a medida da voltagem (mV). O protocolo de preparo das amostras é semelhante ao descrito anteriormente, porém antes da leitura foi adicionado 10 μL

de solução de KCl 0,1 mol/L. As medidas foram também realizadas com um número de repetições igual a 3.

3.3- Ensaio de viabilidade celular pelo teste de MTT

A citotoxicidade da formulação nanoemulsão de ClAlPc foi avaliada através do teste de viabilidade celular MTT, na ausência de luz.

A metodologia escolhida para a avaliação da viabilidade e proliferação celular se baseia na habilidade da enzima mitocondrial desidrogenase, que é encontrada somente nas células viáveis, em clivar os anéis de tetrazólio do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazólio), formando cristais azuis escuros de formazan, que podem ser detectados espectrofotometricamente com absorção em 560 nm. Estes cristais de formazan são impermeáveis às membranas celulares, ficando então retidos no interior das células viáveis. Portanto, o número de células viáveis é diretamente proporcional ao nível de cristais de azul de formazan formados (KEPP et al., 2011; STOCKERT et al., 2012).

A cultura células em confluência foi tripsinizada e replaqueada em placas de 96 poços (10^4 células/poço) e incubadas por 24 horas para adesão (37 ^oC e 5% CO_2). Então, incubou-se as células com a formulação ClAlPc/NE na faixa de concentração de 0,5 a 10 µmol/L por 3 horas. Após este período, o meio com formulação foi descartado e foi substituído por meio suplementado 10%.

No dia seguinte, o meio foi descartado e adicionou-se 200 µL/poço de solução de MTT e incubou-se por 4 horas. Após este período, adicionou-se 200 µL/poço de isopropanol para dissolução do formazan formado. As placas foram lidas em leitor do tipo ELISA (Safire II - Basic, Tecan, Áustria) em 560 nm.

A porcentagem de células viáveis foi calculada de acordo com a seguinte relação:

% células viáveis = (D.O. amostra/D.O. controle)x100%

Sendo, D.O. amostra = absorbância em 560 nm das amostras; D.O. controle = absorbância em 560 nm do controle (células incubadas com meio de cultura sem a adição de formulação).

3.4- Colágeno tipo I

3.4.1- Extração do colágeno do tipo I

O colágeno do tipo I utilizado para o preparo dos equivalentes dérmicos (ED) foi extraído de tendões de caudas de ratos *Wistar* (machos com 10 semanas de vida e peso aproximado de 300 g). As caudas foram cedidas pela Prof. Dra. Cláudia Maria Padovan da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, atendendo as normas do comitê de ética em pesquisa com animais desta faculdade.

As caudas foram lavadas em água corrente e armazenadas no gelo até o momento da utilização. Foram feitos dois banhos em solução de álcool 70% por 15 minutos cada um. Em capela de fluxo laminar, as caudas foram dessecadas retirando-se toda a pele com o auxílio de pinça e bisturi, previamente esterilizados. Então, os tendões foram retirados, um a um, com auxílio da pinça e foram colocados em uma solução de ácido acético 0,1% ou 0,5% para extração do colágeno. Para cada 1g de cauda utilizou-se de 60-100 mL de solução de ácido acético. Esta solução foi armazenada em geladeira a 4° C durante 1 semana, sendo agitada de vez em quando. A solução final foi centrifugada a 10.000 rpm por 1h30 a 4°C.

3.4.2- Diálise da solução de colágeno

A solução de colágeno tipo I obtida foi dialisada por 1 semana em câmara fria a 4°C. Foi utilizada uma membrana de diálise de celulose com tamanho de poro de 3500 Da (Regenerated Celulose Dialysis Tubing, Fisherbrand®), previamente hidratada em água Milli-Q. Empregou-se como meio receptor uma solução de ácido acético 0,1%, sendo realizada a troca a cada dois dias. O colágeno dialisado foi armazenado em geladeira a 4° C e posteriormente realizou-se o doseamento através da quantificação de hidroxiprolina livre.

3.4.3- Dosagem do colágeno

A dosagem da solução de colágeno obtida foi realizada através do método de quantificação de hidroxiprolina livre descrito por Reddy e Enwemeka (REDDY e

ENWEMEKA, 1996; DA SILVA , SPINELLI e RODRIGUES, 2015; DA SILVA , SPINELLI e RODRIGUES, 2015; HOFMAN et al., 2011).

Este método baseia-se na quantificação de hidroxiprolina livre a partir da hidrólise ácida da amostra de colágeno. Portanto, a solução de colágeno foi hidrolisada com uma solução de HCl 10 N por 24 horas à 108 ^{o}C em um sistema "Heat Block". O resíduo restante da hidrólise foi ressuspendido em 1 mL de água Milli-Q e foram realizadas alíquotas de 50µL em tubos de *eppendorf* de 2 mL. Adicionou-se 200 µL de uma solução de Cloramina-T (Sigma-Aldrich) e 200 µL de ácido perclórico 3.15M e esperou-se 20 minutos à temperatura ambiente para ocorrer a etapa de oxidação da hidroxiprolina livre. Após este período, adicionou-se 200 µL de uma solução de reagente de Ehrlich (Sigma-Aldrich), preparada previamente em éter monoetílico de etileno glicol, e incubou-se por mais 20 minutos à temperatura de 60 ^{o}C para a formação do cromóforo. As amostras foram então resfriadas em banho de gelo por 20 minutos e transferidas para cubetas de quartzo. A leitura da densidade óptica foi realizada em espectrofotômetro UV-VIS (Ultrospec^{TM} 7000, GE Healthcare, UK) no comprimento de onda de 565 nm.

A presença de hidroxiprolina livre na solução de colágeno foi determinada através da correlação com a curva de calibração do padrão de hidroxiprolina (Sigma-Aldrich) que foi previamente determinada.

3.5- Protocolo de preparo dos Equivalentes Dérmicos (ED)

Inicialmente preparou-se 100 mL de uma solução de meio DMEM 1,87X a partir do meio DMEM 10X (Cultilab®), em água Milli-Q e adicionou-se aminoácidos não essenciais (2%) e 0,41g de bicarbonato de sódio para de ajuste de pH (7,2-7,4). A solução foi filtrada em membrana de 0,22µm dentro de uma capela de fluxo laminar, para garantir condições estéreis.

Os equivalentes dérmicos (ED) foram preparados de acordo com protocolo anteriormente desenvolvido por Primo (PRIMO et al., 2011; PRIMO et al., 2012) e baseado na literatura (BELL et al., 1983; BELL , IVARSSON e MERRILL, 1979; ASSELINEAU e PRUNIERAS, 1984; BROHEM et al., 2011) Em um erlenmeyer estéril e resfriado a 0 ^{o}C, adicionou-se meio de cultura DMEM 1,87X completo contendo penicilina/estreptomicina e anfotericina, seguido de soro fetal bovino (10%) e solução de colágeno tipo I. O pH do meio foi ajustado para pH 7,4 com a adição de NaOH 0,1N.

Finalmente adicionou-se uma solução celular, na concentração de $2x10^5$ células/ED, obtidos por tripsinização dos frascos de cultura e contagem em Câmara de Neubauer, conforme protocolo descrito anteriormente (Item 3.1.5).

A solução final foi transferida para uma placa de Petri de 60 mm estéril (Corning®) apropriada para cultivo em suspensão celular (não tratada). As placas foram então acondicionadas em incubadora a 37 ^oC em atmosfera com 5% de CO_2 e foram monitoradas por 14 dias. A troca do meio de cultura foi realizada a cada 3 dias.

3.5.1- Monitoramento dos equivalentes dérmicos

Os equivalentes dérmicos preparados foram monitorados por um período de 14 dias consecutivos. Para a determinação de um perfil de contração, mediu-se o diâmetro de cada ED com o auxílio de uma régua milimétrica.

Foram realizados também estudos de microscopia óptica para monitoramento da matriz de colágeno e observação da formação da rede tridimensional. As imagens em campo claro foram obtidas utilizando-se uma câmera digital acoplada ao microscópio invertido Carl Zeiss, objetiva de 10x.

3.6- Estudos aplicados de fotobiomodulação nos equivalentes dérmicos

Nesta etapa do trabalho, realizamos os estudos de fotobiomodulação nos equivalentes dérmicos. Para tal, os ED foram preparados segundo protocolo descrito anteriormente (3.6) e no 4º dia após o preparo os mesmos foram tratados com a formulação ClAlPc/NE. Após 24 horas, os equivalentes dérmicos foram irradiados com luz de baixa intensidade utilizando-se um sistema de LED (Light Emitting Diode) na região de 660 nm (Omnilux New-U^{TM}, Phototherapeutics, In, CA). As doses de energia foram calculadas para 70 mJ/cm^2, 140mJ/cm^2, 300mJ/cm^2.

Simultaneamente, os meios de cultura dos ED foram coletados em diferentes dias (8º e 13º após o preparo) e armazenados em freezer -80 ^oC para avaliação da produção de metaloproteinases de matriz (MMPs), através da técnica de zimografia. Para isto, os meios de culturas dos ED foram substituídos por DMEM 0% de soro fetal bovino, 24 horas antes da coleta, para não haver interferência no protocolo de zimografia.

Além disso, realizou-se análise histológica dos equivalentes dérmicos e também microscopia confocal para acompanhamento das células e matriz extracelular após o tratamento.

3.7- Microscopia Confocal (monocamada)

A linhagem celular de fibroblastos BJ (ATCC® CRL-2522™) foi cultivada em garrafas Corning de 75 cm^2 em meio DMEM suplementado 10%, como descrito anteriormente (3.1).

As células foram tripsinizadas e contadas e aproximadamente $1x10^4$ células/poço foram cuidadosamente depositadas sobre lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro, dispostas em uma placa de 24 poços (procedimento anteriormente realizado de forma estéril). Esperou-se 24 horas para as células aderirem (na incubadora a 37 ^oC e 5% de CO_2) e após este período foi realizado o tratamento somente de um dos grupos com a formulação nanoemulsão de ClAlPc na concentração de 10 µmol/L, durante 30 minutos. O grupo que não recebeu o tratamento foi utilizado como controle.

Após o período de incubação com a ClAlPc/NE, cada poço foi lavado 2x com tampão PBS 1X e as células foram fixadas com uma solução de paraformaldeído 4%. Realizou-se novamente a etapa de lavagem com PBS 1X (2x) e então adicionou-se uma solução de PBS/glicina 100mM. Realizou-se a etapa de permeabilização com Triton X-100 1% em PBS, intercalando-se etapas de lavagem. Após a etapa de permeabilização, as células foram incubadas com o marcador faloidina (Alexa flúor 488, Life Technologies).

As lamínulas contendo as células aderidas foram cuidadosamente retiradas dos poços e foi realizada a montagem das lâminas com uma gota de ProLong® Gold Antifade reagente com DAPI (Life Technologies). Depois de prontas, as lâminas foram analisadas em Microscópio Confocal Leica Platform TCS SP8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha).

3.8- Histologia

Os equivalentes dérmicos foram lavados com PBS 1X e fixados com Karnovsky por 4 horas. Em seguida as amostras foram lavadas novamente com PBS 1X e realizou-se o processo de desidratação com concentrações crescentes de álcool (50%, 70%, 90% e 100%). Após a desidratação, as amostras passaram por três banhos de xilol (processo de diafanização) e foram incluídas em parafina para cortes de 9µm em micrótomo manual.

Os cortes foram dispostos em lâminas de vidros e seguiu-se com protocolos de coloração com hematoxilina e eosina. Realizou-se também a coloração de algumas lâminas com Tricromo de Masson para visualização das fibras de colágeno.

Os procedimentos de histologia foram realizados no Laboratório da Profa. Dra. Maria Sol Brassesco Annichini no Departamento de Biologia da FFCLRP.

3.9- Microscopia Eletrônica de Varredura

Os equivalentes dérmicos foram fixados com Karnovsky por 4 horas e em seguida foram desidratados em álcool (50%, 70%, 90% e 100%). Após este processo, as amostras receberam um tratamento de secagem no equipamento Critical Point Dryer (CPD 030, Bal-Tec), que utiliza o CO_2 para secagem de amostras biológicas mantendo suas estruturas intactas. Este procedimento foi realizado no Departamento de Botânica da FFCLRP.

Após o processo de secagem, os equivalentes estão prontos para a metalização com ouro no equipamento Metalizador e Evaporador Bal-Tec SCD 050. As amostras foram analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura Zeiss Evo 50 do Departamento de Química da FFCLRP.

3.10- Zimografia

A técnica de zimografia é baseada na eletroforese em gel de poliacrilamida/bis copolimerizado com gelatina e serve para a detecção da atividade enzimática de metaloproteinases. Desta forma, os estudos foram conduzidos com os meios de cultura coletados durante os experimentos de fotobiomodulação nos equivalentes dérmicos (coletados e armazenados em freezer -80 ^{o}C).

Foi utilizado um sistema Bio-Rad do tipo Protean III®. O gel de corrida (resolving gel) foi preparado com 20 mg de gelatina dissolvida em 9,7 mL de água destilada (em banho-maria à 56°C). Em seguida, foi adicionado tampão Tris 1,5 M pH 8,8; SDS 10%; acrilamida/bis 40% (Bio-Rad); persulfato de amônio (APS) 10% e N,N,N´,N´-tetrametiletilenodiamina (TEMED, Bio-Rad).

Após o processo de polimerização do gel de corrida, foi preparado o gel de aplicação das amostras (stacking gel), de maneira análoga ao gel de corrida, porém com proporções

diferentes dos componentes citados acima e sem gelatina. O gel de aplicação foi adicionado em cima do gel de corrida e utilizaram-se espaçadores de 1,5 mm para formação dos canais.

As amostras foram preparadas pela mistura de proporções equivalentes das amostras de meio de cultura aliquotadas e de tampão de amostra (SDS 10%, glicerol, tampão Tris 0,5 M pH 6,8 e corante azul de bromofenol 0,1%) e aplicou-se 10 µL sobre cada canal do gel. A cultura de células de fibrosarcoma HT-1080 foi utilizada para a produção do meio de cultura utilizado como padrão para as bandas das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9.

Uma solução de tampão Tris foi utilizada como tampão de corrida e as amostras foram aplicadas sobre o gel imerso no tampão de corrida (após montagem do sistema). Iniciou-se a eletroforese com aplicação de 70 V por 30 minutos e em seguida, 90 V por aproximadamente 2 horas. Terminada a eletroforese, os géis foram lavados (2 x 30 min cada) com solução de Triton X-100 2,5% para eliminar o SDS e depois com água destilada. Ao final das lavagens, os géis foram incubados a 37 ^{o}C com tampão de incubação (Tris 50 mM pH 8,0; NaN_3 e $CaCl_2$ 5,0 mM) por 24 horas. No dia seguinte, o gel foi removido do tampão de incubação e adicionou-se a solução de coloração (Azul de Coomassie 0,1%, ácido acético 10% e isopropanol 20%) e finalmente, o meio de descoloração (ácido acético 10% e isopropanol 20%). A quantificação das bandas proteolíticas é realizada através de um sistema de aquisição de imagens UVITEC (UVIdoc HD2/20M, Cambridge, UK).

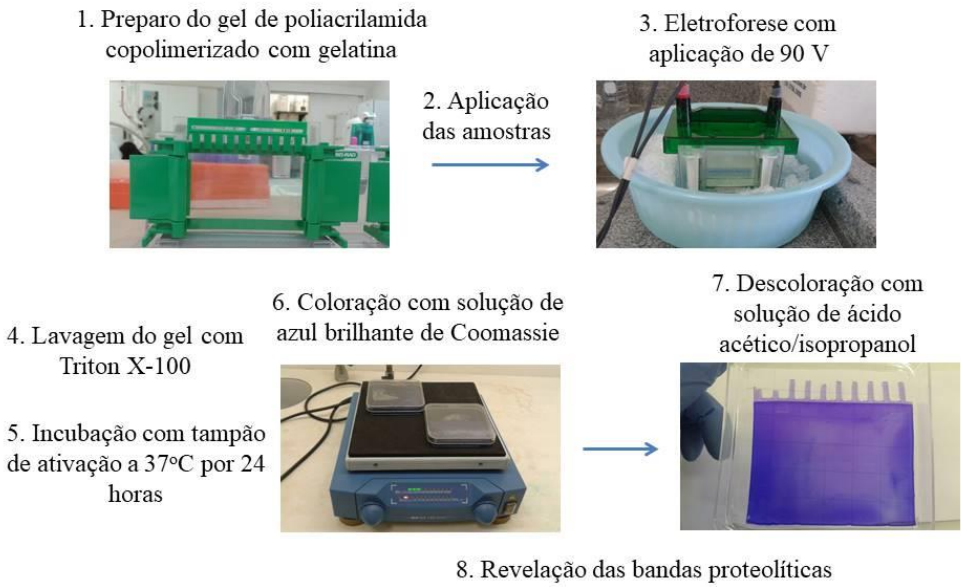

Figura 12 – Esquema representativo das etapas da técnica de zimografia em gel.

IV- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Acompanhamento da estabilidade da nanoemulsão de ClAlPc

O monitoramento da estabilidade físico-química da formulação nanoemulsão de ClAlPc foi realizado através do acompanhamento do tamanho médio de partículas, índice de polidispersão (IPd) e potencial zeta durante 6 meses no equipamento Zetasizer®.

Os métodos mais utilizados para determinação do tamanho de partícula são a espectroscopia de correlação de fótons e as microscopias eletrônica de varredura ou transmissão (MEV ou MET) (SCHAFFAZICK et al., 2003). A espectroscopia de correlação de fótons, ou também chamada de espalhamento dinâmico de luz (em inglês, Dynamic Light Scattering), é um método rápido e fácil para determinação da distribuição, tamanho médio de partículas e índice de polidispersão de uma amostra, podendo ser utilizado em análises rotineiras (GAUMET et al., 2008a).

O tamanho de partícula é obtido pela determinação do raio hidrodinâmico das partículas em suspensão através da interação com a luz, geralmente em um ângulo de 90º, a qual cada partícula é vista como uma esfera (SCHAFFAZICK et al., 2003; GAUMET et al., 2008b). Alguns parâmetros como viscosidade ou pH do meio dispersante, temperatura, concentração das partículas e sedimentação podem influenciar nos resultados. Geralmente a análise é realizada em meio aquoso para não interferir nestes resultados.

Os dados encontram-se abaixo nas Figuras 13 e 14. A nanoemulsão de ClAlPc obtida apresentou tamanho médio de partículas de 181.4 nm no primeiro dia após o preparo, ou seja, a distribuição de partículas foi simétrica ao redor do valor 181 nm. Os dados foram analisados estatisticamente pelo método One-Way ANOVA seguido do pós-teste Tukey´s t-test para múltiplas comparações entre as amostras e não houve significância estatística entre a primeira e última análise do tamanho médio de partículas (considerando $p<0,05$).

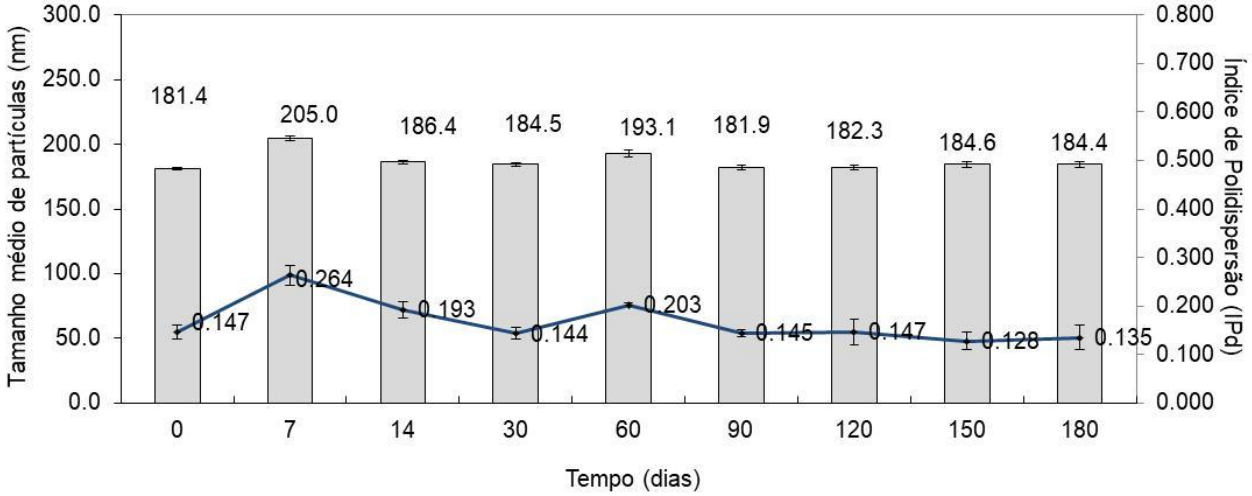

Figura 13 - Acompanhamento da estabilidade da nanoemulsão de ClAlPc em função do tempo através da análise do tamanho médio de partículas e índice de polidispersão (IPd).

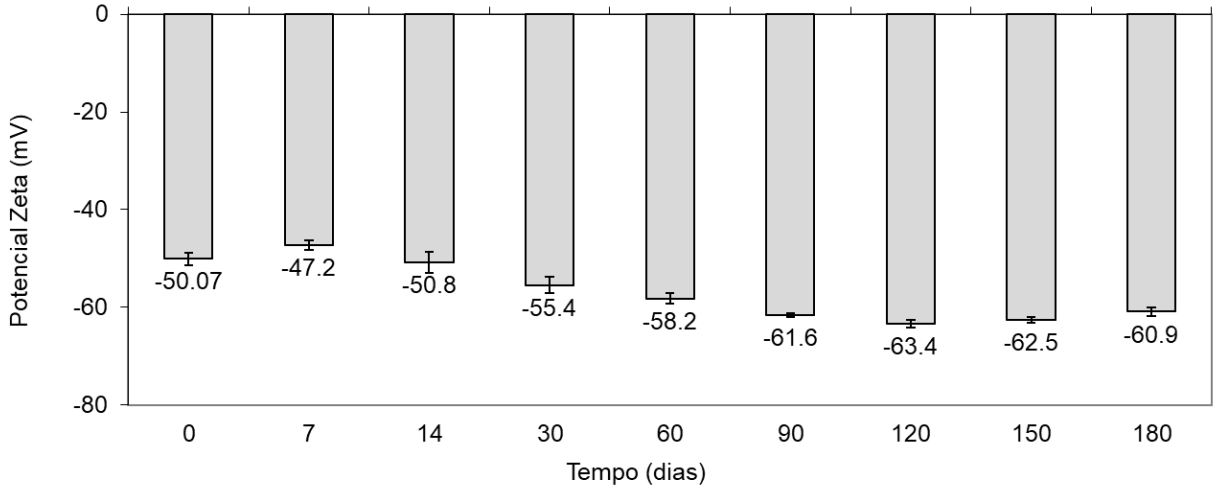

Figura 14 - Acompanhamento da estabilidade da nanoemulsão de ClAlPc em função do tempo através da análise do Potencial Zeta.

A tendência à agregação ou sedimentação pode ser monitorada pela observação de mudanças na distribuição de tamanhos de partículas, sendo um parâmetro importante para avaliação da estabilidade em função do tempo de armazenamento (SCHAFFAZICK et al., 2003), por isso podemos dizer que a formulação manteve-se estável até o final do período analisado, não apresentando fenômenos de agregação aparente.

Idealmente, os nanocarreadores apresentam uma distribuição de tamanho de partícula unimodal (somente uma população) e baixo índice de polidispersão (SCHAFFAZICK et al., 2003). A interpretação da distribuição do tamanho de partícula está associada ao índice de

polidispersão (IPd). O IPd leva em consideração o tamanho médio de partícula, o índice de refração do solvente, o ângulo de detecção e variância da distribuição. Em uma escala de 0 a 1, um índice de polidispersão menor que 0,1 está associado a uma alta homogeneidade da amostra (população monomodal). Ao contrário, um IPd alto sugere uma distribuição de tamanho de partículas ampla (sistema polidisperso) ou várias populações (plurimodal) (GAUMET et al., 2008a). Valores de IPd acima de 0,3 indicam alta heterogeneidade da amostra (VERMA et al., 2003).

Podemos dizer que a nanoemulsão de ClAlPc utilizada é um sistema predominantemente monodisperso, indicado pelo IPd relativamente baixo (menor que 0,3) e apresenta, portanto, homogeneidade na amostra.

O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas analisadas, sendo que um valor absoluto alto sugere alta estabilidade da nanoemulsão devido às forças de repulsão existentes que tendem a evitar a agregação (KULKARNI e FENG, 2013; SCHAFFAZICK et al., 2003). Desta forma, a análise do potencial zeta da nanoemulsão de ClAlPc indicou que as partículas também são estáveis do ponto de vista de equilíbrio eletrostático, reafirmando a alta estabilidade do sistema, já que este resultado está de acordo com os outros dados (tamanho de partículas e IPd).

4.2- Ensaio de biocompatibilidade da nanoemulsão

A biocompatibilidade da formulação foi avaliada com a nanoemulsão “vazia”, ou seja, sem a incorporação do fármaco fotossensibilizante (ftalocianina).

As culturas celulares de fibroblastos NIH/3T3 foram incubadas nas concentrações de 1%; 2,5%; 5,0%; 7,5% e 10% (v\v) e o teste de MTT foi utilizado para avaliar a viabilidade celular após o tratamento (conforme protocolo descrito no Item 3.3).

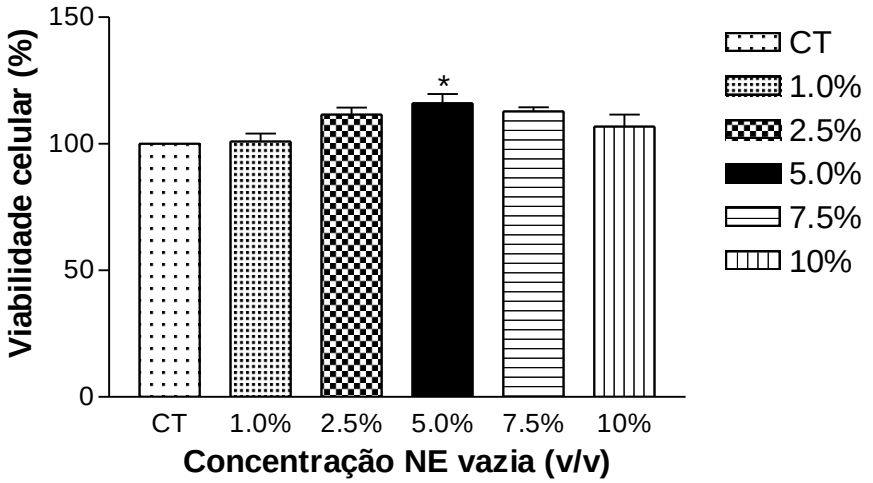

Figura 15 - Ensaio de biocompatibilidade *in vitro* da formulação nanoemulsão vazia (NE vazia) em cultura de fibroblastos NIH/3T3. CT = controle; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0% = porcentagem em volume de formulação. O ensaio foi realizado em triplicata, sendo n=16 poços para cada réplica. A significância estatística foi determinada pelo teste de variância One-Way ANOVA seguido do pós-teste Tukey t-test para múltiplas comparações ($p<0,05$). *Resultados que apresentaram significância estatística comparados com o grupo controle (CT).

Os resultados indicam ausência de citotoxicidade dos componentes da formulação na faixa de concentração avaliada, ou seja, até 10% (v/v). Para todas as concentrações avaliadas, a viabilidade celular obtida foi próxima ao percentual do grupo controle, e exceto para a concentração de 5%, não houve variação estatística entre os valores encontrados ($p<0,05$).

Esta análise preliminar da formulação sem o fármaco é um ensaio importante para determinação da faixa de concentração do fármaco que será incorporado na formulação. Ou seja, levando em consideração a concentração de ftalocianina que se deseja utilizar nos experimentos futuros, sabemos que até 10% em volume de formulação "vazia" não causa morte celular.

4.3- Ensaio de citotoxicidade da nanoemulsão de ClAlPc

A citotoxicidade da formulação ClAlPc/NE também foi avaliada (na ausência de luz) em cultura de células em monocamada através do teste de MTT, como descrito anteriormente (Item 3.3).

Este é um ensaio importante, pois aliado aos resultados anteriores da nanoemulsão vazia, é indicativo da biocompatibilidade da formulação (IS0 109931). Desta forma, pode-se determinar uma faixa de concentração adequada e segura para utilizarmos nos próximos testes *in vitro*.

Sendo assim, as culturas celulares foram incubadas nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10 µmol/L de ClAlPc/NE.

Os resultados (Figura 16) mostram ausência de citotoxicidade nas concentrações até 5,0 µmol/L, pois o percentual de viabilidade celular obtido foi maior que 80% do grupo controle (sem formulação, somente meio). Na concentração de 10.0 µmol/L a viabilidade celular foi de aproximadamente 78%, indicando início de toxicidade. Observou-se que houve diferença estatística nas concentrações de 5,0 e 10 µmol/L, quando os resultados foram comparados com o grupo controle (CT) pelo teste de variância One-Way ANOVA, seguido do pós-teste Tukey t-test.

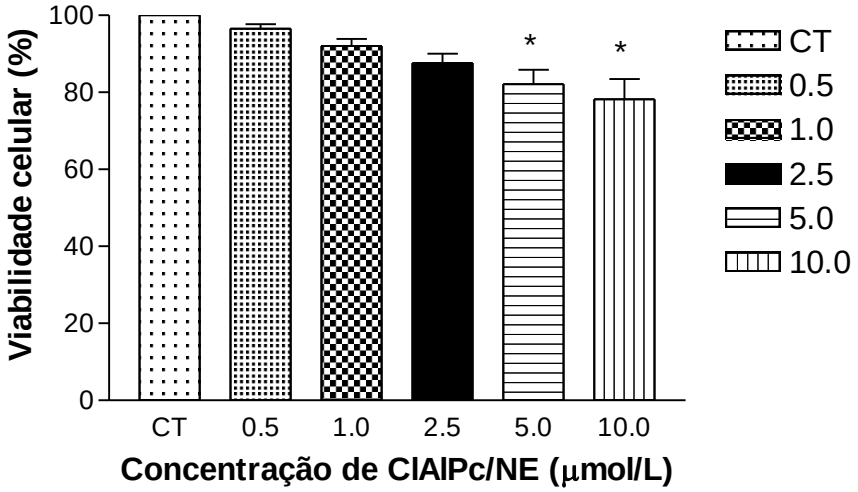

Figura 16 - Ensaio de citotoxicidade *in vitro* da formulação nanoemulsão de ClAlPc em cultura de células-tronco HBMS, na ausência de luz. CT = controle; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 = concentração de ClAlPc/NE (µmol/L). O ensaio foi realizado em triplicata, sendo n=16 poços para cada réplica. A significância estatística foi determinada pelo teste de variância One-Way ANOVA seguido do pós-teste Tukey t-test para múltiplas comparações ($p<0,05$). *Resultados que apresentaram significância estatística comparados com o grupo controle (CT).

Além disso, testou-se a citotoxicidade da formulação ClAlPc/NE em cultura de fibroblastos humanos BJ (ATCC® CRL-2522™) e observou-se também a ausência de citoxicidade nas mesmas concentrações de ClAlPc/NE (0,5 a 10 µmol/L) (Figura 17).

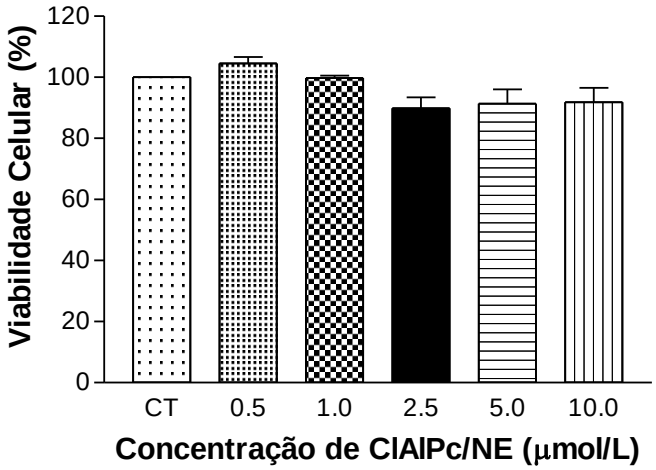

Figura 17 - Ensaio de citotoxicidade *in vitro* da formulação nanoemulsão de ClAlPc em cultura de fibroblastos humanos BJ, na ausência de luz. CT = controle; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 = concentração de ClAlPc/NE (μmol/L). O ensaio foi realizado em triplicata, sendo n=16 poços para cada réplica. A significância estatística foi determinada pelo teste de variância One-Way ANOVA seguido do pós-teste Tukey t-test para múltiplas comparações ($p<0,05$). Não houve significância estatística entre as amostras.

Nos ensaios de fotobiomodulação (testes que serão discutidos no Item 4.11) a nanoemulsão de ClAlPc foi adicionada ao meio de cultura dos equivalentes dérmicos e o tratamento não foi retirado. Por isto, decidiu-se também avaliar a citotoxicidade da ClAlPc/NE em um período maior de incubação que o protocolo convencional do laboratório (3 horas) e realizamos este mesmo ensaio, porém, o período de incubação foi de 24 horas. Ou seja, após 24 horas o meio de cultura contendo ClAlPc/NE foi retirado das placas de 96 poços e então prosseguiu-se com o protocolo do ensaio de MTT. Não foi observado citotoxicidade mesmo após um período maior de incubação (Figura 18):

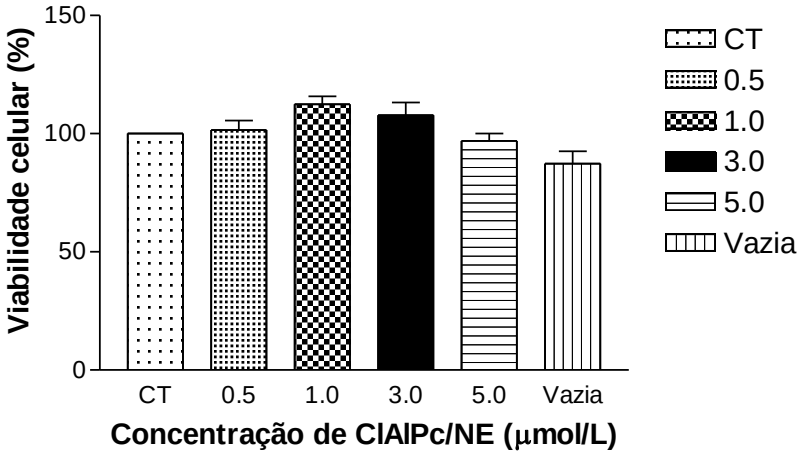

Figura 18 - Ensaio de citotoxicidade *in vitro* da formulação nanoemulsão de ClAlPc após 24 horas de incubação em cultura de fibroblastos NIH/3T3, na ausência de luz. CT = controle; 0,5; 1,0; 3,0; 5,0 = concentração de ClAlPc/NE (μmol/L). O ensaio foi realizado em triplicata, sendo n=16 poços para cada réplica. A significância estatística foi determinada pelo teste de variância One-Way ANOVA seguido do pós-teste Tukey t-test para múltiplas comparações ($p<0,05$). Não houve significância estatística entre as amostras.

4.4- Microscopia Confocal em monocamada

Realizamos o estudo de microscopia confocal *in vitro* (monocamada) para observar as características celulares da linhagem de fibroblastos humanos BJ e verificar a localização intracelular do fármaco fotossensibilizante ftalocianina de cloro-alumínio.

Foi utilizado o marcador faloidina (Alexa flúor 488) para visualização do citoplasma celular, que possui excitação em 495 e emissão em 518 nm, e o núcleo celular foi marcado com DAPI (excitação 360 nm e emissão 460 nm). Na Figura 19 podemos observar o citoplasma celular em verde (faloidina) e o núcleo celular marcado em azul (DAPI). Como já havíamos observado na microscopia de campo claro, a linhagem BJ possui morfologia alongada com citoplasma abundante e prolongamentos que realizam o contato entre as células quando em cultura, e por isso acabam se tornando células grandes.

Neste procedimento, a vantagem de se trabalhar com a ftalocianina de cloro-alumínio é que devido as suas características fotofísicas e fotoquímicas não há necessidade de utilização de marcadores especiais. Desta forma, o fármaco foi excitado em um determinado comprimento de onda (610 nm) e posteriormente emitiu em outro comprimento de onda de menor energia (675 nm). Na Figura abaixo, podemos observar a presença intracelular da ClAlPc (em vermelho) e concluímos que o tempo de incubação utilizado no procedimento foi suficiente para internalização do fármaco que fica localizado homogeneamente no citoplasma da célula.

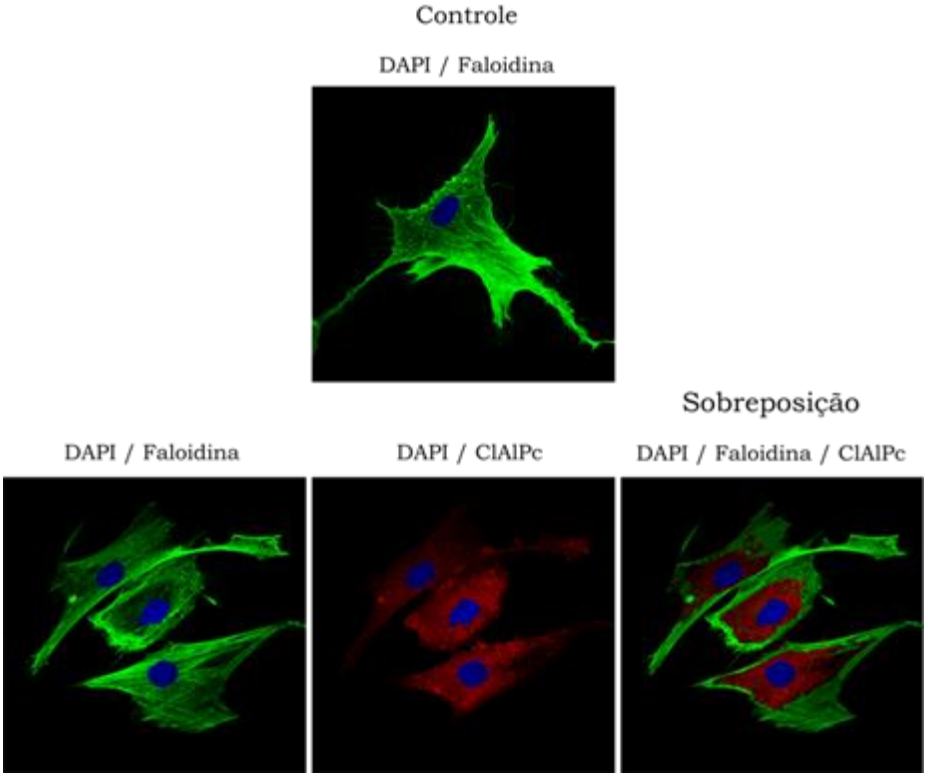

Figura 19 - Microscopia confocal *in vitro*. DAPI (azul): núcleo celular; Faloidina (verde): citoplasma; ClAlPc (vermelho).

4.5- Extração do colágeno tipo I

O colágeno do tipo I pode ser extraído e isolado a partir de fontes animais (bovinos, suínos e ratos) e utilizado na engenharia tecidual na construção dos tecidos *in vitro*.

A molécula de colágeno nativa pode ser dividida basicamente em três domínios: telopeptídeo amino-terminal (N-terminal), região de tripla hélice e telopeptídeo carboxi-terminal (C-terminal). Nestas regiões são onde se encontram os resíduos de lisina ou hidroxilisina responsáveis pelas ligações cruzadas covalentes intermoleculares entre as cadeias de colágeno. O tratamento do colágeno com enzimas proteolíticas como a pepsina pode clivar os telopeptídeos terminais para produzir uma molécula de atelocolágeno, ou seja, sem os telopeptídeos, porém com a estrutura de tripla hélice intacta.

Desta forma, o colágeno pode ser obtido comercialmente em duas formas, telocolágeno e atelocolágeno. O primeiro é obtido através de métodos enzimáticos, na qual os telopeptídeos terminais presentes na molécula de colágeno são clivados por enzimas e obtém-se o atelocolágeno. Quando a extração é realizada em meio ácido fraco, os telopeptídeos são mantidos, obtendo-se assim o colágeno na forma de telocolágeno. Podemos dizer que o

telocolágeno é uma forma extraída mais nativa, pois preserva melhor as características da molécula de colágeno.

Os telopeptídeos não possuem a sequência repetida de Gly-X-Y e por esta razão não são helicoidais. Em vez disto, eles possuem um aminoácido incomum denominado hidroxilisina, que é importante para a formação e estabilização das fibras de colágeno. No processo de fibrilogênese, a enzima lisil oxidase catalisa a ligação covalente entre os resíduos de lisina (ou hidroxilisina) nos telopeptídeos N-terminais e C-terminais de moléculas adjacentes, unindo duas moléculas de colágeno ao longo da fibrila. Sendo assim, a remoção destes telopeptídeos pode resultar em um arranjo amorfo das moléculas de colágeno e perca da capacidade de formação das fibrilas. Estudos mostram que o telocolágeno utilizado *in vitro* apresenta capacidade de polimerização mais acelerada formando géis mais consistentes e resistentes (HOLMES et al., 2017).

A partir destas informações, concluímos que o método de extração escolhido (extração com ácido fraco), além de baixo custo, também proporciona a obtenção de moléculas de colágeno de forma fácil e rápida que podem ser utilizadas na formação de matrizes extracelulares na área de engenharia tecidual. As estruturas obtidas são principalmente unidades de tropocolágeno, com os telopeptídeos preservados e, portanto, com alta capacidade de formação de fibrilas em condições adequadas.

Entretanto, o rendimento do processo é relativamente menor, pois as ligações covalentes que ocorrem nas fibras de colágeno são quimicamente rearranjadas com o tempo nos tecidos maduros para formar ligações ácido-estáveis (ligações aldiminas), responsáveis pelo aumento da força mecânica das fibras. Por isso, em tecidos maduros, apenas uma pequena fração do colágeno é constituída de monômeros solúveis em ácidos (10%) e o restante que encontramos são fibras poliméricas insolúveis (HOLMES et al., 2017). Por isso, após procedimento de extração das moléculas solúveis em ácido fraco, é importante que a solução seja centrifugada (em alta rotação) para a separação destas estruturas insolúveis.

Foram testados dois protocolos de extração de colágeno tipo I em solução de ácido acético e observamos algumas diferenças na solução final obtida, como por exemplo, na concentração final e no potencial hidrogênio-iônico (pH), que acreditamos ter influência nos resultados experimentais que serão mostrados na sequência.

Primeiramente, a extração do colágeno tipo I foi realizada em solução de ácido acético 0,1 % (v/v) na proporção de 60 mL de solução para cada 1 g de tendão. Com este protocolo obtivemos uma solução final de concentração aproximadamente 1mg/mL (dados apresentados no Item 4.6) e pH final de 4.5.

Testamos também outro protocolo de extração, na qual inicialmente os tendões foram expostos à uma solução de ácido acético 1,5% (v/v) por 1h30 com o intuito de acelerar o processo de extração e posteriormente, o volume de ácido foi diluído para obter uma solução ácida de concentração final de 0,5% (v/v). A proporção utilizada foi de 100 mL de ácido acético para cada g de tendão. Neste protocolo obtivemos uma solução de colágeno com concentração final de aproximadamente 0,5 mg/mL e pH 2.0.

O ponto isoelétrico do colágeno encontra-se na faixa de pH 6,5 a pH 8,5. Portanto, em meio ácido predominam moléculas de carga positiva, favorecendo as ligações com as moléculas de água, ou seja, neste pH as moléculas de colágeno possuem capacidade de absorver grande quantidade de água, ocorrendo o que chamamos de "inchaço" da molécula de colágeno (FERREIRA DA SILVA e BARRETTO PENNA, 2012). Acredita-se que estas interações em meio ácido estabilizam as moléculas de colágeno, de forma que não ocorram ligações, ou se ocorrerem, em menor quantidade, entre as próprias moléculas de colágeno, predominando estruturas isoladas ou de peso molecular menor.

Segundo estudo realizado por Chaudry, em pH inferiores a 4,25 predominam-se estruturas denominadas de "swollen collagen" (colágeno inchado), caracterizadas por moléculas desordenadas de tropocolágeno, mas que ainda possuem uma estrutura secundária. Em pH fisiológico (pH 7,4) encontramos principalmente estruturas fibrilares, devido à capacidade das fibras de colágeno se reconstituir *in vitro* (CHAUDRY et al., 1997).

O colágeno tipo I extraído em solução de ácido acético 0,1% e com pH final de 4,5 apresentou bons resultados no início dos experimentos, porém após algum tempo, começamos a perceber diferença na formação e na cinética de contração da matriz extracelular. Por isso, recomendamos que esta seja imediatamente utilizada e não seja armazenada por períodos longos.

O colágeno tipo I extraído em solução de ácido acético 0,5% e pH final de 2,0 apresentou-se estável e foi utilizado até o final deste projeto. Concluímos, que para melhor conservação é desejável que a solução de colágeno seja armazenada em pH ácido (pH = 2,0) em geladeira (temperatura entre 2°C e 8°C). Além disso, observamos que as soluções de colágeno encontradas no mercado são disponibilizadas nesta faixa de pH, reforçando que são melhor conservadas desta forma.

4.6- Quantificação do colágeno do tipo I

O colágeno tipo I foi extraído de tendões da cauda de ratos *Wistar*, de acordo com protocolo descrito anteriormente (Item 3.4.1). Após a diálise da solução obtida, realizou-se a quantificação da hidroxiprolina livre na amostra. A prolina é um aminoácido abundante no colágeno presente em sua forma hidroxilada.

Construiu-se uma curva de calibração, a partir de um estoque padrão de hidroxiprolina (Sigma-Aldrich). O teste foi realizado em triplicata e utilizou-se 9 concentrações diferentes de hidroxiprolina, variando-se de 0,8 µg/mL a 4,0 µg/mL. A curva obtida (Figura 20) apresentou linearidade na faixa de concentração avaliada e coeficiente de correlação linear adequado (r=0,99), podendo então ser utilizada para determinar a quantidade de hidroxiprolina livre na solução de colágeno (BRASIL, 2003).

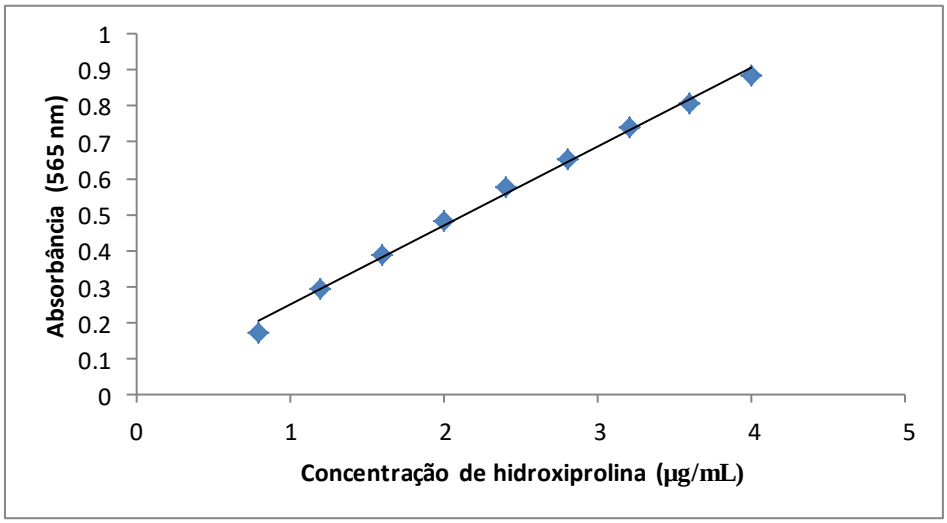

Figura 20 - Curva de linearidade do padrão de hidroxiprolina (triplicata). O coeficiente de correlação linear obtido foi de 0,9947 (Equação de reta: y = 0,2207x + 0,0256).

Através da equação de reta obtida, determinou-se a quantidade de hidroxiprolina livre presente na amostra de colágeno. Segundo Kolar, a relação entre hidroxiprolina e colágeno é de 12,5%, e a partir desta porcentagem calculou-se então a concentração da amostra de colágeno (KOLAR, 1990). A concentração obtida foi de aproximadamente 1,1 mg/mL para o colágeno extraído em ácido acético 0,1%; e 0,51 mg/mL para o colágeno extraído com ácido acético 0,5%. Estas concentrações obtidas foram levadas em consideração posteriormente no preparo dos equivalentes dérmicos.

4.7- Preparo dos Equivalentes Dérmicos e determinação da cinética de contração

Os equivalentes dérmicos obtidos nesta etapa do trabalho foram preparados com fibroblastos humanos BJ (ATCC® CRL-2522™) e uma matriz de colágeno do tipo I. O colágeno tipo I é a principal proteína estrutural e funcional encontrada na matriz extracelular da derme humana. O colágeno apresenta biocompatibilidade e baixa imunogenicidade, tornando a sua utilização segura. Além disso, as estruturas formadas apresentam poros adequados, que fornecem um microambiente favorável para a adesão, proliferação e migração celular. Por isso, o colágeno é o material natural mais estudado e clinicamente utilizado no desenvolvimento de substitutos cutâneos pela engenharia tecidual (BI e JIN, 2013; DEBELS et al., 2015b; NICHOLAS , JESCHKE e AMINI-NIK, 2016).

Após o preparo dos equivalentes dérmicos, monitorou-se por 14 dias o diâmetro médio de cada disco para determinação da cinética de contração e também se observou a formação da matriz tridimensional de colágeno por microscopia óptica, através de um sistema de aquisição de imagens acoplado a um microscópio óptico.

A seguir, a Tabela 2 apresenta os diâmetros de cada equivalente dérmico no período de até 14 dias após o preparo e o perfil de contração dos discos a partir do valor médio dos diâmetros está representado na Figura 21.

Tabela 2 – Diâmetro (em cm) dos equivalentes dérmicos monitorados por 14 dias após o preparo (D0 = dia do preparo).

	D1	**D2**	**D3**	**D5**	**D7**	**D10**	**D14**
ED1	3.6	2.8	2.5	2.3	2.0	1.7	1.5
ED2	3.5	2.8	2.5	2.1	1.9	1.6	1.4
ED3	3.0	2.5	2.4	2.1	1.8	1.6	1.3
ED4	3.1	2.5	2.4	2.1	1.9	1.6	1.3
ED5	3.2	2.7	2.5	2.2	1.9	1.7	1.4
ED6	3.2	2.6	2.5	2.3	2.0	1.7	1.4
ED7	3.2	2.7	2.4	2.2	1.9	1.7	1.4
ED8	3.2	2.5	2.4	2.0	1.8	1.5	1.3
ED9	3.0	2.5	2.4	2.2	1.9	1.7	1.5
ED10	3.0	2.6	2.4	2.2	1.9	1.6	1.3
ED11	2.9	2.4	2.3	2.0	1.8	1.5	1.3
ED12	3.0	2.5	2.4	2.1	1.9	1.6	1.4

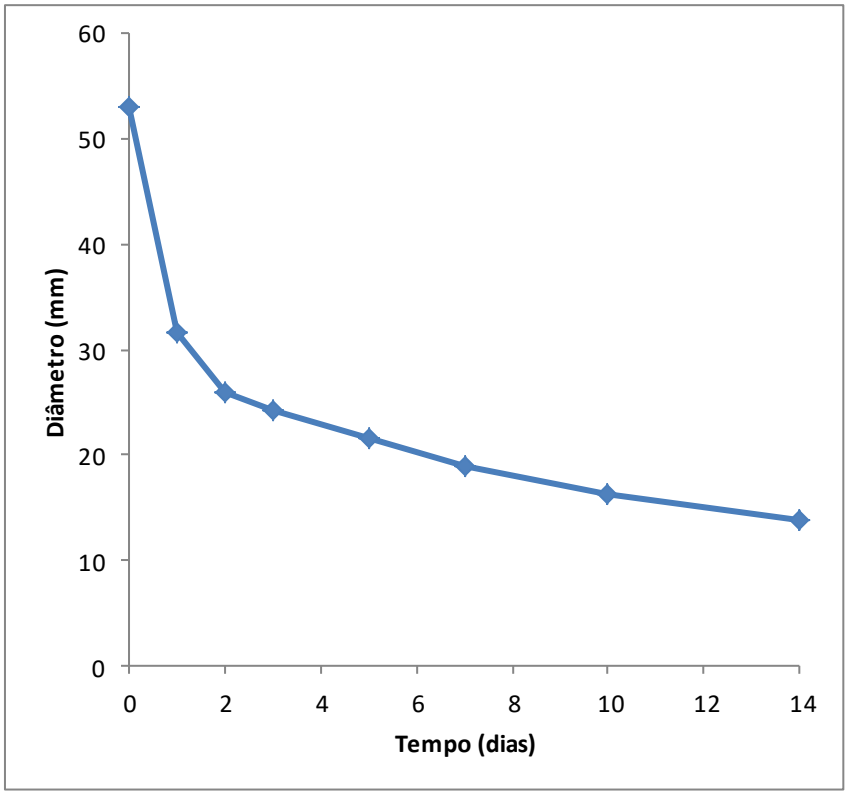

Figura 21 - Perfil de contração médio dos equivalentes dérmicos preparados com fibroblastos humanos BJ (ATCC® CRL-2522™) ($1x10^5$ células/ED) ao longo de 14 dias. Considerou-se como diâmetro inicial o tamanho interno de uma placa de Petri de 60 mm (53 mm).

Após 24 horas do preparo, os equivalentes dérmicos contraíram e apresentaram diâmetros médios variando entre 2,9 e 3,6 cm. Ao final das duas semanas, os equivalentes dérmicos apresentaram diâmetro médio entre 1,3 e 1,5 cm, variando apenas 0,2 cm entre eles, ou seja, obtivemos discos de tamanhos homogêneos. Além disso, podemos dizer que 72 horas (3 dias) foi o período crítico, na qual ocorreu a maior parte da contração.

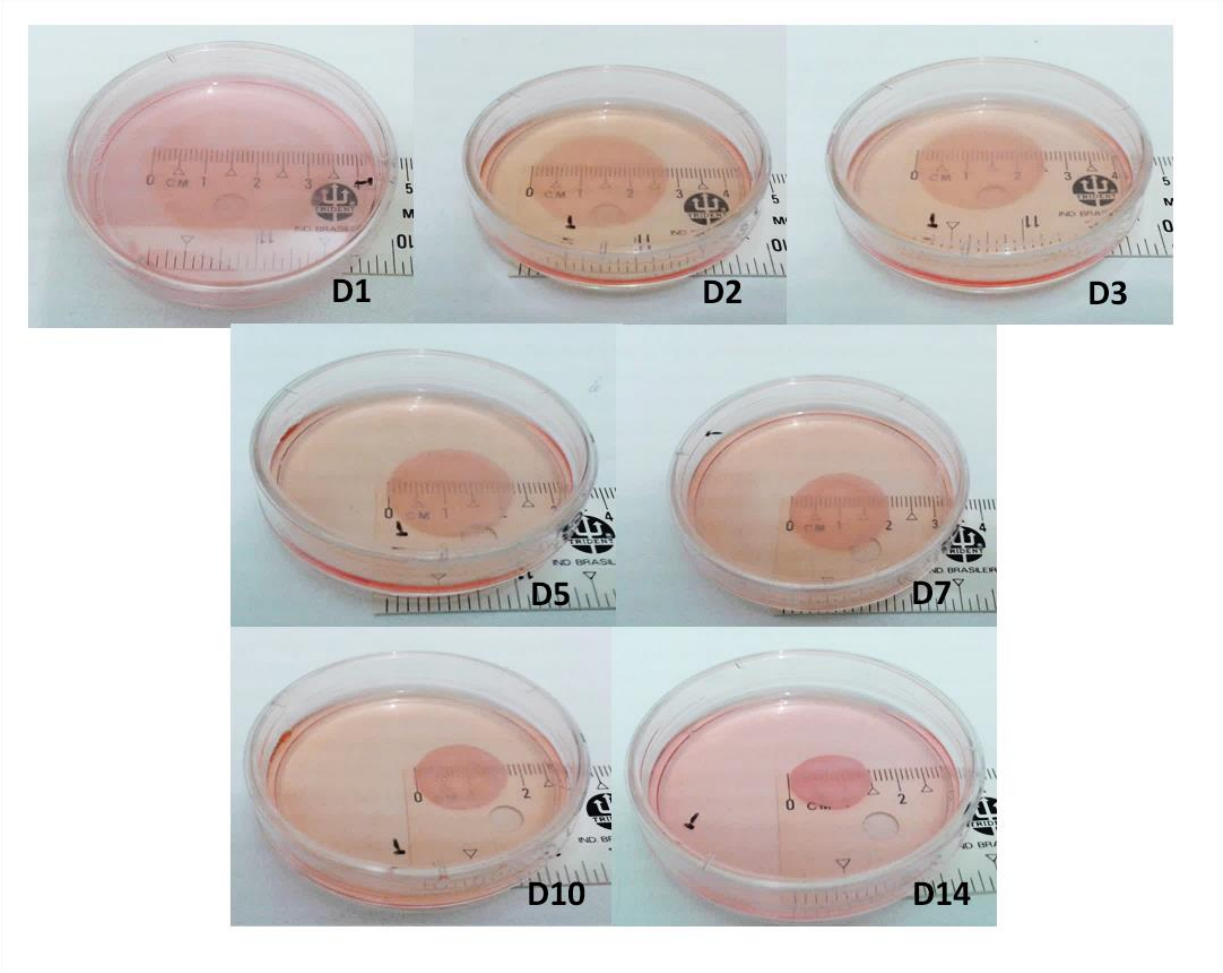

Figura 22 - Fotografias dos equivalentes dérmicos (ED) em meio DMEM 10% completo nas placas de Petri de 60 mm de diâmetro para cultura celular em suspensão ao longo dos 14 dias de monitoramento. D1, 2, 3, 5, 7, 10 e 14 = dias após o preparo. Linhagem celular de fibroblastos humanos BJ (ATCC® CRL-2522™) $1x10^5$ células/ED.

Utilizando-se um sistema de aquisição de imagens acoplado ao microscópio óptico, foi possível visualizar a formação da rede tridimensional de colágeno. Na Figura 23, podemos observar a formação da rede intercelular já no primeiro dia após o preparo dos equivalentes dérmicos. A partir do 3º dia podemos observar vários pontos mitóticos (pontos mais escuros) e uma rede tridimensional densa, sendo que sua visualização em microscópio convencional torna-se difícil após o quinto dia.

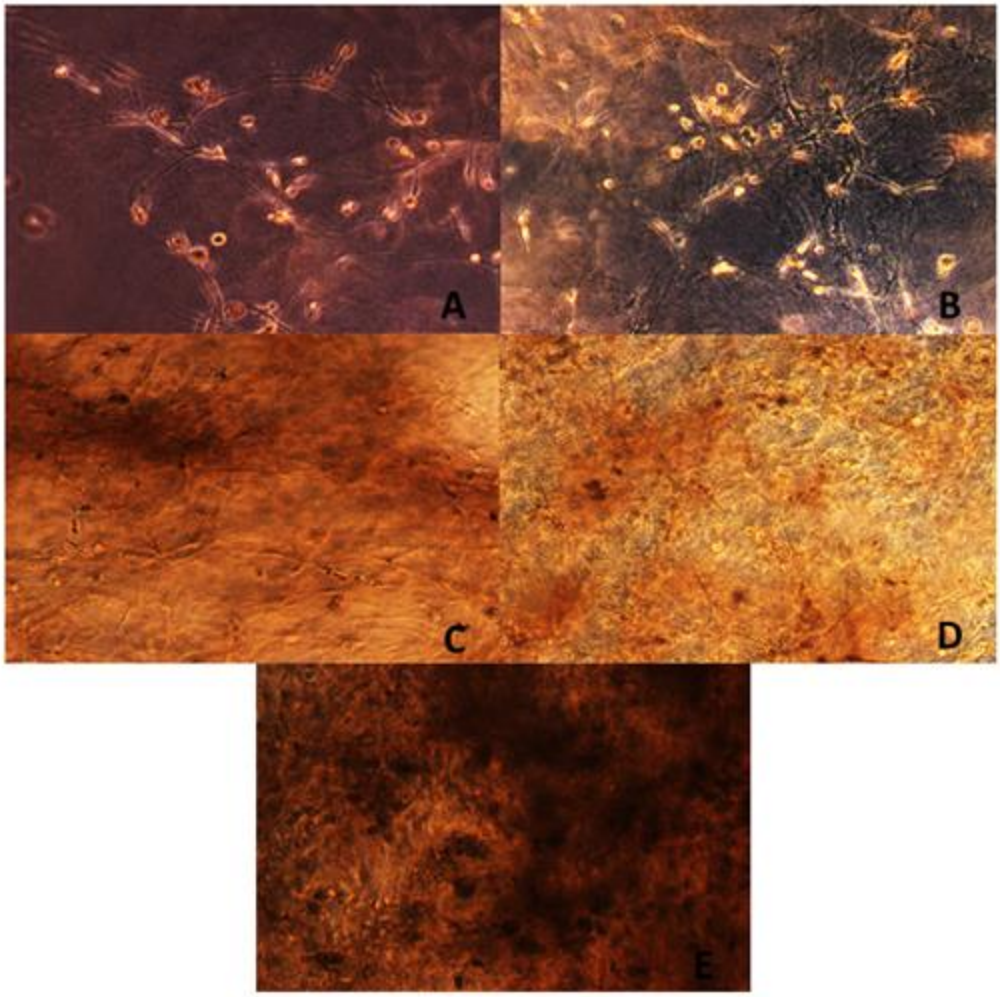

Figura 23 - Micrografias mostrando a matriz tridimensional de colágeno dos equivalentes dérmicos. A = 24 horas; B = 48 horas; C = 3 dias; D = 5 dias; E = 7 dias após o preparo. Linhagem celular de fibroblastos humanos BJ (ATCC® CRL-2522™) $1x10^5$ células/ED. Imagens obtidas com conjunto de objetivas A-Plan 10x/0,25 Ph1, adaptado com uma câmera digital Canon 7.2 Mpixels.

As células possuem a capacidade de reestruturar e remodelar a matriz extracelular através de vários mecanismos bioquímicos que são importantes para no crescimento e desenvolvimento de tecidos, manutenção e funcionamento e também reparo de tecidos danificados. Estes mecanismos biológicos podem ser explorados e estudados *in vitro* através da utilização de hidrogéis que mimetizam a matriz extracelular e formam ambientes tridimensionais para o crescimento celular. Os hidrogéis utilizados na engenharia tecidual podem ser divididos basicamente em duas categorias: polímeros naturais ou sintéticos. Os hidrogéis naturais mais utilizados são o colágeno, ácido hialurôrico, alginato, quitosana e agarose (AHEARNE, 2014).

Um fator importante a ser considerado no estudo do comportamento celular na presença de matrizes extracelulares é a interação e os mecanismos de adesão célula-hidrogel. Estes mecanismos irão influenciar na contração e estabilização do hidrogel. No caso do colágeno e da fibrina, por exemplo, as células conseguem se ligar diretamente no hidrogel através de receptores celulares de superfície como integrinas e sindecanas, que são glicoproteínas transmembranas envolvidas na adesão e migração celular.

Os fibroblastos se ligam e se desprendem das fibras de colágeno através da α2β1 integrina e utilizam movimentos para "puxar" as fibras de colágeno e se aproximar umas das outras.

Se as fibras de colágeno não tiverem força suficiente para resistir à força aplicada, então estas irão se curvar resultando em um remodelamento contráctil da matriz extracelular, como demonstrado na Figura 24 (AHEARNE, 2014).

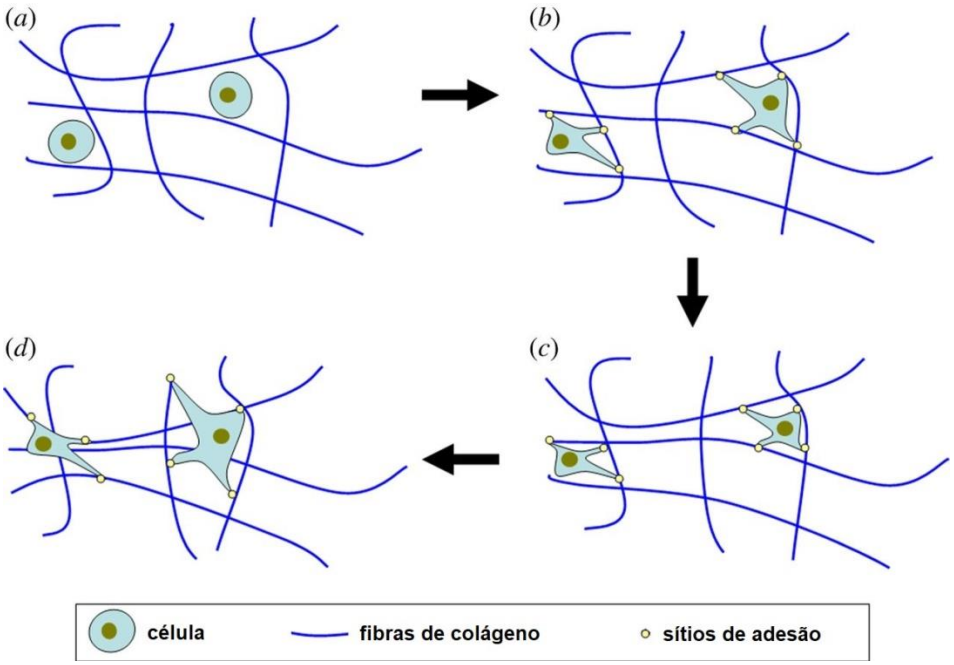

Figura 24 - Desenho esquemático do processo de contração em uma matriz de colágeno. (a) inicialmente as células estão espalhadas na matriz extracelular (b) as células adquirem morfologia alongada e se aderem às fibras de colágeno através de proteínas de membrana como a integrinas (c) as células "puxam" as fibras fazendo com que estas se curvem (d) as células de desprendem e se aderem às outras fibras resultando no processo de contração. Imagem retirada e adaptada de ((AHEARNE, 2014).

A redução no diâmetro dos equivalentes dérmicos deve-se também ao evento de intercruzamento das cadeias de colágeno que diminuem progressivamente a dimensão linear da amostra. Se considerarmos que processos de intercruzamento ou chamado *crosslinking* são etapas reativas na qual a taxa ou velocidade de reação depende do quadrado da densidade de

sítios ou grupos reativos de intercruzamento de cadeias, então este processo pode apresentar uma evolução temporal de segunda-ordem. Alguns trabalhos reportados na literatura têm descrito a cinética do processo a partir destas considerações (BUTLER , NG e PUDNEY, 2003; DAVIS e TABOR, 1963). Na sua forma integrada, e considerando o diâmetro como propriedade representativa, um gráfico do inverso do diâmetro contra o tempo de reação poderá apresentar uma região linear onde ocorre a predominância do intercruzamento como um processo de segunda ordem. O gráfico abaixo ilustra o comportamento típico de uma amostra de equivalente dérmico com o comportamento cinético descrito acima.

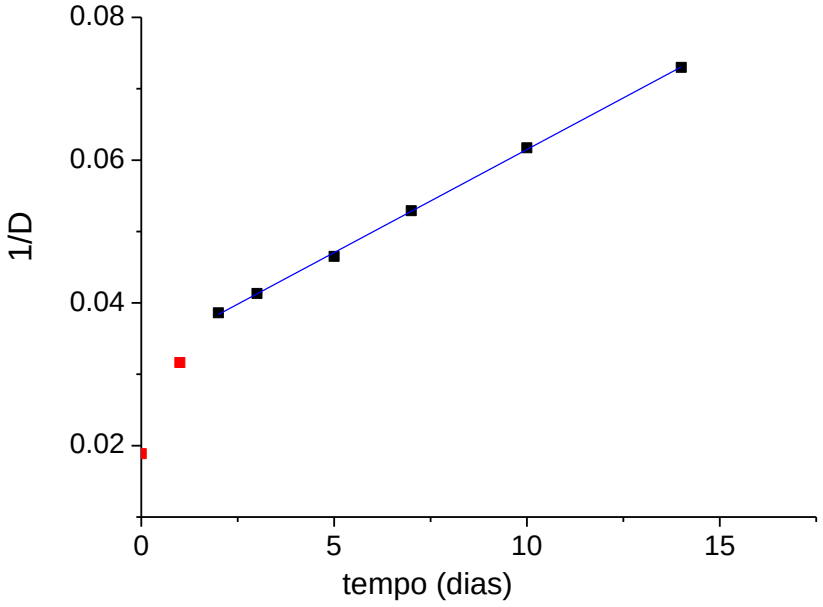

Figura 25 - Gráfico do inverso do diâmetro D (mm) dos equivalentes dérmicos *versus* tempo de contração em dias.

A partir da inclinação da região linear podemos calcular a taxa de redução do diâmetro com o tempo e o resultado obtido para a amostra foi de 2,9 ± 0,1 x 10^{-3} $(mm.dia)^{-1}$. Nota-se a presença de uma região inicial não linear na Figura 25, onde o processo de contração dos equivalentes dérmicos é maior, e posteriormente, apresenta uma cinética mais lenta. A rede tridimensional de colágeno é rapidamente formada e determinada por mecanismos celulares que envolvem a liberação de fatores de crescimento e diversos sinalizadores bioquímicos para induzir o processo de contração. Além disso, o processo de intercruzamento das fibrilas de colágeno também é um fator determinante na taxa de redução do diâmetro. Em um processo clássico os equivalentes dérmicos mantém uma cinética de contração que tende a se estabilizar com o decorrer do tempo. Fatores como concentração celular, grau de

intercruzamento e concentração de colágeno podem interferir neste processo, como veremos nos próximos itens.

4.8- Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica que produz imagens de alta resolução da superfície da amostra analisada, e por isso escolhemos esta metodologia para complementar os estudos de caracterização do modelo tridimensional. Nas Figuras abaixo (26 e 27), podemos visualizar a rede de colágeno densa que é formada no 14º dia após o preparo dos equivalentes dérmicos.

No aumento de 500 X temos uma imagem geral da estrutura formada, no qual as fibras de colágeno e as células se organizam para formar uma rede bem fechada, somente com alguns poros maiores, produzindo uma camada que parece “proteger” o sistema. Podemos visualizar a existência de fibras de colágeno mais finas e outras maiores formando esta rede densa.

Nos aumentos maiores (1.50 K X e 5.00 K X) podemos identificar a morfologia das células dispersas na rede de colágeno (detalhe para o aumento maior de 5.00 K X). Na linhagem de células-tronco HBMS, visualizamos a morfologia de células bem alongadas. Enquanto que nos equivalentes dérmicos preparados com a linhagem de fibroblastos NIH/3T3, a células apresentaram-se menos esticadas, porém com citoplasma maior, característico desta linhagem, e elas parecem interagir melhor com as fibras de colágeno.

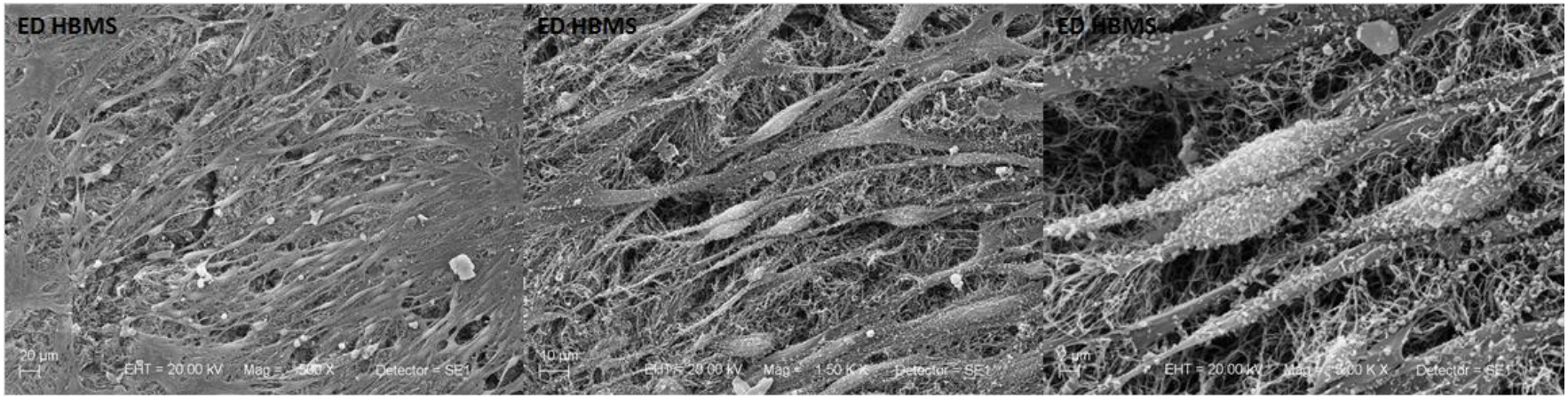

Figura 26 - Microscopia eletrônica de varredura dos equivalentes dérmicos 14 dias após o preparo. Linhagem de células-tronco HBMS ($6x10^5$ células/ED). Aumento de 500 X, 1.50 K X e 5.00 K X.

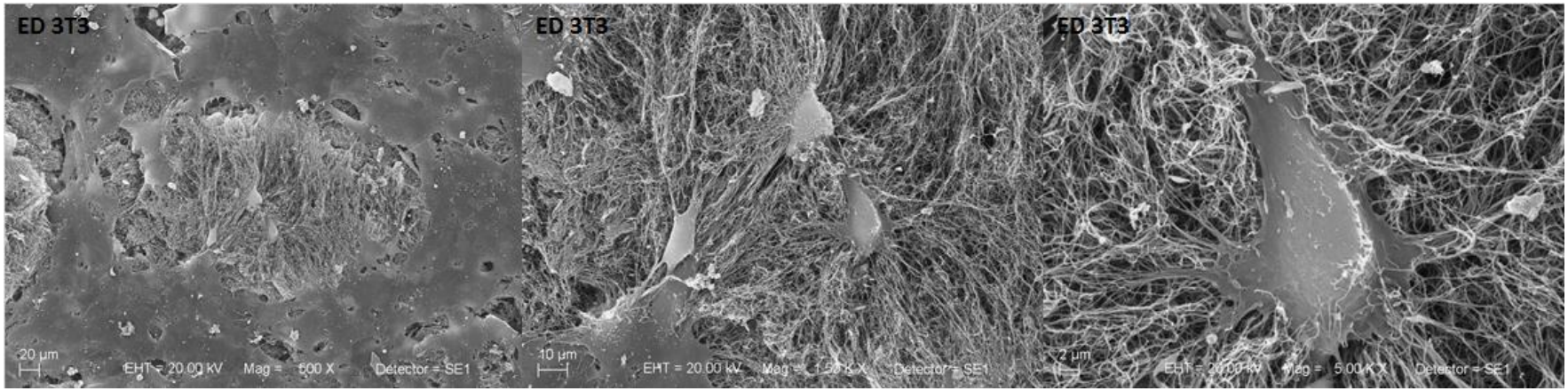

Figura 27 - Microscopia eletrônica de varredura dos equivalentes dérmicos 14 dias após o preparo. Linhagem de fibroblastos NIH/3T3 ($6x10^5$ células/ED). Aumento de 500 X, 1.50 K X e 5.00 K X.

4.9- Histologia

Os equivalentes dérmicos foram fixados e processados no 14º dia após o preparo para análise histológica. Realizaram-se dois tipos de cortes nas amostras: transversal, onde podemos ter uma visão mais superficial do modelo, e vertical, que permitiu a visualização das camadas internas formadas. As imagens dos cortes realizados estão apresentadas na Figura 28.

A coloração de Tricromo de Masson (em azul) é específica para marcação de estruturas como o colágeno. Observamos a presença de fibras mais espessas principalmente nas bordas dos equivalentes dérmicos e outras mais finas, além disso, as fibras tendem a se organizar no sentido longitudinal da amostra, como visualizado no corte vertical das amostras.

Observamos também regiões onde as fibras estão mais concentradas ao redor das células, como mostrado em detalhe no aumento de 40 X.

Na coloração de hematoxilina-eosina, podemos observar as células (coradas em roxo) dispersas na matriz (rosa) e a impressão que temos é que a proporção de colágeno em relação à quantidade de células é bem maior, proporcionando uma matriz onde as células podem migrar, proliferar e se diferenciar.

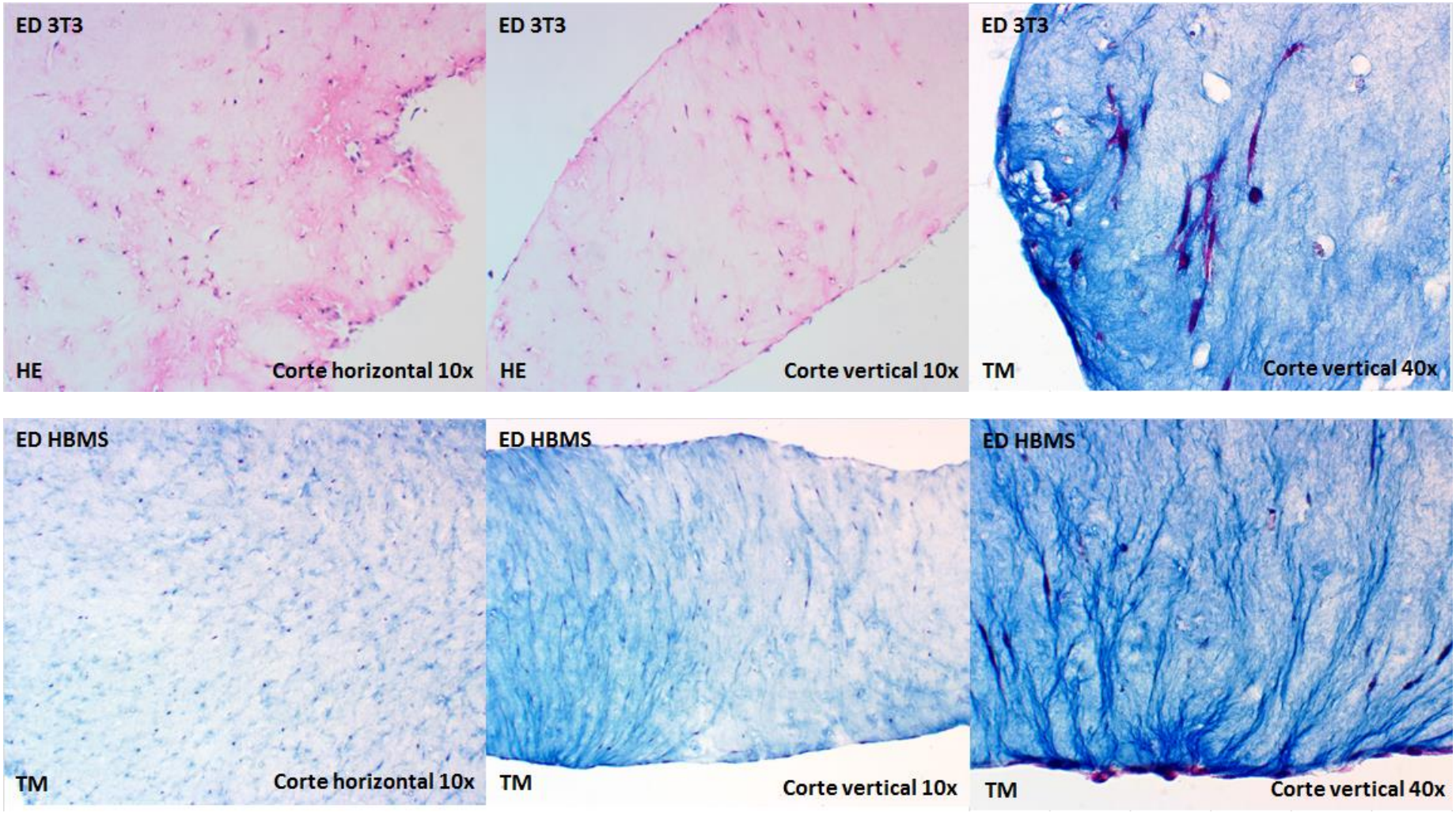

Figura 28 - Imagens de histologia dos equivalentes dérmicos 14 dias após o preparo. Acima com a linhagem de fibroblastos NIH/3T3 ($6x10^5$ células/ED) e abaixo com a linhagem de células-tronco HBMS ($6x10^5$ células/ED). Cortes horizontais e verticais de 9µm. Coloração hematoxilina-eosina e Tricromo de Masson.

4.10- Estudos com os Equivalentes Dérmicos: fatores que influenciam a cinética de contração

4.10.1- Influência da concentração celular na contração dos ED

A cinética de contração dos equivalentes dérmicos depende e pode ser regulada principalmente pela concentração de colágeno e pelo número inicial de células, além do tipo celular escolhido. Observa-se que a relação entre concentração de colágeno e contração é inversamente proporcional, ou seja, quanto maior a concentração de colágeno utilizado, menor é a contração dos discos nos primeiros dias, porém ao longo do tempo essa diferença vai se tornando menor. Com relação ao número de células, observa-se que quanto maior o número de células incorporadas no preparo, maior é a taxa de contração dos ED nos primeiros dias (BELL , IVARSSON e MERRILL, 1979).

Avaliou-se a influência da concentração celular inicial (utilizada no preparo) na contração dos equivalentes dérmicos e formação da rede tridimensional de colágeno. Para isto, no momento do preparo dos equivalentes dérmicos escolhemos as seguintes concentrações celulares de fibroblastos NIH/3T3: $1x10^5$, $3x10^5$, $6x10^5$ e $1x10^6$ células/ED (n = mínimo de 3 ED por grupo). O gráfico abaixo representa a cinética de contração dos diferentes grupos avaliados que pode ser visualizada também nas imagens a seguir.

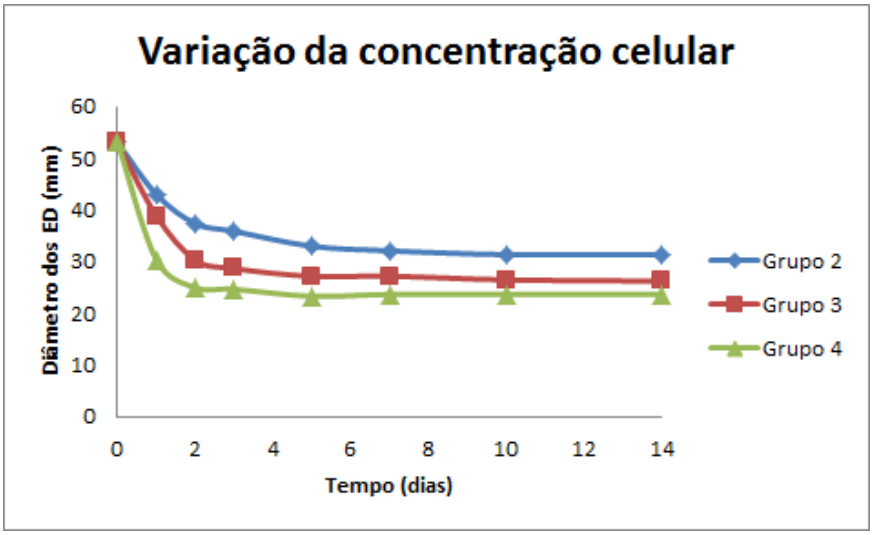

Figura 29 - Perfil de contração dos equivalentes dérmicos ao longo de 14 dias. Considerou-se como diâmetro inicial o tamanho interno de uma placa de Petri de 60 mm (53 mm). G2 = $3x10^5$ células/ED; G3 = $6x10^5$ células/ED e G4 = $1x10^6$ células/ED. Linhagem celular de fibroblastos NIH/3T3.

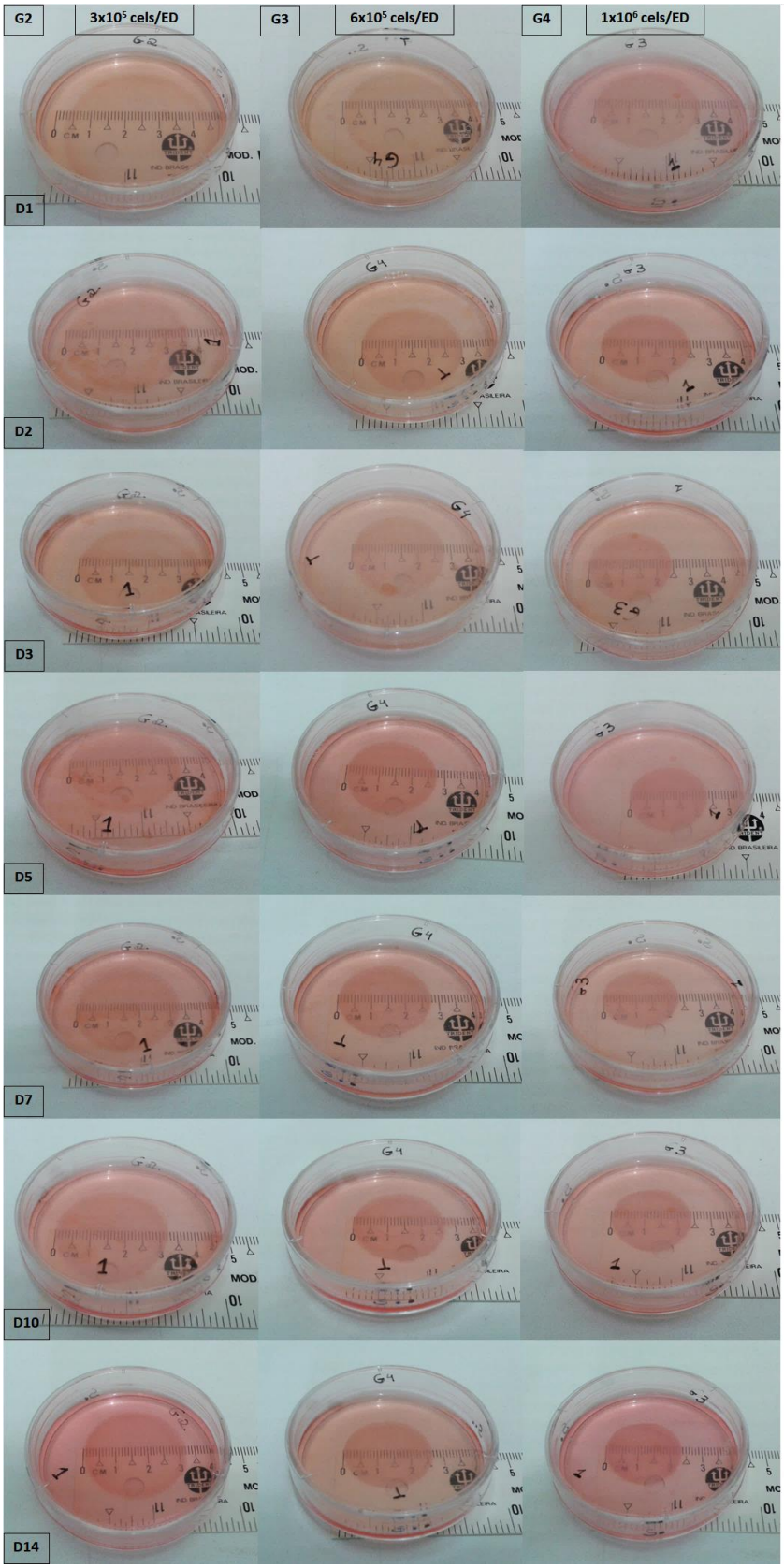

Figura 30 - Fotografias dos equivalentes dérmicos (ED) em meio DMEM 10% completo nas placas de Petri de 60 mm de diâmetro ao longo dos 14 dias de monitoramento. Linhagem celular de fibroblastos NIH/3T3. G2 = $3x10^5$ células/ED; G3 = $6x10^5$ células/ED e G4 = $1x10^6$ células/ED. D1, D2, D3, D5, D7, D10 e D14 = dias após o preparo dos ED.

Na concentração celular de $1x10^5$ células/ED (Grupo 1) não houve contração do disco, ou seja, concluímos que o número de células utilizado no preparo dos equivalentes dérmicos foi muito pequeno e não foi suficiente para iniciar o processo de contração. Nos demais grupos (G2, G3 e G4) observamos que quanto maior a concentração de células utilizada, mais acelerado foi o processo de contração nos primeiros dias e ao final dos 14 dias os equivalentes dérmicos com maior quantidade de células apresentaram-se um pouco menores.

Nas micrografias da matriz tridimensional (Figura 31) podemos observar que a formação da rede de colágeno foi mais intensa nos grupos na qual utilizamos concentrações celulares maiores (G3 e G4). No G2 somente após o 5º dia após o preparo que verificamos alguma diferença na matriz, que até então apresentou-se dispersa e com aspecto arenoso. No G4 podemos visualizar a formação de uma rede mais densa logo no 2º dia, enquanto que o G3 apresentou resultados intermediários comparados aos outros dois grupos, como esperado.

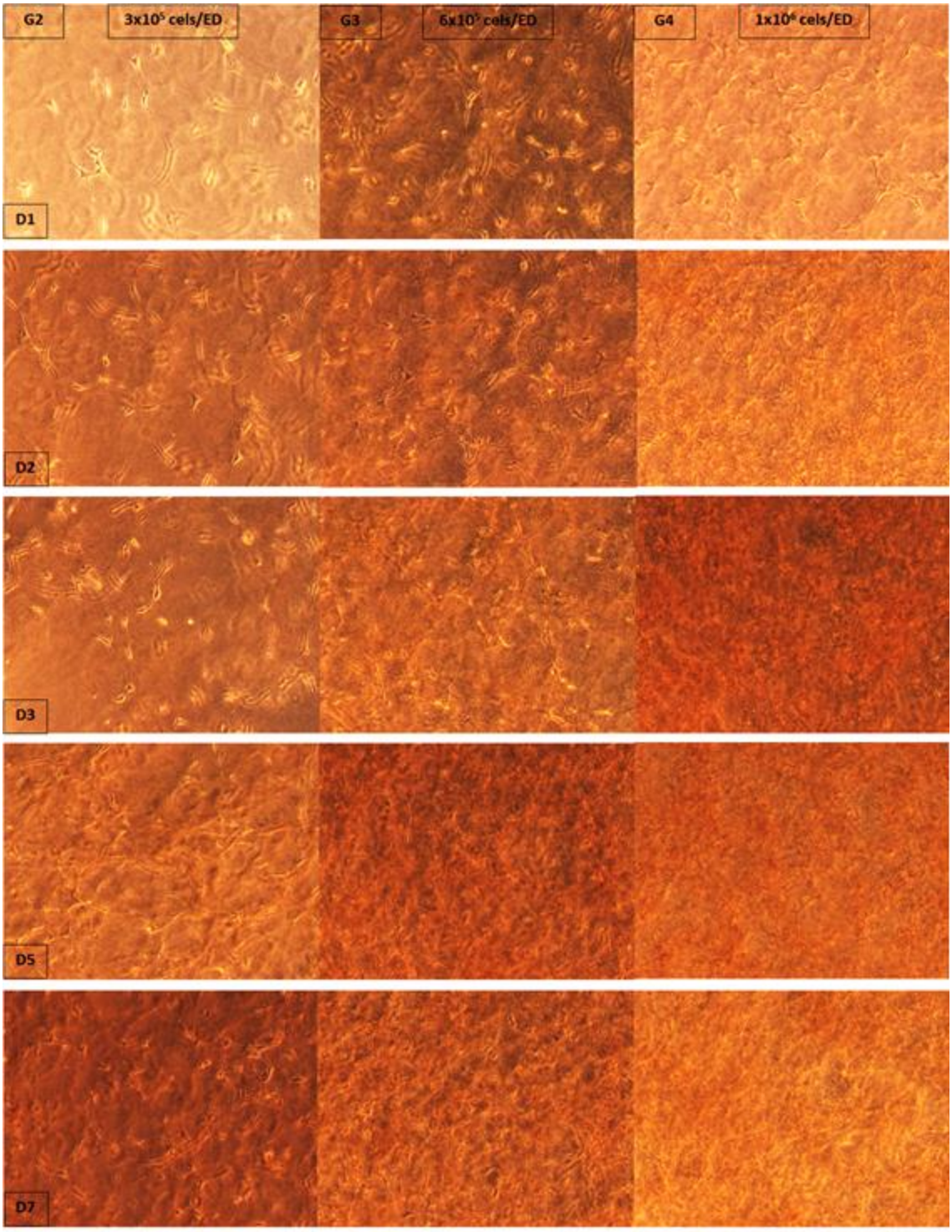

Figura 31 - Micrografias da matriz tridimensional de colágeno nos equivalentes dérmicos variando a concentração celular inicial. Linhagem celular de fibroblastos NIH/3T3. G2 = $3x10^5$ células/ED; G3 = $6x10^5$ células/ED e G4 = $1x10^6$ células/ED. D1, D2, D3, D5 e D7 = dias após o preparo dos ED. Imagens obtidas com conjunto de objetivas A-Plan 10x/0,25 Ph1, adaptado com uma câmera digital Canon 7.2 Mpixels.

No entanto, a partir do 3º dia após o preparo, os ED estabilizaram-se e contraíram muito pouco no restante do período. De acordo com resultados prévios (Item 4.7) e trabalhos anteriores realizados pelo grupo (PRIMO et al., 2012; PRIMO et al., 2011), esperava-se que

os ED mantivessem uma taxa de contração até o 14º dia e também apresentassem diâmetro mais reduzido. Por isso, decidimos avaliar outros lotes de colágeno e comparar a cinética de contração.

4.10.2- Influência do colágeno na cinética de contração dos ED

De acordo com os resultados observados no teste anterior (influência da variação da concentração celular) e com base na experiência de outros trabalhos realizados pelo grupo, resolvemos testar um lote de colágeno mais antigo, porém que estava armazenado adequadamente no laboratório e comparamos com o colágeno que foi extraído inicialmente para a realização deste projeto.

Neste experimento, utilizamos a linhagem celular de fibroblastos NIH/3T3 na concentração celular de $6x10^5$ células/ED (n=mínimo de 3 ED por grupo).

Abaixo, o gráfico contém a cinética de contração de equivalentes dérmicos preparados com o colágeno mais recente (colágeno 1) e lotes de colágeno mais antigos, denominados de colágeno 2 e 3.

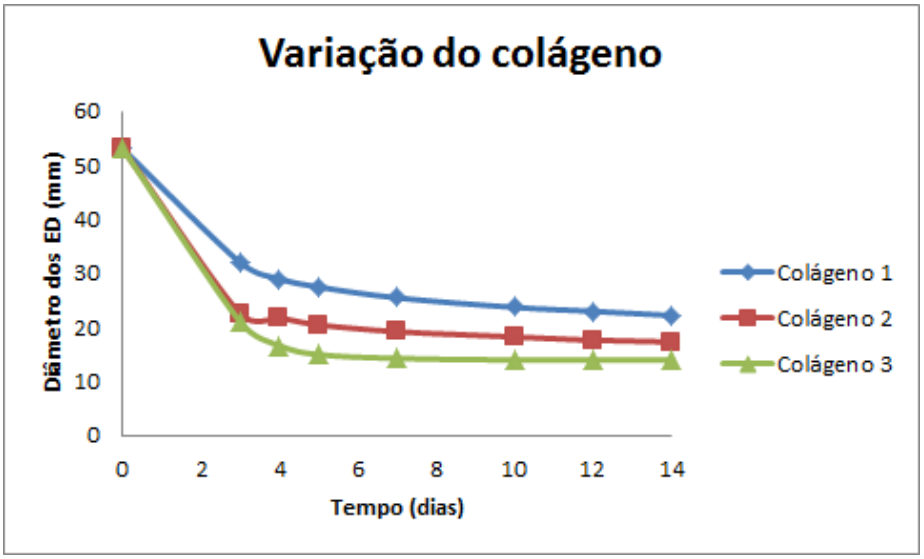

Figura 32 - Perfil de contração dos equivalentes dérmicos ao longo de 14 dias. Considerou-se como diâmetro inicial o tamanho interno de uma placa de Petri de 60 mm (53 mm). Colágeno 1 = lote recente; colágeno 2 e 3 = lotes antigos. Linhagem celular de fibroblastos NIH/3T3 ($6x10^5$ células/ED).

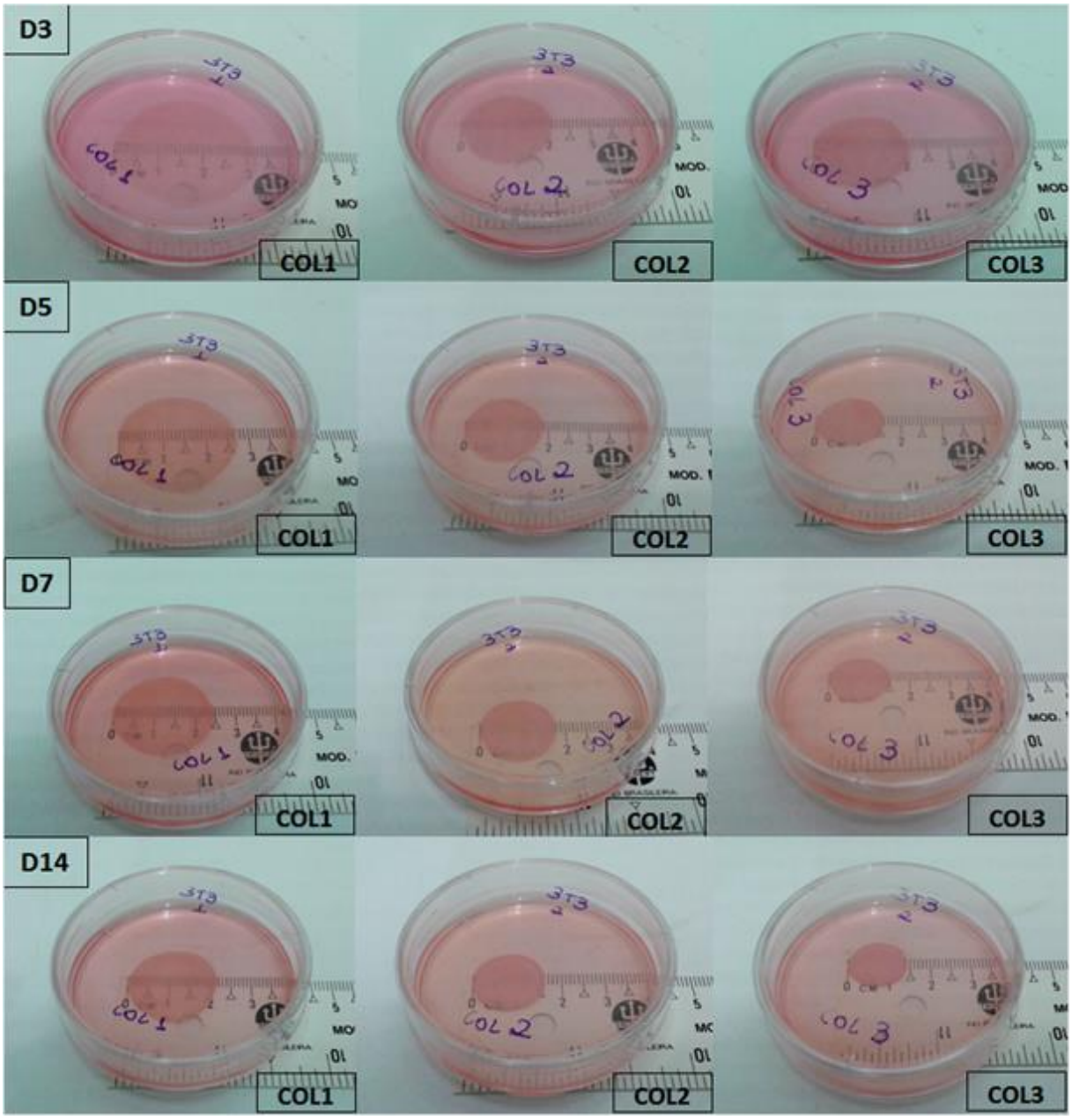

Figura 33 - Fotografias dos equivalentes dérmicos (ED) em meio DMEM 10% completo nas placas de Petri de 60 mm de diâmetro ao longo dos 14 dias de monitoramento. D3, D5, D7 e D14 = dias após o preparo. Linhagem celular de fibroblastos NIH/3T3 ($6x10^5$ células/ED). Colágeno 1 = lote recente; colágeno 2 e 3 = lotes antigos.

Utilizando-se um sistema de aquisição de imagens acoplado ao microscópio óptico, acompanhamos também a matriz tridimensional de colágeno. Na Figura 34, podemos notar a diferença na formação da rede de colágeno quando utilizamos colágenos diferentes. A rede apresentou-se mais densa nos colágenos 2 e 3, onde observamos vários pontos mais escuros na imagem evidenciando que o equivalente dérmico está mais espesso, enquanto que no colágeno 1 a matriz estava menos densa e portanto, mais frágil. De acordo com estes resultados obtidos suspeitamos de algum problema no processo de extração do colágeno tipo I ou durante o seu armazenamento.

Por isso, decidimos realizar novamente a extração do colágeno tipo I a partir de tendões de caudas de ratos, porém utilizando um novo protocolo.

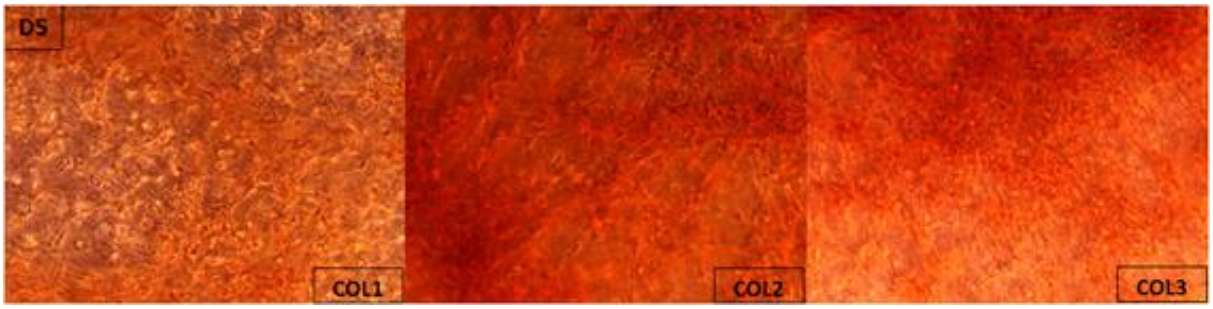

Figura 34 - Micrografias da matriz tridimensional de colágeno dos equivalentes dérmicos no 5º dia após o preparo. COL1 = lote recente; COL2 e 3 = lotes antigos. Linhagem celular de fibroblastos NIH/3T3 ($6x10^5$ células/ED). Imagens obtidas com conjunto de objetivas A-Plan 10x/0,25 Ph1, adaptado com uma câmera digital Canon 7.2 Mpixels.

4.10.3- Comportamento da linhagem celular na cinética de contração dos ED

Neste experimento decidimos analisar a cinética de contração dos equivalentes dérmicos utilizando outra linhagem celular. Para tal, escolheu-se a linhagem de células-tronco HBMS e os equivalentes dérmicos foram preparados seguindo mesmo protocolo do Item anterior, ou seja, utilizando a concentração celular de $6x10^5$ células/ED (n=mínimo de 3 ED por grupo) e os colágenos lotes 2 e 3 (lotes mais antigos). A seguir, encontram-se os resultados obtidos para a linhagem de células-tronco HBMS.

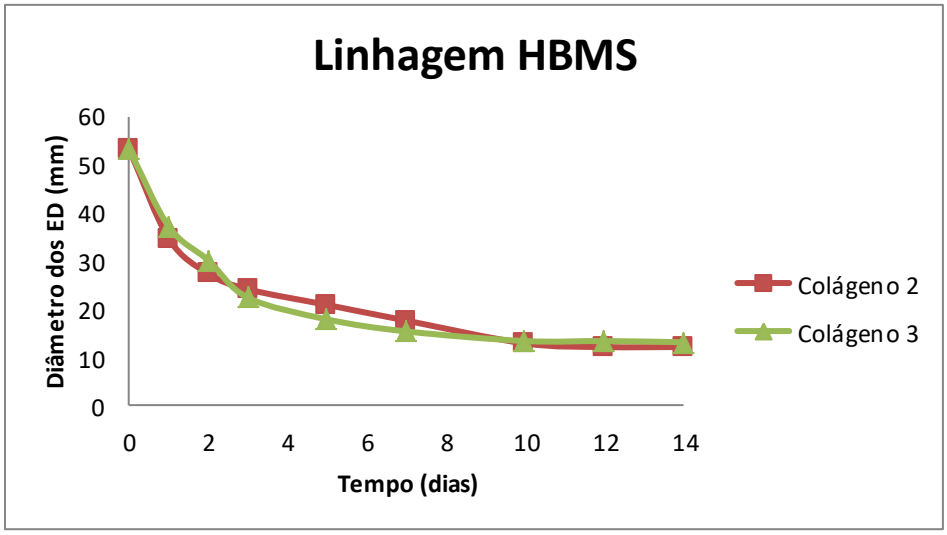

Figura 35 - Perfil de contração dos equivalentes dérmicos ao longo de 14 dias. Considerou-se como diâmetro inicial o tamanho interno de uma placa de Petri de 60 mm (53 mm). Colágeno 2 e 3 = lotes antigos. Linhagem celular de células-tronco HBMS ($6x10^5$ células/ED).

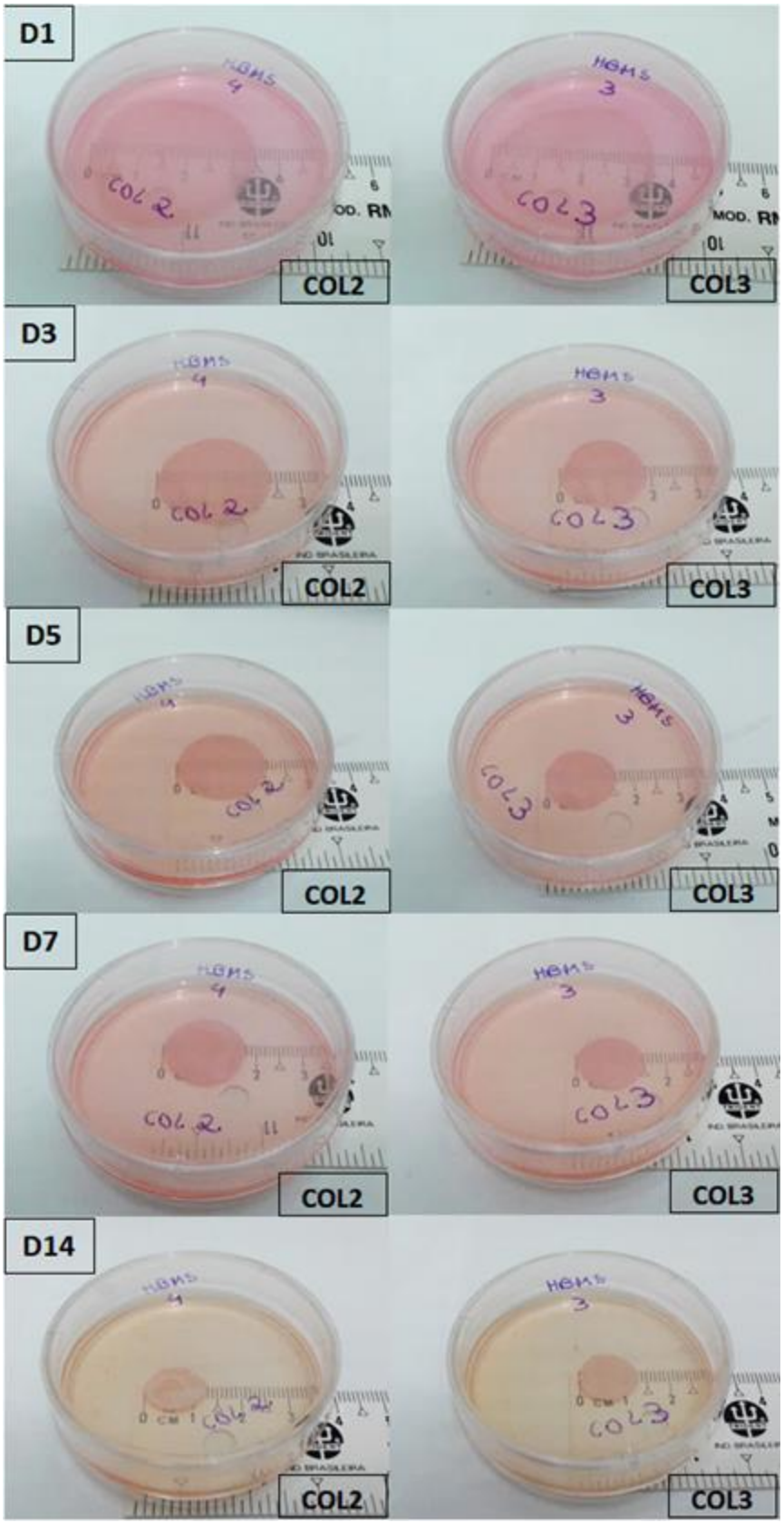

Figura 36 - Fotografias dos equivalentes dérmicos (ED) em meio DMEM 10% completo nas placas de Petri de 60 mm de diâmetro ao longo dos 14 dias de monitoramento. D1, D3, D5, D7 e D14 = dias após o preparo. Linhagem celular de células-tronco HBMS ($6x10^5$ células/ED). Colágeno 2 e 3 = lotes antigos.

Os equivalentes dérmicos preparados com os colágenos 2 e 3 apresentaram perfil de contração semelhantes neste estudo. Podemos observar um perfil de contração clássico dos equivalentes dérmicos, que era esperado segundo estudos anteriores do grupo, no qual os ED começam a contrair nos primeiros dias e mantêm a cinética até o final do período avaliado (a contração é menor nos últimos dias, mas eles não se estabilizam).

Além disso, a matriz tridimensional foi se tornando mais densa ao longo dos 14 dias (Figura 37). Nas imagens observamos que no primeiro dia após o preparo, a matriz dos colágenos 2 e 3 está bem organizada e apresentou bastante células e fibras e colágeno (densa). A partir do 3º dia, as matrizes apresentaram-se densas e espessas e percebemos pouca diferença entre elas. Concluímos que a linhagem de células-tronco HBMS apresentou resultados favoráveis, como boa cinética de contração e formação da matriz de colágeno, podendo ser utilizada também para o preparo dos equivalentes dérmicos e estudos futuros de fotobiomodulação.

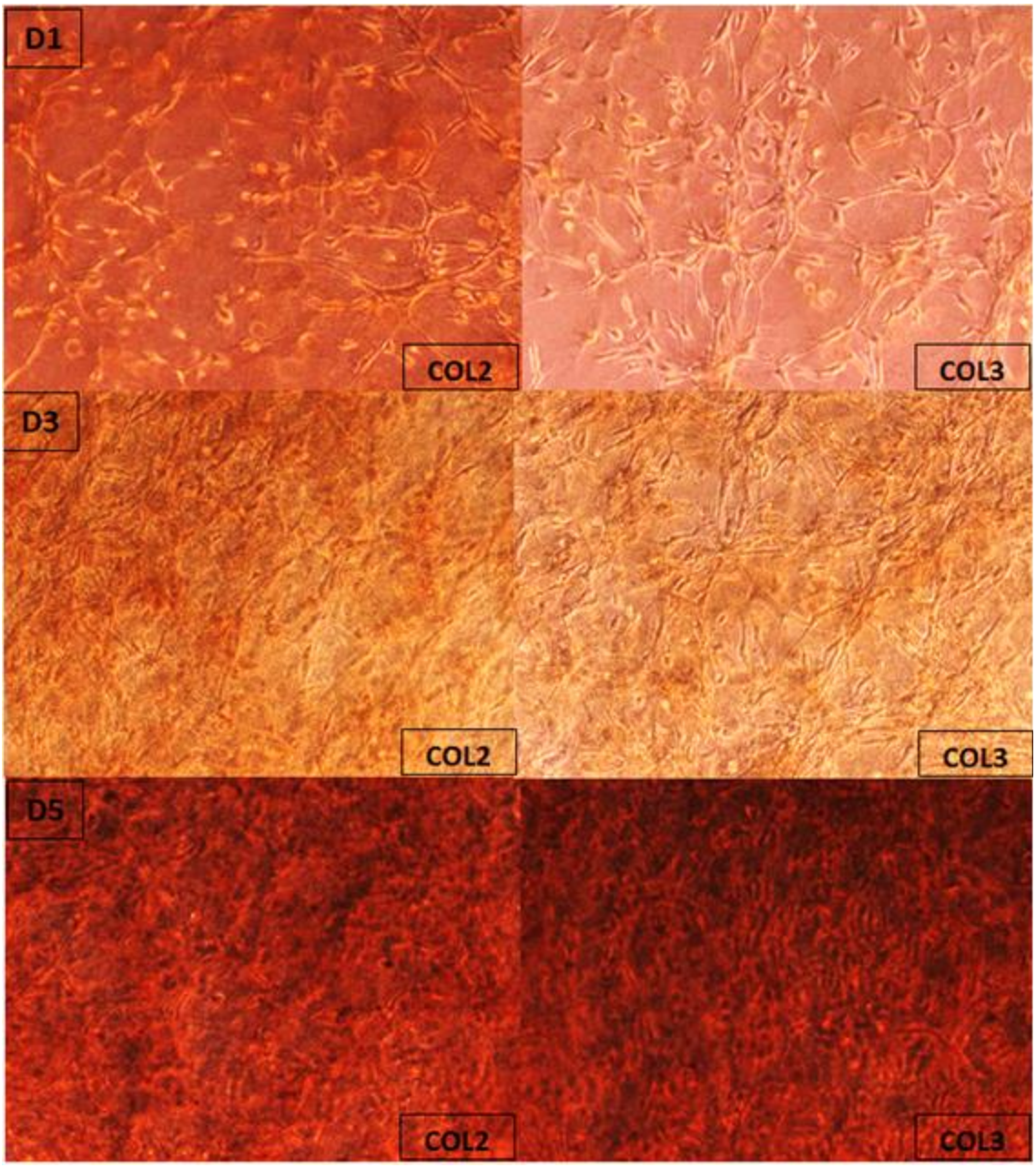

Figura 37 - Micrografias da matriz tridimensional de colágeno dos equivalentes dérmicos no 1º, 3º e 5º dias após o preparo. COL1 = lote recente; COL2 e 3 = lotes antigos. Linhagem celular de células-tronco HBMS ($6x10^5$ células/ED). Imagens obtidas com conjunto de objetivas A-Plan 10x/0,25 Ph1, adaptado com uma câmera digital Canon 7.2 Mpixels.

4.10.4- Influência da concentração de colágeno na cinética de contração dos equivalentes dérmicos

Como discutido anteriormente, outro fator que pode influenciar a cinética e a formação das matrizes de colágeno é a concentração de colágeno utilizada no preparo dos equivalentes dérmicos. Após a extração de colágeno tipo I a partir de tendões de caudas de ratos em ácido

acético 0,5% obtivemos uma solução de concentração 0,51 mg/mL, mais diluída do que a solução obtida no início do projeto e utilizada nos experimentos anteriores. Por isso, é necessário fazer um ajuste na concentração de colágeno.

Os experimentos de influência da variação da concentração celular foram refeitos para avaliar o comportamento da matriz preparada com este novo lote de colágeno. Para tal, utilizamos a linhagem de fibroblastos NIH/3T3 e as concentrações de células escolhidas foram $1x10^5$células/ED, $3x10^5$células/ED e $6x10^5$células/ED. Os resultados encontram-se a seguir:

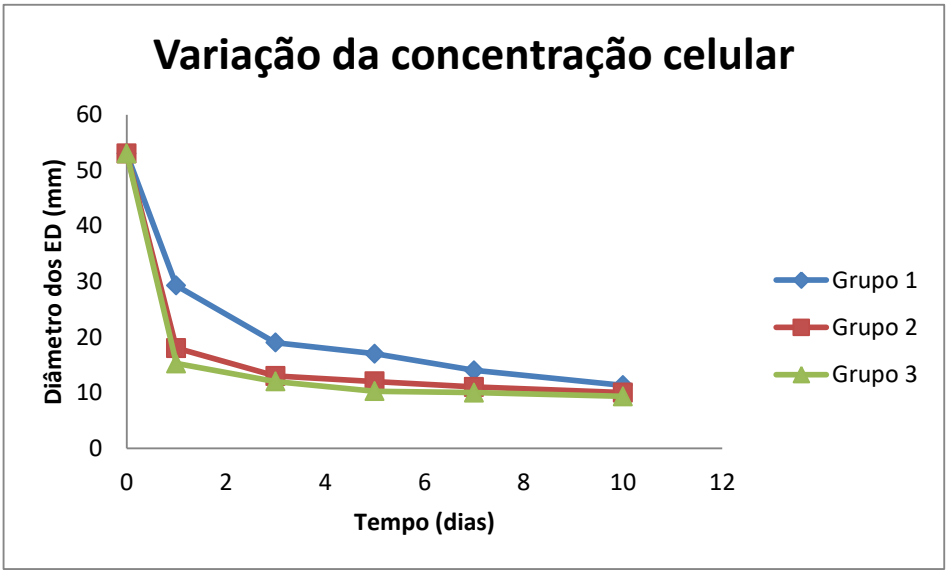

Figura 38 - Perfil de contração dos equivalentes dérmicos ao longo de 14 dias. Considerou-se como diâmetro inicial o tamanho interno de uma placa de Petri de 60 mm (53 mm). G1 = $1x10^5$ células/ED; G2 = $3x10^5$ células/ED e G3 = $6x10^5$ células/ED. Linhagem celular de fibroblastos NIH/3T3.

Observamos que os equivalentes dérmicos, principalmente no grupo 1 ($1x10^5$células/ED) apresentaram uma cinética de contração clássica, ou seja, mais acelerada nos primeiros dias após o preparo e que continua até o final do período, se estabilizando apenas nos últimos dias. Além disso, no final do período avaliado os ED apresentaram diâmetro pequeno de aproximadamente 0,9 cm para o grupo 3 e 1,1 cm para o grupo 1. Sobre a influência da concentração celular, os resultados estão de acordo com a literatura e com o teste realizado anteriormente (Item 4.10.1), ou seja, comprovamos mais uma vez que a concentração celular tem influência direta no perfil de contração da matriz: quanto maior a quantidade de células utilizada no preparo, maior é a contração inicialmente. Após 14 dias, essa influência torna-se menor e os ED tendem a adquirir o mesmo diâmetro.

Nas imagens de histologia abaixo, dos equivalentes dérmicos com $1x10^5$ células/ED e $3x10^5$ células/ED, respectivamente, podemos comparar a densidade celular na região de corte histológico horizontal das amostras sete dias após o preparo. No equivalente dérmico preparado com maior concentração inicial de células podemos observar maior número de células no corte histológico, como esperado, e os fibroblastos NIH/3T3 parecem formar uma camada externa mais espessa na amostra.

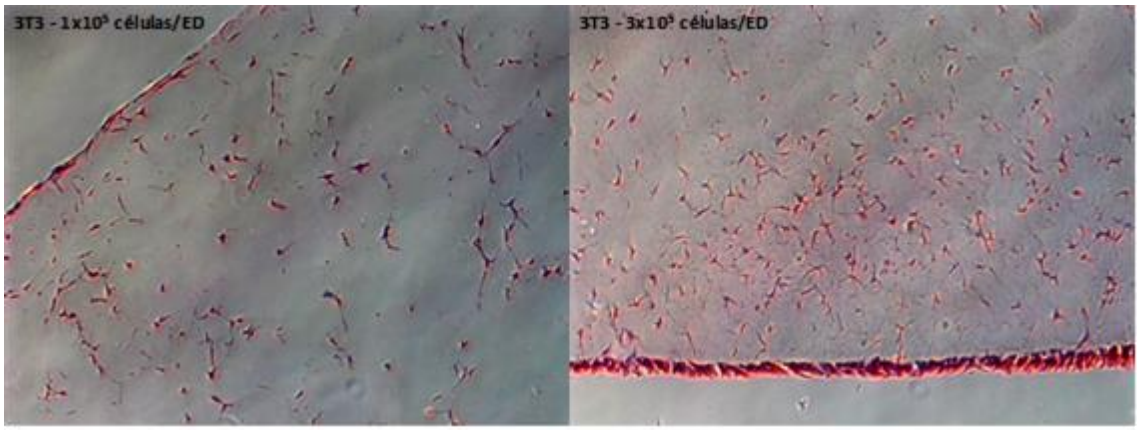

Figura 39 - Imagens de histologia dos equivalentes dérmicos preparados com $1x10^5$ células/ED e $3x10^5$ células/ED de fibroblastos NIH/3T3, sete dias após o preparo. Coloração hematoxilina-eosina (HE). Aumento de 10X.

Quando comparamos os resultados do teste anterior (Item 4.10.1) percebemos que para a mesma linhagem celular (fibroblastos NIH/3T3) os resultados obtidos de perfil de contração foram bem diferentes. Anteriormente, a concentração de $1x10^5$células/ED não gerou contração e mesmo com concentrações bem maiores ($1x10^6$células/ED), os equivalentes dérmicos não contraíram tanto e apresentaram diâmetros bem maiores no D14 (aproximadamente 2,4 cm).

Além dos problemas já discutidos a respeito da extração e conservação do colágeno, um aspecto muito importante que deve ser levado em consideração é a concentração do colágeno obtido, já que o lote novo apresentou concentração menor. Decidimos fazer um ajuste na concentração de colágeno utilizada no preparo dos ED, porém sem interferir muito no volume final das placas de Petri, então, os volumes de 1,5; 2,0 e 2,5 mL de colágeno foram escolhidos como variáveis neste experimento. O volume de colágeno foi aumentado no momento do preparo dos ED, sem alteração dos outros componentes, sendo que o 1,5 mL era o volume do protocolo inicial.

Inicialmente testamos a influência da concentração de colágeno em equivalentes dérmicos preparados com $1x10^5$células/ED e depois com concentrações celulares maiores ($2x10^5$células/ED e $3x10^5$células/ED). Os gráficos abaixo mostram os resultados comparativos da variação da concentração de colágeno, segundo a concentração celular.

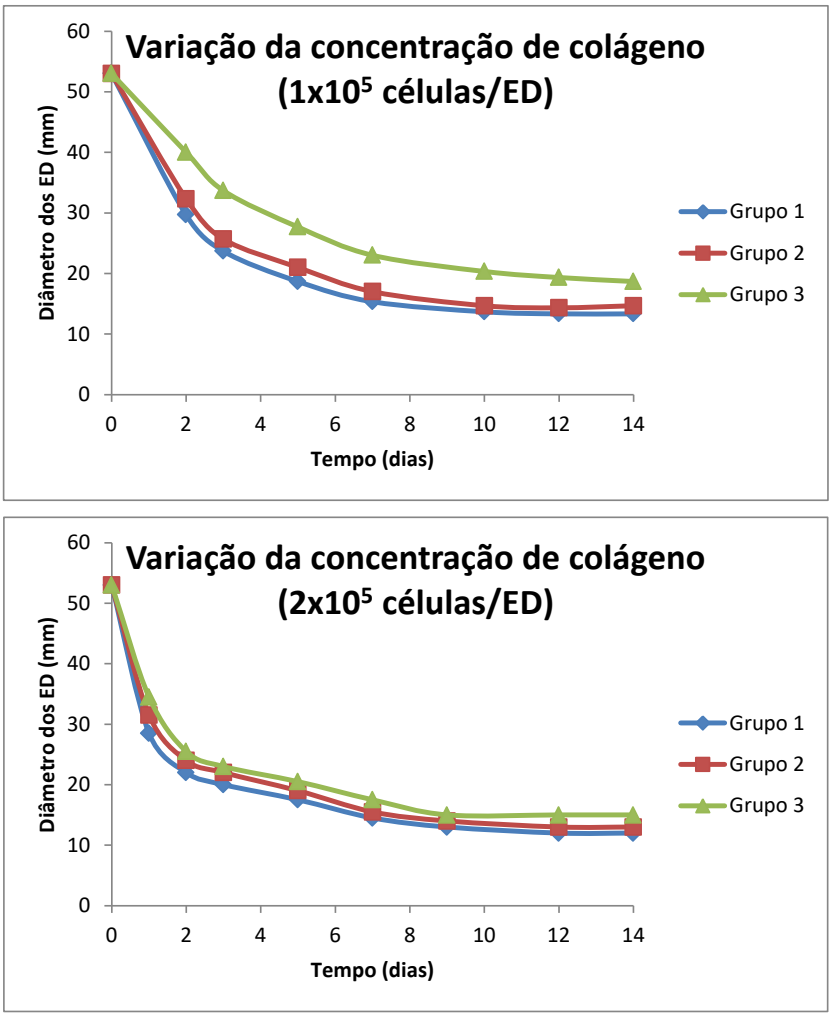

Figura 40 - Perfil de contração dos equivalentes dérmicos ao longo de 14 dias de acordo com a concentração de colágeno. Considerou-se como diâmetro inicial o tamanho interno de uma placa de Petri de 60 mm (53 mm). G1 = 1,5 mL de colágeno; G2 = 2,0 mL de colágeno e G3 = 2,5 mL de colágeno. Linhagem celular de fibroblastos NIH/3T3. Acima, $1x10^5$ células/ED e abaixo, $2x10^5$ células/ED.

A concentração de colágeno parece ter influência maior quando a concentração de células é menor. Quando a concentração celular é maior que $2x10^5$células/ED, a quantidade de células parece determinar mais a cinética de contração da matriz do que o próprio colágeno. Observamos nas cinéticas de contração abaixo (Figura 40) que na concentração celular menor ($1x10^5$células/ED) o efeito da concentração de colágeno é mais evidente, enquanto que para a concentração de $2x10^5$células/ED, os perfis de cinética foram parecidos.

Concluímos que a influência da concentração de colágeno é inversamente proporcional à cinética de contração dos equivalentes dérmicos, ou seja, quanto menor a quantidade de colágeno, maior a contração, e este efeito tende a ser mais acentuado em concentrações celulares menores.

A análise da rede tridimensional através das micrografias em campo claro (Figura 41) permitiu visualizar que quando utilizamos maior volume de colágeno (2,5mL), a matriz apresentou-se mais espalhada e com aspecto frágil. Essa diferença foi bem evidente no 5º dia após o preparo, pois nos grupos 1 e 2 visualizamos uma rede mais densa com regiões mais espessas (pontos mais escuros), ao contrário do grupo 3, que apresentou uma rede menos densa. No décimo dia, os grupos 1 e 2 apresentaram matriz bem semelhante, enquanto que no G3 a organização da matriz foi comprometida pela concentração de colágeno.

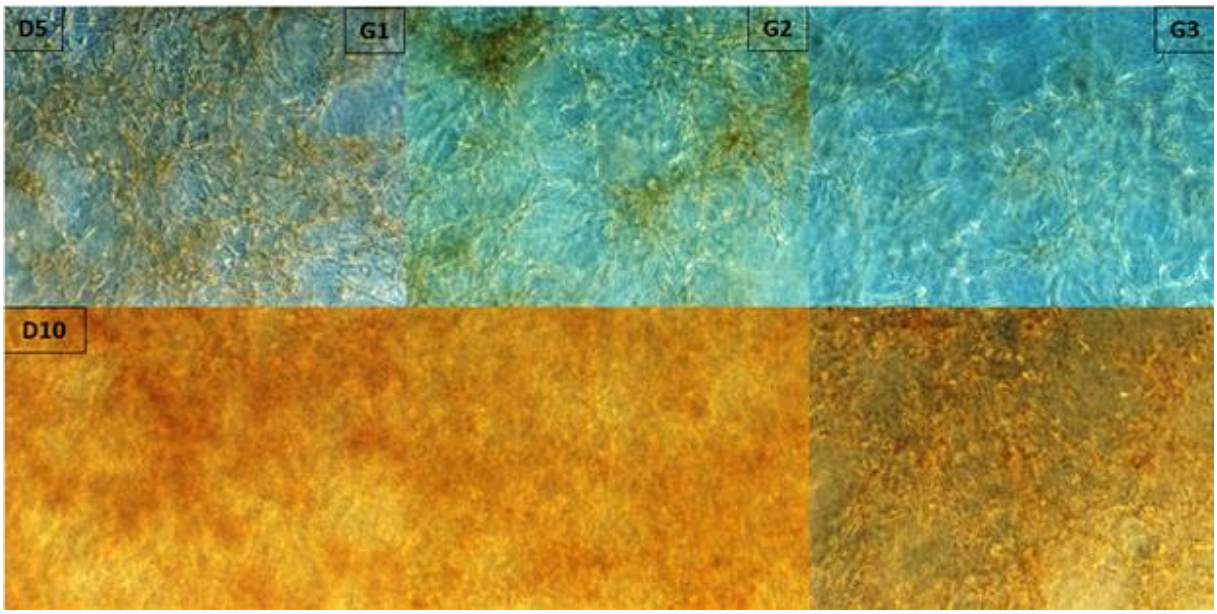

Figura 41 – Micrografias da matriz tridimensional de colágeno dos equivalentes dérmicos no 5º e 10º dias após o preparo. G1 = 1,5 mL de colágeno; G2 = 2,0 mL de colágeno e G3 = 2,5 mL de colágeno. Linhagem celular de fibroblastos NIH/3T3 $1x10^5$ células/ED. Imagens obtidas com conjunto de objetivas A-Plan 10x/0,25 Ph1, adaptado com uma câmera digital Canon 7.2 Mpixels.

Realizou-se também a análise histológica dos equivalentes dérmicos deste experimento e as imagens obtidas para a concentração celular de $2x10^5$ células/ED podem ser visualizadas abaixo. Nos cortes horizontais não foi possível observar diferença na matriz de colágeno entre os grupos com variação na concentração de colágeno. Porém, se analisarmos os cortes verticais, no grupo 1 (menor concentração de colágeno) a matriz parece não estar muito bem corada, sugerindo a existência de fibras mais finas formando esta matriz. Enquanto que se observarmos o grupo 3, percebemos a existência de fibras maiores e mais alongadas e

uma distribuição heterogênea, com várias lacunas entre as fibras. Esta formação e distribuição das fibras de colágeno pode justificar a impressão de rede menos densa (porosa) e mais frágil que temos quando visualizamos os equivalentes dérmicos a olho nu ou através das micrografias de campo claro (Figura 41).

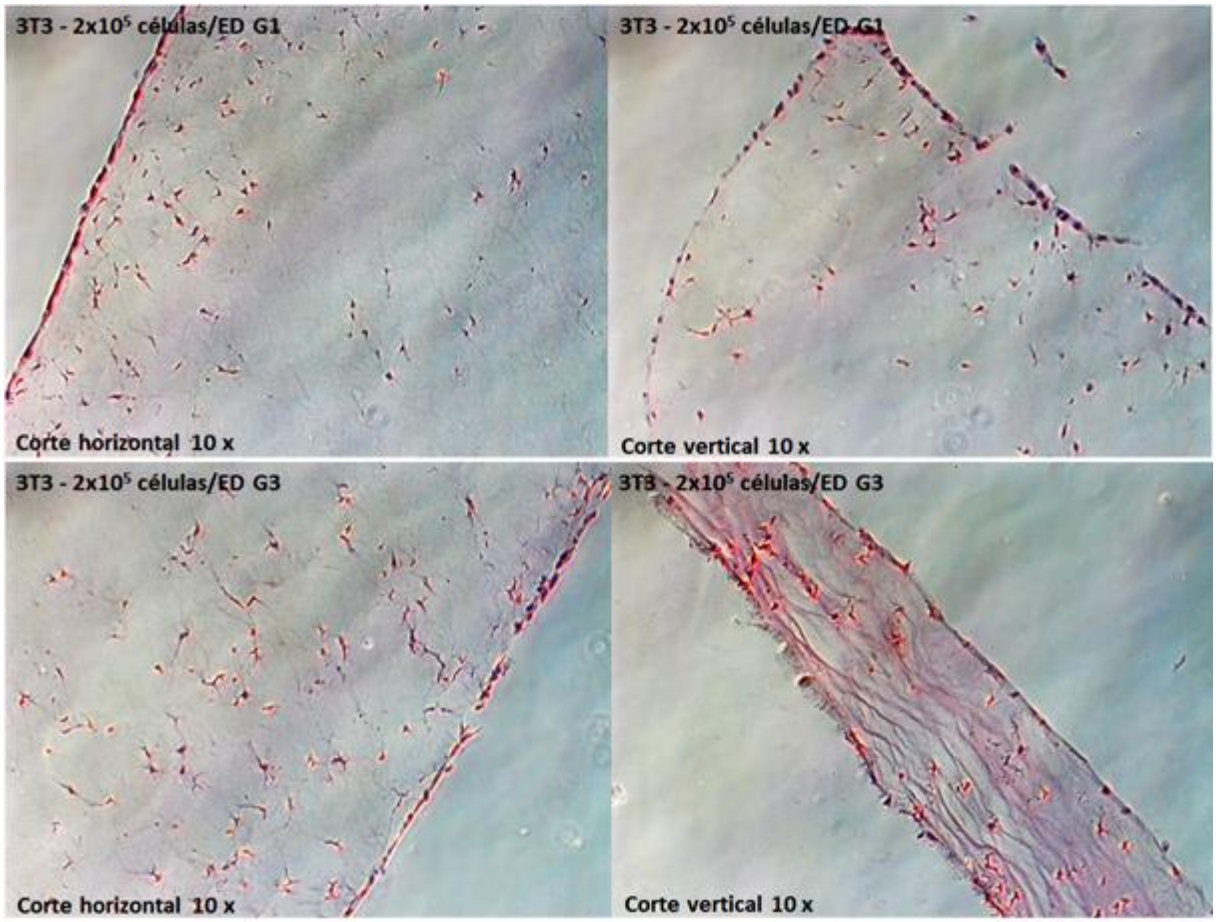

Figura 42 - Imagens de histologia dos equivalentes dérmicos com variação da concentração de colágeno, sete dias após o preparo. Linhagem de fibroblastos NIH/3T3 ($2x10^5$ células/ED). Coloração hematoxilina-eosina (HE). Aumento de 10X.

Segundo dados da literatura, a taxa de contração das matrizes de hidrogel pode ser controlada e depende dos mecanismos e força de ligação entre as fibras, número de sítios de ligações das proteínas de adesão e concentração do polímero (AHEARNE, 2014). Esta informação está de acordo com os resultados obtidos, na qual observamos que a cinética de contração dos equivalentes dérmicos depende principalmente do número de células (mais sítios de ligações das proteínas de adesão) e concentração do colágeno. Ou seja, a utilização de mais células na matriz extracelular proporcionaria a existência de mais sítios de ligação nas fibras de colágeno, gerando uma contração mais acelerada. Ao contrário a presença de mais fibras de colágeno (maior concentração do polímero), atrapalharia o processo.

4.11- Estudos aplicados de fotobiomodulação nos equivalentes dérmicos

4.11.1- Tratamento dos ED com nanoemulsão de ClAlPc 10 µmol/L e luz de baixa intensidade.

Após a padronização do preparo dos equivalentes dérmicos, iniciamos os estudos de avaliação dos efeitos dos fotoprocessos no modelo celular tridimensional. Este estudo caracterizou-se pela aplicação da formulação contendo ClAlPc e luz de baixa intensidade em doses variadas.

Foram preparados um total de 18 equivalentes dérmicos e estes foram divididos em 6 grupos: Controle (CT), que não recebeu tratamento algum; Controle Escuro (CTE), que foi tratado apenas com a formulação (10 µmol/L ClAlPc/NE); Controle luz (CTL), irradiado com a dose de energia mais alta (70 mJ/cm^2) e por último, grupos de tratamento com a formulação + luz de baixa intensidade (20 mJ/cm^2, 40 mJ/cm^2 e 70 mJ/cm^2).

A cinética de contração de cada disco foi acompanhada durante 14 dias após o tratamento e está ilustrada nos gráficos de barras abaixo (Figura 43).

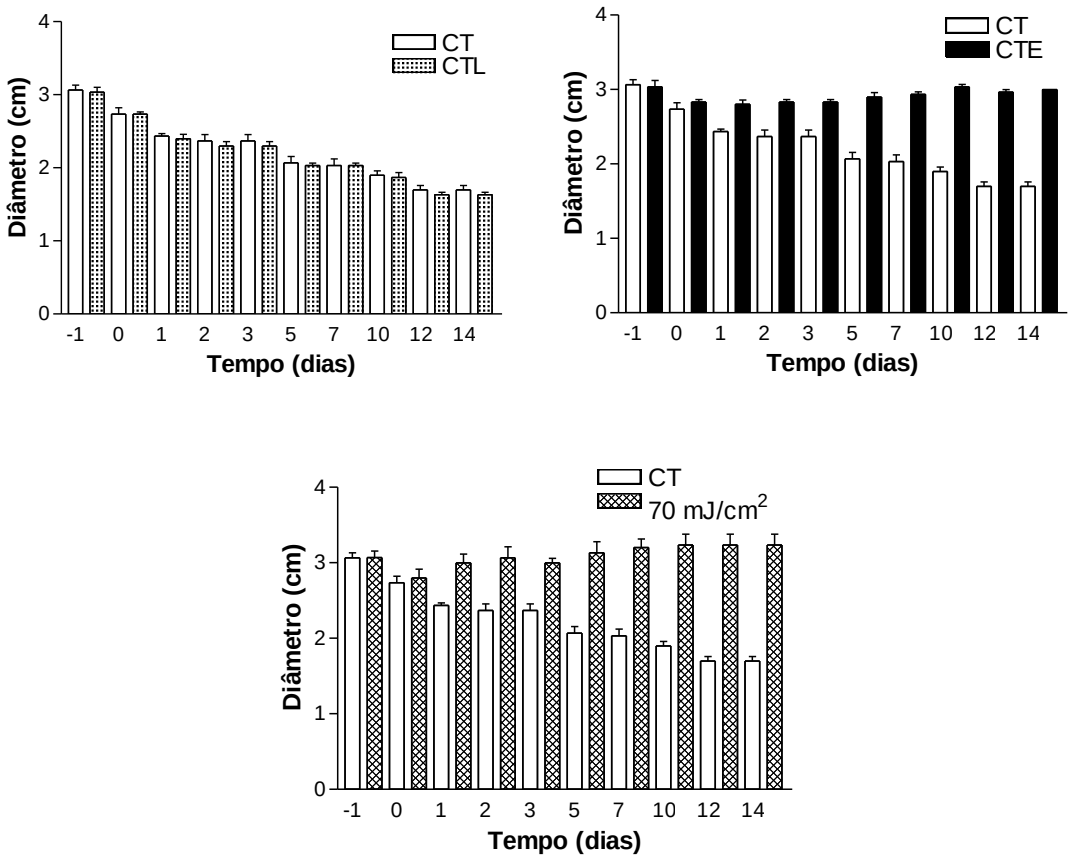

Figura 43 - Diâmetro dos equivalentes dérmicos. D-1 = Dia de incubação com ClAlPc/NE; D0 = Dia de aplicação da luz de baixa intensidade nas diferentes doses (20, 40 e 70 mJ/cm^2). D1; D2; D3; D5; D7; D10; D12; D14 = dias após irradiação. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste de variância One-Way ANOVA seguido do pós-teste Tukey t-test para múltiplas comparações ($p<0,05$).

A matriz extracelular também foi monitorada através de micrografias no 1º, 3º, 5º e 7º dias após a irradiação.

Observou-se que o grupo Controle Luz (CTL) apresentou comportamento muito semelhante ao grupo Controle (CT), como já era esperado. Em ambos os grupos, os discos contraíram normalmente e formaram a rede tridimensional logo no primeiro dia, tornando-se mais densa ao longo do tempo, como podemos verificar na Figura 44.

Nos grupos tratados com a formulação (10 µmol/L ClAlPc/NE), podemos observar uma diferenciação na organização da matriz extracelular de colágeno logo no primeiro dia após a irradiação, sendo mais evidente no grupo tratado com a maior dose de energia (70 mJ/cm^2) (Figura 46), caracterizado por uma redução da rede e do número do pontos de mitose. Além disso, como podemos observar nos gráficos da Figura 43, os equivalentes dérmicos apresentaram tamanhos bem maiores comparados ao grupo Controle (CT), notando-se uma tendência de aumento no diâmetro, o que está de acordo com os dados observados na

Figura 46, pois com a redução da formação da rede, e dos pontos de mitoses, temos uma interrupção no processo de contração.

No grupo Controle Escuro (CTE), no qual foi aplicada somente a formulação (sem irradiação), o comportamento foi semelhante aos grupos tratados com luz (Figura 45). Este efeito observado difere do esperado inicialmente, sugerindo um efeito da concentração de ativo no processo de formação da rede de colágeno. Embora a concentração utilizada nestes estudos não tenha apresentado citotoxicidade nos testes realizados em monocamada (Item 4.3), acreditamos que no modelo 3D, a mesma esteja interferindo, na formação do sistema. Portanto, foi necessário um ajuste na sua concentração, como será descrito nos próximos experimentos.

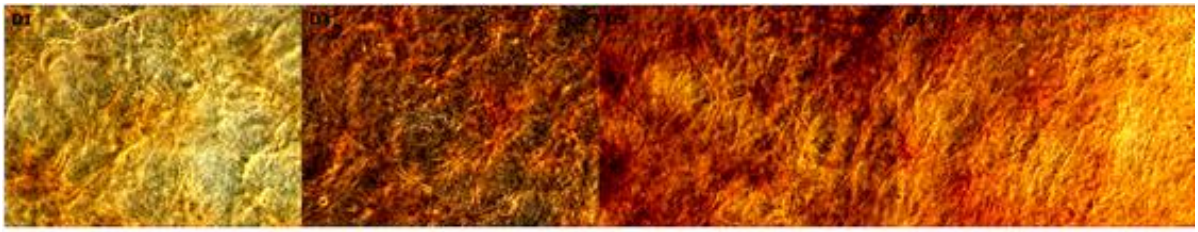

Figura 44 - Micrografias dos equivalentes dérmicos mostrando a matriz tridimensional de colágeno. Grupo CONTROLE = meio DMEM 10 % completo. D1; D3; D5 e D7 = dias após irradiação.

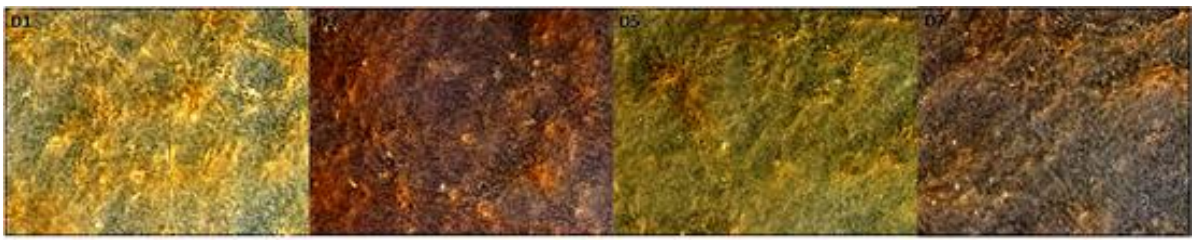

Figura 45 - Micrografias dos equivalentes dérmicos mostrando a matriz tridimensional de colágeno. Grupo CONTROLE ESCURO = somente incubação com ClAlPc/NE por 30 minutos. D1; D3; D5 e D7 = dias após irradiação.

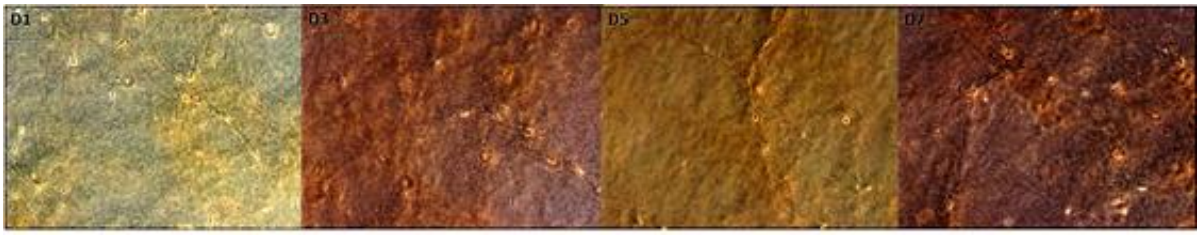

Figura 46 - Micrografias dos equivalentes dérmicos mostrando a matriz tridimensional de colágeno. Grupo 70 mJ/cm^2 = incubação com ClAlPc/NE por 30 minutos e aplicação da dose de energia 70 mJ/cm^2 após 24 horas. D1; D3; D5 e D7 = dias após irradiação.

4.11.2- Comportamento dos equivalentes dérmicos na presença de ClAlPc sem irradiação

Após os estudos de fotobiomodulação nos equivalentes dérmicos utilizando a formulação nanoemulsão de ClAlPc na concentração de 10 µmol/L, observamos um efeito negativo da formulação no Grupo Controle Escuro (tratado somente com a formulação, sem irradiação) e por isso, decidiu-se diminuir a concentração de tratamento para 3 µmol/L. Além disso, para eliminar qualquer dúvida de toxicidade no modelo tridimensional, avaliou-se o comportamento dos equivalentes dérmicos na presença do fármaco fotossensibilizante sozinho (ClAlPc livre dissolvida em DMSO 0,2%), da nanoemulsão vazia (sem o fármaco fotossensibilizante) e do fármaco veiculado no sistema nanoestruturado (nanoemulsão de ClAlPc 3 µmol/L).

Os ED dérmicos foram preparados com a linhagem de fibroblastos NIH/3T3 na concentração celular de $2x10^5$ células/ED e 2mL de colágeno para formação da matriz tridimensional (dados otimizados em experimentos anteriores). No quarto dia após o preparo, os tratamentos foram adicionados ao meio de cultura presente nas placas de Petri com os equivalentes dérmicos. Não houve troca de meio imediatamente após o tratamento, para que os modelos celulares ficassem em contato com o fármaco por mais tempo. A troca de meio foi realizada somente no D6 após o preparo e repetida a cada três dias até o final do período avaliado.

A seguir, nas imagens podemos visualizar a contração dos equivalentes dérmicos ao longo de duas semanas. O acompanhamento da contração foi realizado somente a partir do D3, dia na qual os ED apresentaram diâmetro entre 2,0 e 2,3 cm. Ao final dos 14 dias, todos os grupos apresentaram-se com diâmetro aproximado de 1,4 ± 0,1 cm.

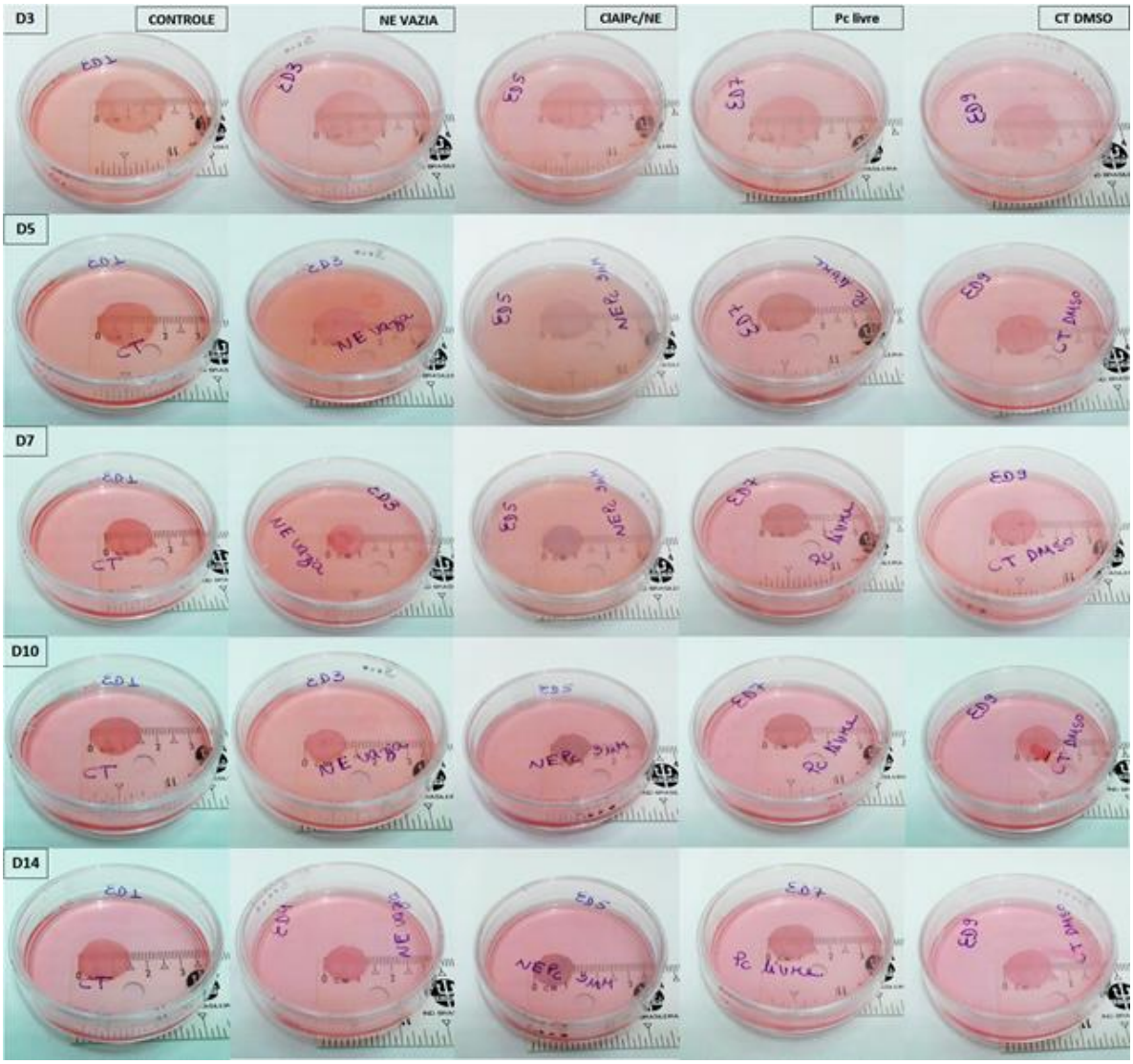

Figura 47 - Fotografias dos equivalentes dérmicos (ED) em meio DMEM 10% completo nas placas de Petri de 60 mm de diâmetro ao longo dos 14 dias de monitoramento. Linhagem celular de fibroblastos NIH/3T3 ($3x10^5$ células/ED). CT = controle (sem tratamento); NE VAZIA = nanoemulsão sem ClAlPc; ClAlPc/NE = nanoemulsão com ClAlPc na concentração 3µmol/L; Pc livre = ClAlPc dissolvida em DMSO; CT DMSO = somente DMSO 0,2% (v/v). O tratamento foi realizado do D4 após preparo dos ED. D3, D5, D7, D10 e D14 = dias após o preparo.

Comparando-se a cinética de contração (Figura 48) do grupo controle (sem tratamento, somente meio DMEM 10%) com os outros grupos, observou-se que mesmo após a adição dos respectivos tratamentos os ED continuaram a contrair e as cinéticas de contração obtidas foram bastante semelhantes com curvas praticamente sobrepostas.

A análise da rede tridimensional através de micrografias em campo claro (dados não mostrados) também não revelou nenhuma alteração significativa da matriz. Portanto, nenhum efeito negativo na formação e contração da matriz de colágeno foi evidenciado, segundo estes parâmetros avaliados. Por isso, os próximos experimentos de fotobiomodulação foram conduzidos utilizando a nanoemulsão de ClAlPc na concentração de 3 µmol/L.

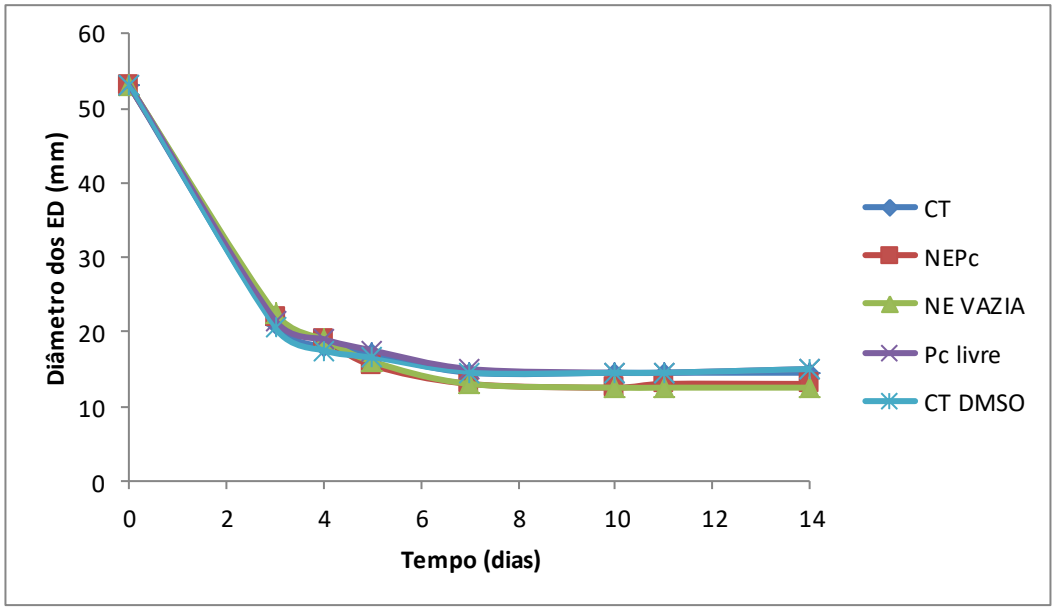

Figura 48 - Perfil de contração dos equivalentes dérmicos ao longo de 14 dias. Considerou-se como diâmetro inicial o tamanho interno de uma placa de Petri de 60 mm (53 mm). Linhagem celular de fibroblastos NIH/3T3 ($3x10^5$ células/ED). CT = controle (sem tratamento); NE VAZIA = nanoemulsão sem ClAlPc; NEPc = nanoemulsão com ClAlPc na concentração 3µmol/L; Pc livre = ClAlPc dissolvida em DMSO; CT DMSO = somente DMSO 0,2% (v/v). O tratamento foi realizado do D4 após preparo dos ED.

4.11.3- Tratamento dos ED com nanoemulsão de ClAlPc 3µmol/L e luz de baixa intensidade

Este estudo caracterizou-se pela aplicação da formulação contendo ClAlPc e luz de baixa intensidade em 3 doses variadas (baixa, média e alta). Foram preparados um total de 42 equivalentes dérmicos e estes foram divididos em sete grupos: Controle (CT), que não recebeu tratamento algum; Controle luz (CTL), tratado somente com luz de baixa intensidade na dose mais alta (300 mJ/cm^2); Controle Escuro (CTE), que foi tratado apenas com a formulação (3µmol/L ClAlPc/NE); Controle de ftalocianina livre (ClAlPc dissolvida em DMSO) e por último, grupos de tratamento com a formulação 3µmol/L + luz de baixa intensidade em três doses de energia (70 mJ/cm^2, 140 mJ/cm^2 e 300 mJ/cm^2).

Os equivalentes dérmicos foram preparados com a linhagem de fibroblastos NIH/3T3 na concentração celular de $2x10^5$ células/ED e 2,0 mL de colágeno. A incubação com o fármaco fotossensibilizante foi realizada no 4º dia após o preparo dos equivalentes dérmicos, sendo que o tratamento não foi retirado (não houve troca de meio). A aplicação da luz de baixa intensidade nas diferentes doses aconteceu 24 horas após aplicação da ClAlPc/NE, ou

seja, no 5º dia. A cinética de contração de cada disco foi acompanhada durante 21 dias após o preparo e está ilustrada nos gráficos de barras abaixo (Figura 49).

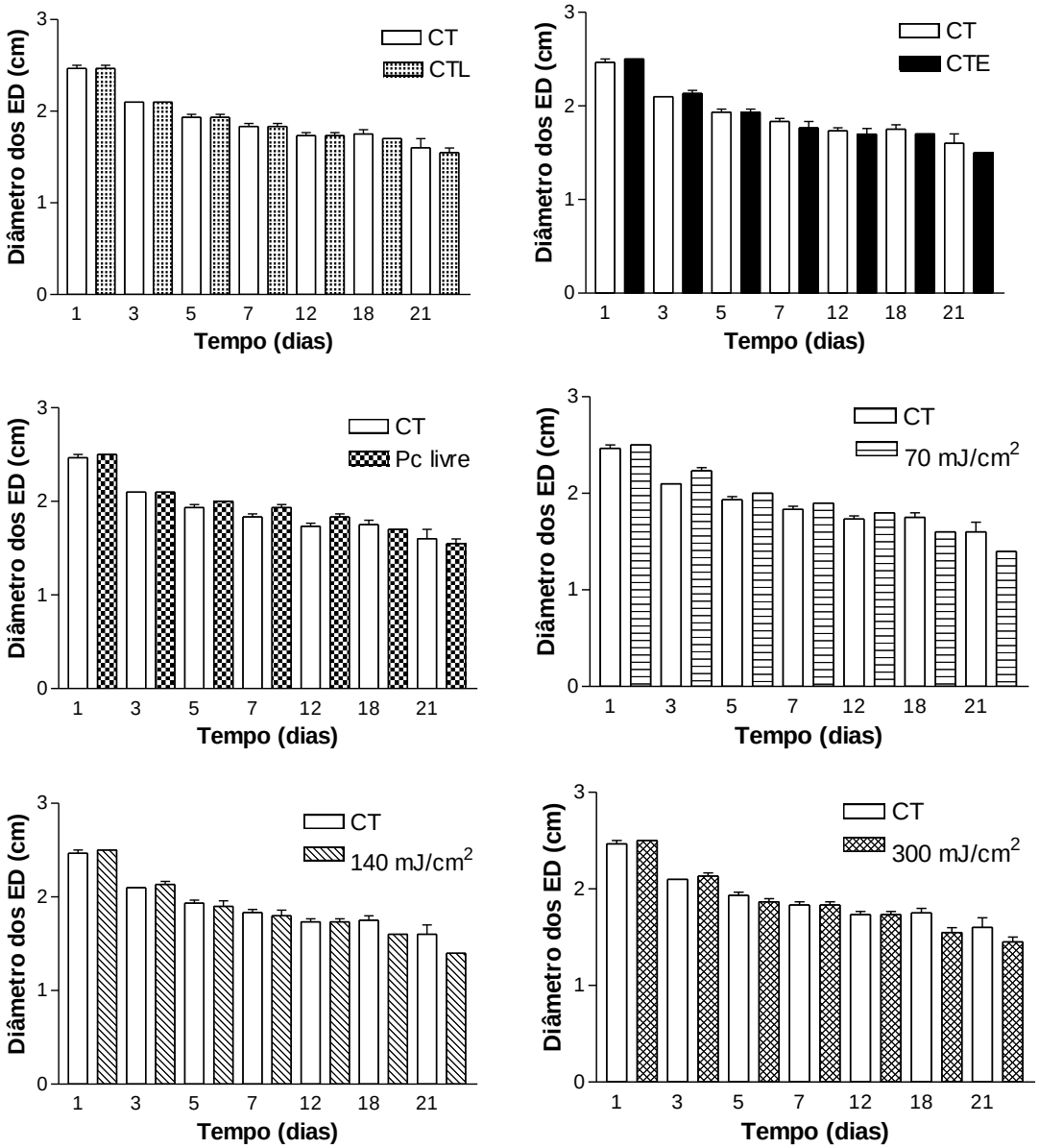

Figura 49 - Diâmetro dos equivalentes dérmicos. D1; D3; D5; D7; D12; D18; D21 = dias após o preparo dos equivalentes dérmicos. D4 = Dia de incubação com ClAlPc/NE 3µmol/L; D5 = Dia de aplicação da luz de baixa intensidade nas diferentes doses (70, 140 e 300 mJ/cm^2). Linhagem celular de fibroblastos NIH/3T3 (2x10^5 células/ED).

No primeiro dia após o preparo, os equivalentes dérmicos apresentaram diâmetros de aproximadamente 2,5 cm, sendo que a contração maior foi observada nos primeiros dias (até o 3º dia) e também no final do período avaliado (18º).

Sendo assim, a cinética de contração pode ser descrita em duas fases, uma mais acentuada no início e uma contração mais tardia no final. No período intermediário, os equivalentes parecem ter se "estabilizado" e a contração foi pequena, evento que podemos explicar como efeito de uma possível reorganização da matriz celular e restabelecimento da homeostase do sistema. No final do período, observamos que todos os equivalentes, inclusive os tratados com ClAlPc/NE 3µmol/L e luz, apresentaram diâmetros de mais ou menos 1,5 cm e aspecto semelhantes no que diz respeito à formação da rede e matriz de colágeno.

No 5º dia (24 horas após irradiação), os equivalentes dérmicos foram analisados através da microscopia confocal. Como já havíamos discutido no Item 4.4, a ftalocianina quando internalizada nas células apresenta uma distribuição citoplasmática, e isto nos permitiu a visualização do arcabouço celular. Para tal, realizou-se a excitação da ftalocianina no comprimento de onda 610-675 nm e as imagens obtidas estão nas imagens abaixo. A distribuição celular nos equivalentes dérmicos pareceu ser homogênea em todas as áreas fotografadas, assim como a morfologia observada é característica de fibroblastos NIH/3T3.

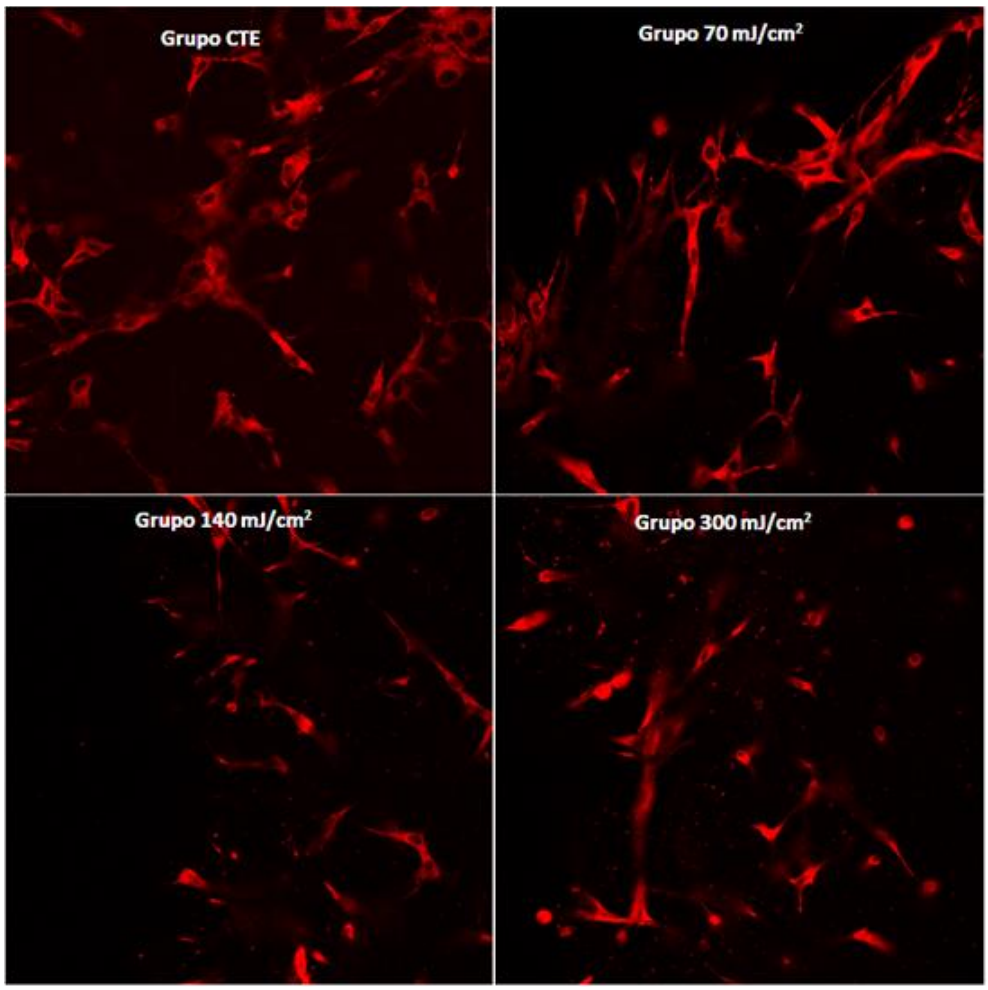

Figura 50 – Microscopia confocal dos equivalentes dérmicos 24 horas após irradiação (D6 após o preparo). Linhagem celular de fibroblastos NIH/3T3 ($2x10^5$ células/ED). Grupo controle no escuro (CTE) = 3µmol/L ClAlPc/NE. Excitação da ClAlPc em 610-675 nm (vermelho).

Apenas com estes dados, não é possível dizermos se ocorreu um processo de proliferação celular, para isto, seria necessária a utilização de outros marcadores celulares como Ki-67 (proliferação celular) ou simplesmente uma marcação de núcleo celular ou citoesqueleto (DAPI e faloidina, respectivamente) para analisarmos a quantidade real de células. Tentamos realizar a marcação do citoplasma celular dos equivalentes dérmicos com faloidina, porém o marcador não internalizou e não foi possível a sua visualização no microscópio confocal. Também tentamos realizar cortes congelados das amostras, utilizando o produto Tissue-Tek, para então posteriormente fazermos uma marcação específica, mas como a matriz de colágeno é um sistema frágil, as amostras foram danificadas durante o processo.

4.11.4- Zimografia: Avaliação da expressão das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9

A zimografia em gel é considerada um método simples, sensível, quantitativo e funcional para a detecção de formas ativas e latentes de MMPs em amostras biológicas (KUPAI et al., 2010; SNOEK-VAN BEURDEN e VON DEN HOFF, 2005). A técnica baseia-se na eletroforese em gel desnaturante de dodecil sulfato de sódio (SDS) copolimerizado com poliacrilamida e um substrato específico para a enzima em análise. A utilização da gelatina como substrato permite a análise da atividade das metaloproteinases MMPs-2 e 9, que são conhecidas como gelatinases.

Durante a eletrofofese ocorre a desnaturação e inativação das MMPs pelo SDS. A aplicação de uma corrente elétrica possibilita a migração das MMPs no gel e sua separação ocorre pela diferença de peso molecular. Após o término da corrida, as enzimas são parcialmente renaturadas, pela remoção do SDS, através da lavagem do gel com um detergente não iônico (Triton X-100). Em seguida, o gel é incubado por 24 horas a 37°C em um tampão de ativação apropriado, contendo Ca^{2+}, pois as MMPs são enzimas dependentes de Ca^{2+}. Nesta etapa, ocorre a digestão do substrato copolimerizado no gel pelas MMPs, neste caso, a gelatina. Após a incubação, o gel é corado com uma solução de azul brilhante de Coomassie e o resultado final é a visualização de bandas claras em contraste com o fundo azul do gel (KUPAI et al., 2010; PRESCIMONE et al., 2014; SNOEK-VAN BEURDEN e VON DEN HOFF, 2005; VANDOOREN et al., 2013).

Durante o experimento de fotobiomodulação os meios de cultura dos equivalentes dérmicos foram coletados em dias específicos (D8 e D13) para análise das

metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 através da zimografia em gel. Abaixo, encontram-se os respectivos géis obtidos (Figuras 51 e 52), na qual podemos observar as bandas referentes às MMP-2 e MMP-9.

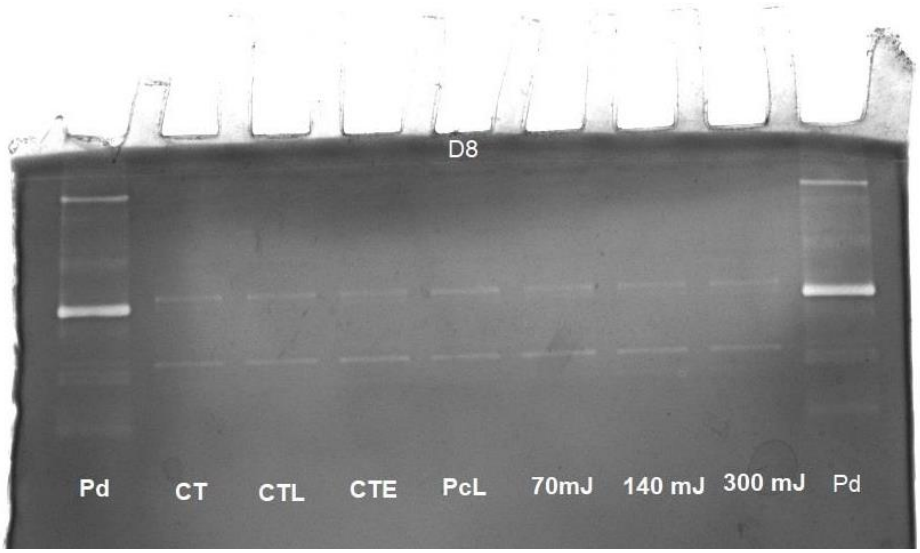

Figura 51 – Gel de zimografia das amostras de meio de cultura da linhagem de fibroblastos NIH/3T3, coletados no D8. O fibrosarcoma HT-1080 foi utilizado como padrão para determinação das bandas de referencia.

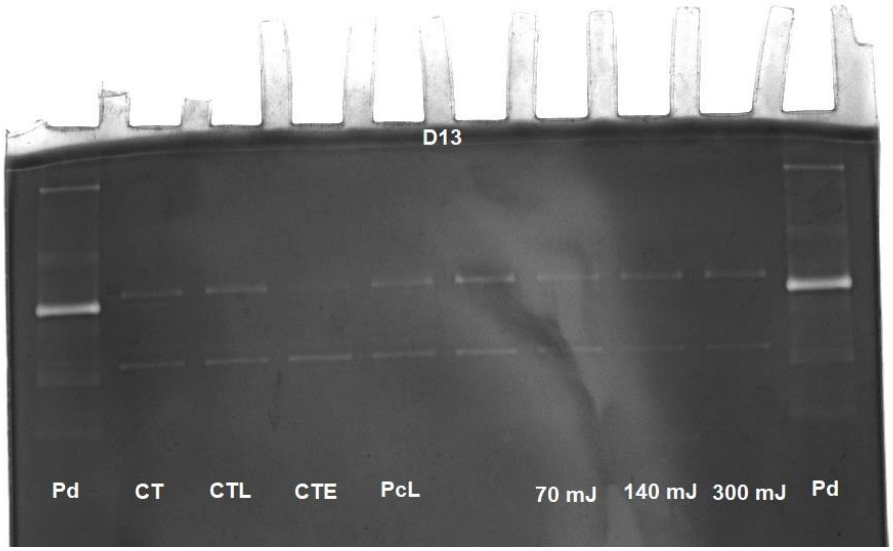

Figura 52 - Gel de zimografia das amostras de meio de cultura da linhagem de fibroblastos NIH/3T3, coletados no D13. O fibrosarcoma HT-1080 foi utilizado como padrão para determinação das bandas de referência.

O meio condicionante extraído de cultura celular de HT-1080 foi utilizado como padrão para gerar marcadores positivos para as faixas enzimáticas das MMP-9 e MMP-2 nas suas formas pró e ativa da MMP-2. A MMP-9 em humanos tem um peso molecular da ordem de 92 kDA, a MMP-2 pró ativa tem peso molecular de 72 kDa e a MMP-2 ativa 66 kDa.

Estudos mostram que fibroblastos dispersos em uma matriz de colágeno produzem MMPs do tipo colagenases (MMP-1) e gelatinases (MMP-2 e MMP-9), resultando na degradação do colágeno e outras proteínas. MMP-1 e MMP-2 são capazes de atacar e clivar a tripla hélice do colágeno tipo I. Então, os fragmentos de colágeno produzidos ficam suscetíveis à ação das gelatinases, que rapidamente degradam o colágeno desnaturado e seus fragmentos (AIMES e QUIGLEY, 1995).

Observamos a expressão das MMP-2, principalmente na sua forma proativa (72 kDa) e MMP-9 (92 kDa), em ambos os dias de coleta (D8) e (D13), porém não visualizamos diferença na intensidade de sinal das bandas quando comparamos os grupos tratados e não tratados. Podemos concluir que o tratamento com a nanoemulsão de ClAlPc mais luz de baixa intensidade não interferiu no metabolismo celular de produção destas metaloproteinases.

A digestão da matriz pelas metaloproteinases de matriz (MMPs) e a produção de outras proteínas de matriz extracelular devem estar em equilíbrio para permitir a reorganização e remodelamento do ambiente extracelular e produção de uma matriz nova pelas células. Por isso, é importante que a degradação da matriz não tenha efeitos negativos na viabilidade e comportamento celular. Em uma situação ideal, a taxa de degradação é optimizada para se igualar à de formação de uma nova matriz, sem que haja perda significativa na estrutura do tecido (AHEARNE, 2014).

4.12- Estudos aplicados de fotobiomodulação nos equivalentes dérmicos com a linhagem de células-tronco HBMS

O mesmo estudo de fotobiomodulação do Item anterior (4.11.3) foi conduzido utilizando-se a linhagem de células-tronco HBMS. Os equivalentes dérmicos foram preparados utilizando-se $2x10^5$ células/ED e 2,0 mL de colágeno.

Neste experimento, foi preparado um total de 30 equivalentes dérmicos, distribuídos nos seguintes grupos: Controle (CT), que não recebeu tratamento algum; Controle luz (CTL), tratado somente com luz de baixa intensidade na dose mais alta (300 mJ/cm^2); Controle Escuro (CTE), que foi tratado apenas com a formulação (3µmol/L ClAlPc/NE); Controle de ftalocianina livre (ClAlPc dissolvida em DMSO) e por último, grupos de tratamento com a formulação 3µmol/L + luz de baixa intensidade em três doses de energia (70 mJ/cm^2, 140 mJ/cm^2 e 300 mJ/cm^2).

Os gráficos abaixo representam a cinética de contração dos grupos avaliados também por 21 dias após o preparo.

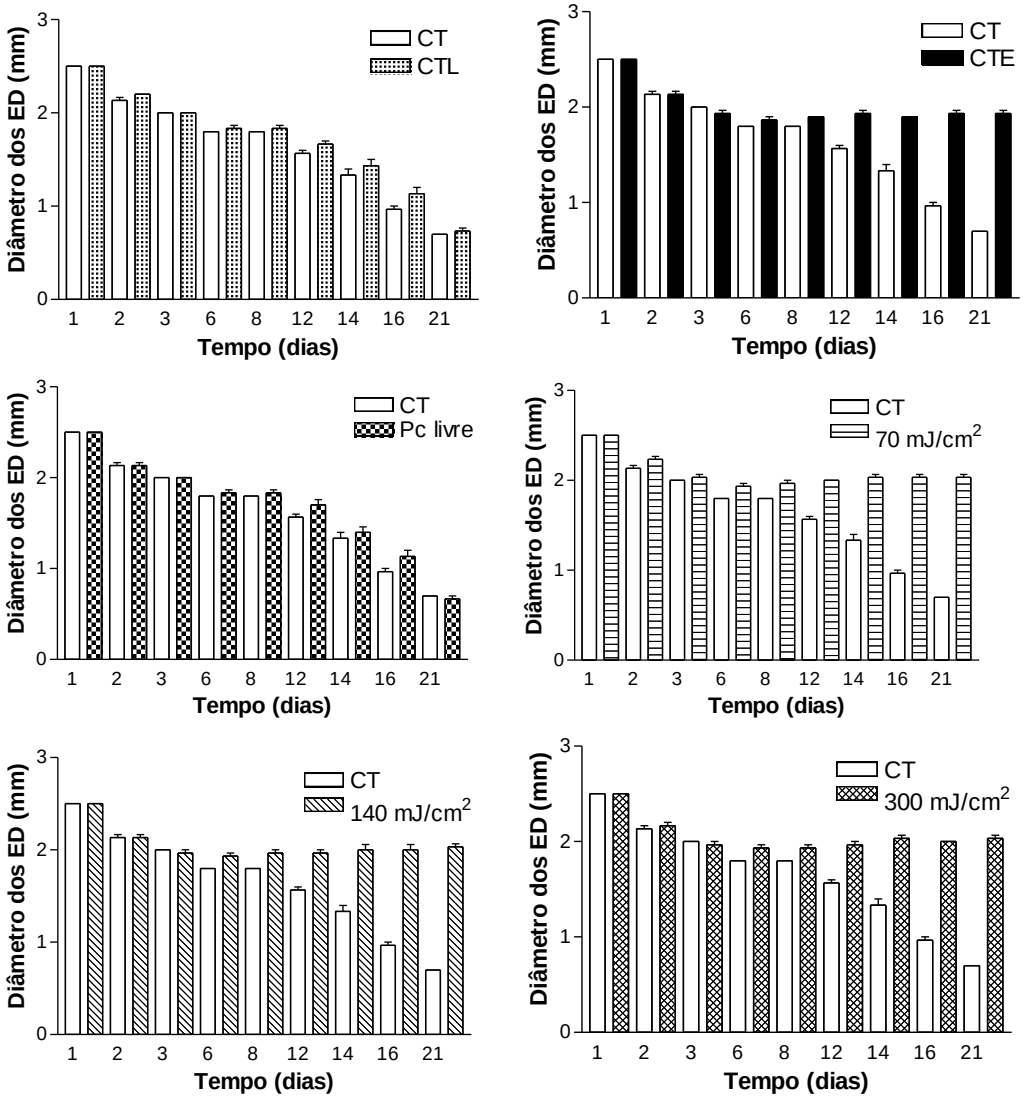

Figura 53 - Diâmetro dos equivalentes dérmicos. D1; D2; D3; D6; D8; D12; D14; D16; D21 = dias após o preparo dos equivalentes dérmicos. D4 = Dia de incubação com ClAlPc/NE 3µmol/L; D5 = Dia de aplicação da luz de baixa intensidade nas diferentes doses (70, 140 e 300 mJ/cm^2). Linhagem de células-tronco HBMS (2x10^5 células/ED).

Os equivalentes dérmicos apresentaram diâmetro de aproximadamente 2,5 cm no primeiro dia após o preparo (exatamente como no outro experimento). Os grupos Controle (CT), Controle luz (CTL) e Controle de ftalocianina livre (Pc livre) mantiveram uma cinética de contração até o final do período avaliado (21 dias) e apresentaram diâmetros menores que 1,0 cm. Porém, os grupos que receberam tratamento com ClAlPc/NE, inclusive o grupo que não

foi irradiado (CTE), tiveram sua cinética interrompida. Eles mantiveram-se com diâmetro de mais ou menos 2 cm, como pode ser visualizado nas fotografias abaixo:

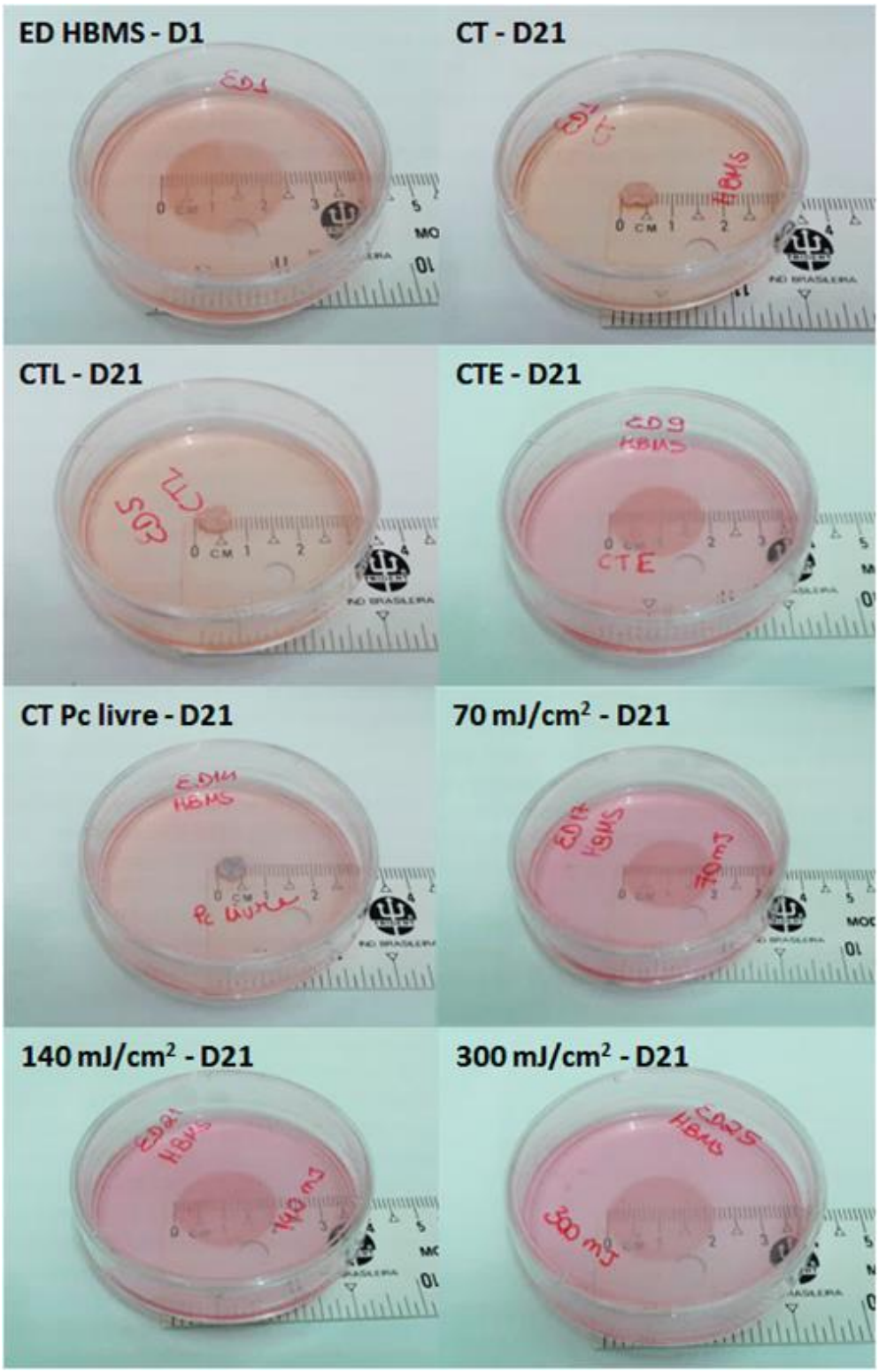

Figura 54 - Fotografias dos equivalentes dérmicos (ED) em meio DMEM 10% completo nas placas de Petri de 60 mm de diâmetro 1 dia após o preparo e após 21 dias de monitoramento. Linhagem células-tronco HBMS ($2x10^5$ células/ED). CT = controle (sem tratamento); CTL = controle luz; CT Pc livre = ClAlPc dissolvida em DMSO; CTE = ClAlPc/NE 3µmol/L sem irradiação; e grupos tratados com ClAlPc/NE 3µmol/L + 70, 140 e 300 mJ/cm^2.

Podemos dizer que a cinética de contração dos equivalentes dérmicos seguiu o mesmo padrão observado no experimento anterior (Item 4.11.3). Houve uma contração mais acentuada nos primeiros dias e então parece que os equivalentes dérmicos se "estabilizaram". Nos grupos controle, exceto no Controle no Escuro (CTE), o modelo voltou a contrair a partir do D8 e apresentou diâmetros bem pequenos no final do período avaliado. Isto não ocorreu nos grupos que receberam ClAlPc/NE, havendo uma interferência do tratamento no processo de contração dérmico para esta linhagem de células-tronco.

Realizou-se a microscopia confocal destes equivalentes dérmicos 24 hora após a irradiação, ou seja, no dia 6 e posteriormente, com um tempo maior de análise, no dia 13. Utilizamos o GFP (proteína verde fluorescente) que é expresso pela linha de células-tronco HBMS como marcador celular e também excitamos as amostras no comprimento de onda referente à ClAlPc.

Observamos que no D6, os equivalentes dérmicos apresentaram poucas células distribuídas, tornando até difícil a identificação de um bom campo para tirar as fotografias. Assim, podemos justificar o processo lento de contração que ocorreu entre os dias D4 e D8 devido à baixa densidade celular encontrada nos equivalentes e o grande distanciamento entre as células, não permitindo ocorrer o processo de contração, pois como explicado no Item 4.7, as células tendem a se aproximar para realizar o processo de contração das fibras de colágeno.

No 13º dia após o preparo, os equivalentes dérmicos foram analisados novamente através da microscopia confocal, e como podemos visualizar nas imagens a seguir, os grupos controle (CT), controle de luz (CTL) e controle de ftalocianina livre apresentaram grande densidade celular em algumas regiões do equivalente dérmico. Nos outros grupos (CTE e grupos tratados com ClAlPc/NE + luz de baixa intensidade), continuamos a observar poucas células e por isto o processo de contração não ocorreu.

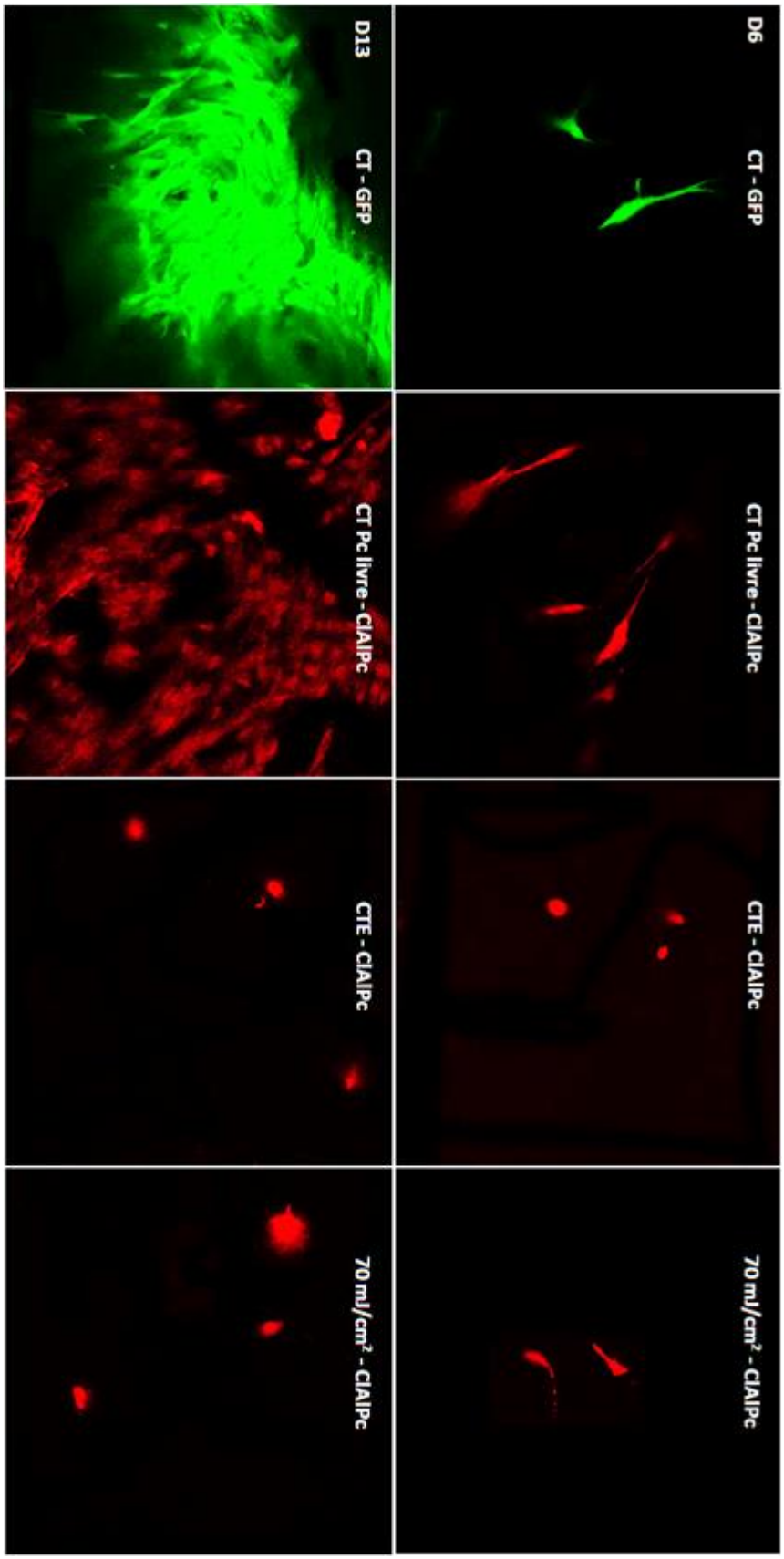

Figura 55 – Imagens de microscopia confocal dos equivalentes dérmicos 24 horas após irradiação (D6 após o preparo) e no D13. Linhagem células-tronco HBMS ($2x10^5$ células/ED). Excitação da ClAlPc (vermelho) em 610-675 nm e GFP (verde) em 500-524 nm.

Nos grupos que contraíram, observa-se a presença de regiões com concentrações celulares maiores (Figura 56). Visualmente, estes aglomerados celulares caracterizam-se como regiões mais opacas nos equivalentes dérmicos, formando algumas ondulações e protuberâncias na superfície dos mesmos. Mecanismos de migração celular estão presentes em várias etapas do processo de cicatrização e reparação tecidual. Na reepitelização e fechamento da ferida ocorre a liberação de mediadores bioquímicos sinalizando a migração dos tipos celulares envolvidos da borda da ferida em direção ao centro da mesma.

Além disso, este evento também foi observado no grupo de ftalocianina livre e, portanto, podemos relacioná-lo aos processos de migração celular e reorganização da matriz e apenas em menor proporção, à proliferação celular. Isto porque a ClAlPc serve como um marcador do arcabouço celular, e após a replicação celular, o fármaco provavelmente não se distribui entre as células-filhas.

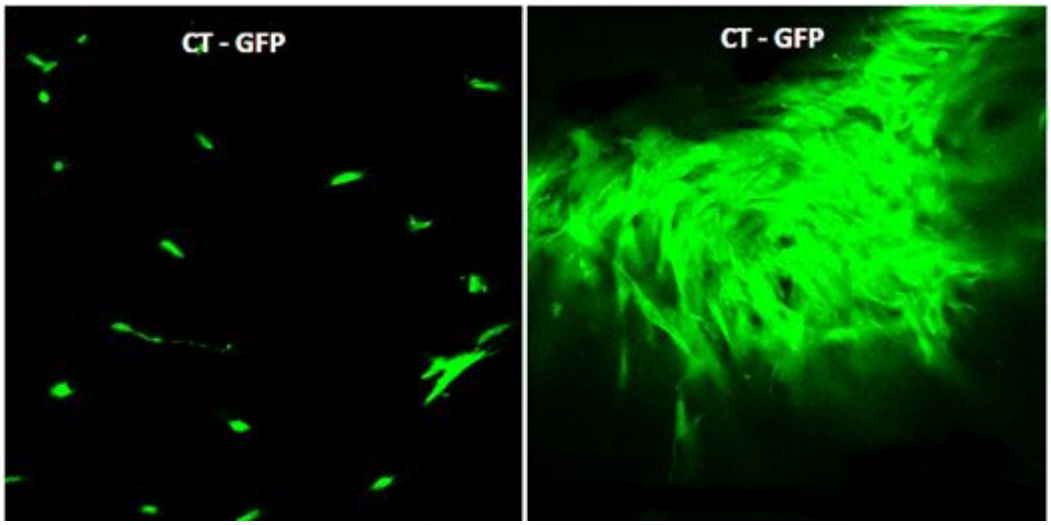

Figura 56 – Imagens de microscopia confocal no D13 em regiões diferentes do mesmo equivalente dérmico (grupo controle). Linhagem células-tronco HBMS ($2x10^5$ células/ED). Excitação do GFP (verde) em 500-524 nm.

Os meios de cultura dos equivalentes dérmicos também foram coletados durante este experimento para análise pela técnica de zimografia. Na Figura 57 podemos visualizar a expressão das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 no dia 8.

Observamos que houve expressão das MMP-2 em sua forma proativa (72 kDa) e ativa (66 kDa), com intensidade maior principalmente nos grupos controles. A expressão da MMP-9 (92 kDa) ocorreu somente nos grupos que não foram tratados com a nanoemulsão de

ClAlPc, ou seja, no controle, controle luz e controle de ftalocianina livre, grupos as quais o processo de contração também não foi interrompido.

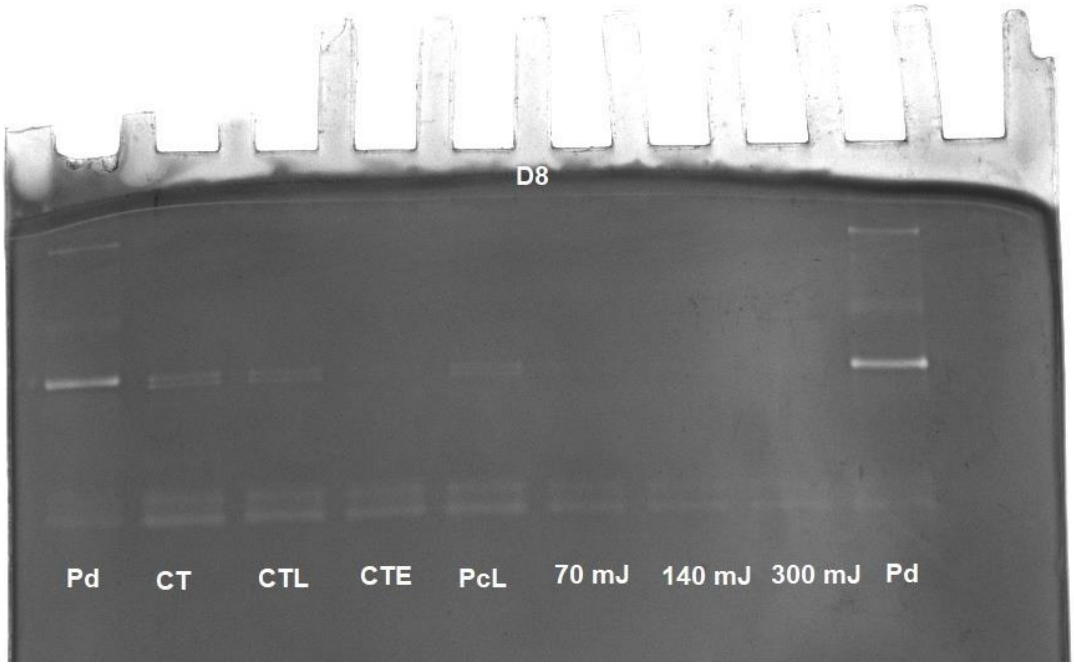

Figura 57 - Gel de zimografia das amostras de meio de cultura da linhagem de células-tronco HBMS, coletados no D8. O fibrosarcoma HT-1080 foi utilizado como padrão para determinação das bandas de referência

As metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) são uma família crescente de metalo-endopeptidases responsáveis pela clivagem dos componentes proteicos da matriz extracelular e desempenham um papel central na remodelagem dos tecidos cutâneos. Por muitos anos após sua descoberta, acreditava-se que a função principal das MMPs era atuar como reguladoras da composição da matriz extracelular (MEC) além de facilitar a migração das células simplesmente por removerem barreiras como o colágeno. Porém, nestes últimos anos tem se tornado bastante claro que as MMPs estão envolvidas no regulamento funcional de muitas outras moléculas que não pertencem diretamente a MEC que incluem: fatores de crescimento e os seus receptores, citocinas e quimiocinas, receptores de adesão, e proteoglicanos da superfície da célula, além de uma variedade de outras enzimas. As MMPs desempenham um importante papel no controle de interações celulares e nas respostas induzidas em condições apropriadas que induzam a recuperação dos tecidos, sejam elas fisiológicas, (como o desenvolvimento normal), ou patológicas, (como a inflamação ou doenças).

Sendo assim, podemos dizer que nos grupos que apresentaram contração a partir do D8, houve uma reorganização celular proveniente de processos de migração e remodulação das fibras de colágeno, que pode ter sido facilitado pela ação das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9, permitindo um processo de contração mais intenso neste período. A marcação

específica das fibras de colágeno como próxima etapa a ser desenvolvida em projetos futuros, poderia nos fornecer informações mais precisas a respeito deste processo.

V- CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os modelos de equivalentes dérmicos apresentam características interessantes como poder de contração e se assemelham morfologicamente ao tecido *in vivo,* podendo, portanto, ser utilizados para entender fenômenos biológicos como o processo de cicatrização e regeneração tecidual.

Nos modelos celulares tridimensionais, obtemos respostas mais semelhantes ao tecido *in vivo*, pois as interações celulares e célula-matriz são maiores, proporcionando um ambiente mais complexo. Por isso, o interesse no desenvolvimento de modelos alternativos que mimetizam a pele humana tem se tornado maior nos últimos anos, auxiliando nas etapas de desenvolvimento e testes de eficácia e segurança de fármacos e cosméticos.

O modelo celular tridimensional escolhido foi denominado de equivalentes dérmicos, pois se assemelham à derme humana, é formado pelo cultivo de fibroblastos em uma matriz de colágeno tipo I. Este modelo pode servir como um substituto cutâneo, funcionando como uma matriz para a migração e proliferação celular. Outras aplicações envolvem a utilização deste modelo como base para a co-cultura de outras linhagens celulares mimetizando sistemas mais complexos como a pele completa (derme + epiderme constituída de queratinócitos e/ou melanócitos) ou até mesmo linhagens de câncer, mimetizando um ambiente patológico.

Este trabalho permitiu o desenvolvimento de protocolos para a caracterização dos equivalentes dérmicos através de técnicas clássicas como a histologia, e por técnicas mais modernas, como a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal, nunca antes realizadas.

O desenvolvimento dos equivalentes dérmicos depende principalmente de dois fatores: quantidade de células e concentração de colágeno. Observamos que a concentração celular utilizada no preparo dos equivalentes dérmicos influencia diretamente na cinética de contração dos equivalentes dérmicos. Ou seja, quanto maior a concentração celular inicial, maior é a contração observada nos primeiros dias. Além disso, como os fibroblastos são os principais responsáveis pela síntese de componentes da matriz extracelular (MEC), como por exemplo, o colágeno, a quantidade celular também está indiretamente relacionada à formação da rede de colágeno. A concentração de colágeno por outro lado, é indiretamente proporcional à cinética de contração dos discos e formação da rede tridimensional. Quanto maior a concentração inicial de colágeno utilizada, menor é a contração observada.

O movimento de contração da matriz de colágeno é realizado mecanicamente pelas células que se ligam às fibras de colágeno e por isso, a taxa de contração depende essencialmente da quantidade de células e da disposição destas fibras. Além disso, observamos que o perfil de contração cinético depende do tipo de linhagem celular utilizado. A linhagem de fibroblastos NIH/3T3 nos permitiu trabalhar em um período de tempo relativamente menor, pois esta linhagem possui rápida taxa de replicação celular, permitindo a produção grande quantidade de ED para os vários testes realizados. Esta é uma vantagem quando se pensa no escalonamento da técnica e no aumento da produção de equivalentes dérmicos.

A linhagem de células-tronco HBMS reproduziu bem o sistema, apresentando até contração mais acentuada e diâmetros menores nos experimentos realizados. Uma possibilidade é que devido à sua morfologia mais alongada, como demostrada nas imagens de microscopia eletrônica de varredura e confocal, a ação mecânica da força de contração foi mais bem desempenhada. O modelo desenvolvido com as células-tronco torna-se promissor visto suas inúmeras possibilidades de aplicação na área; nos estudos de diferenciação celular e na área de regeneração tecidual, como substitutos dos mais variados tecidos.

Outro fator extremamente importante é o tipo de colágeno utilizado. Optamos por extrair o colágeno tipo I das caudas de ratos *Wistar* por ser um protocolo simples e barato, além disso, é descrito e utilizado em vários artigos na literatura. Observamos que a extração realizada em ácido acético 0,5% apresentou melhores resultados e também concluímos que o ideal é trabalhar com soluções de colágeno mais concentradas para utilizar volumes menores durante o preparo dos equivalentes dérmicos.

Nos estudos de fotobioestimulação, analisamos os efeitos da aplicação de um fármaco fotossensibilizante (ClAlPc) e luz de baixa intensidade nos modelos de equivalentes dérmicos. Após alguns testes para avaliar a toxicidade da formulação nanoemulsão e também do fármaco livre, decidiu-se trabalhar com a concentração de 3 µmol/L de ClAlPc/NE, a qual não apresentou citotoxicidade nos experimentos realizados.

Os processos desencadeados pela fotobioestimulação são complexos e dependem de diversos fatores intrínsecos à técnica, como por exemplo, concentração intracelular do fármaco fotossensibilizante e dose de energia adequadas e combinadas em uma janela temporal correta, determinando assim, a modulação da produção e liberação de fatores de crescimento e sinalizadores bioquímicos para a proliferação, migração celular e outros eventos biológicos. Assim, os resultados obtidos neste trabalho foram importantes para os avanços nos estudos dos fotoprocessos e melhor entendimento dos efeitos fotobiológicos no modelo celular tridimensional escolhido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHEARNE, M. Introduction to cell-hydrogel mechanosensing, ***Interface focus***, v. 4, p. 20130038, 2014.

AHMED, H.; SAYED, H. Photo-stimulatory effect of low level energy laser irradiation on the progress of wound healing in mice, ***Journal of American Science***, v. 8, p. 203-211, 2012.

AIMES, R. T.; QUIGLEY, J. P. Matrix Metalloproteinase-2 Is an Interstitial Collagenase Inhibitor-Free Enzyme Catalyzes the Cleavage of Collagen Fibrils and Soluble Native Type I Collagen Generating the Specific 3/4- and 1/4- Length Fragments, ***Journal of Biological Chemistry***, v. 270, p. 5872-5876, 1995.

ALGHAMDI, K. M.; KUMAR, A.; MOUSSA, N. A. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells, ***Lasers in medical science***, v. 27, p. 237-249, 2012.

ALLISON, R. R.; MOTA, H. C.; BAGNATO, V. S.; SIBATA, C. H. Bio-nanotechnology and photodynamic therapy-State of the art review, v. 5, p. 19-28, 2008.

APTE, S. S.; PARKS, W. C. Metalloproteinases: a parade of functions in matrix biology and an outlook for the future, ***Matrix biology***, v. 44, p. 1-6, 2015.

ARPINO, V.; BROCK, M.; GILL, S. E. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis, ***Matrix biology***, v. 44, p. 247-254, 2015.

ASSELINEAU, D.; PRUNIERAS, M. Reconstruction of simplified skin: control of fabrication, ***British Journal of Dermatology***, v. 111, p. 219-222, 1984.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão, ***Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas***, v. 41, p. 27-51, 2005.

BARONI, A.; BUOMMINO, E.; DE GREGORIO, V.; RUOCCO, E.; RUOCCO, V.; WOLF, R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties, ***Clinics in Dermatology***, v. 30, p. 257-262, 2012.

BELL, E.; IVARSSON, B.; MERRILL, C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro, ***Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A***, v. 76, p. 1274-1278, 1979.

BELL, E.; SHER, S.; HULL, B.; MERRILL, C.; ROSEN, S.; CHAMSON, A.; ASSELINEAU, D.; DUBERTRET, L.; COULOMB, B.; LAPIERE, C.; NUSGENS, B.; NEVEUX, Y. The reconstitution of living skin, ***J. Invest Dermatol.***, v. 81, p. 2s-10s, 1983.

BENOV, L. Photodynamic Therapy: Current Status and Future Directions, ***Medical Principles and Practice***, v. 24(suppl 1), p. 14-28, 2015.

BI, H.; JIN, Y. Current progress of skin tissue engineering: Seed cells, bioscaffolds, and construction strategies, ***Burns & Trauma***, v. 1, p. 63-72, 2013.

BRASIL, 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE nº899, de 29 de maio de 2003**. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RE_899_2003.pdf/10773d22-ab7f-473c-ab4e-6827dd5f4d42. Acessado em: janeiro/2018.

BRASIL, 2014. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº17, 3 de julho de 2014**. Disponível em: http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=51&data=04/07/2014. Acesso em: janeiro/2018.

BRASIL, 2014. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. **RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº18, de 24 de setembro de 2014**. Disponível em: http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=9&data=25/09/2014. Acesso em: janeiro/2018.

BRASIL, 2016. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº31, 18 de agosto de 2016**. Disponível em: http://www.renama.org.br/wp-content/uploads/2014/04/RN-31-2016.pdf. Acesso em: janeiro/2018.

BOUWSTRA, J. A.; PONEC, M. The skin barrier in healthy and diseased state, ***Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes***, v. 1758, p. 2080-2095, 2006.

BROHEM, C. A.; DA SILVA CARDEAL, L. B.; TIAGO, M.; SOENGAS, M. a. S.; DE MORAES BARROS, S. B.; MARIA-ENGLER, S. S. Artificial skin in perspective: concepts and applications, ***Pigment Cell & Melanoma Research***, v. 24, p. 35-50, 2011.

BUSKERMOLEN, J. K.; REIJNDERS, C. M.; SPIEKSTRA, S. W.; STEINBERG, T.; KLEVERLAAN, C. J.; FEILZER, A. J.; BAKKER, A. D.; GIBBS, S. Development of a Full-Thickness Human Gingiva Equivalent Constructed from Immortalized Keratinocytes and Fibroblasts, ***Tissue Engineering Part C: Methods***, v. 22, p. 781-791, 2016.

BUTLER, M. F.; NG, Y.; PUDNEY, P. D. Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin, ***Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry***, v. 41, p. 3941-3953, 2003.

CALIXTO, M. G.; BERNEGOSSI, J. +.; DE FREITAS, M. L.; FONTANA, R. C.; CHORILLI, M. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review, v. 21, 2016.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization, ***Photodiagnosis. Photodyn. Ther.***, v. 1, p. 279-293, 2004.

CHAUDRY, Z. F.; ROCHA, J. L.; PLEPIS, A. M.; ROSSI, M.; GOISSIS, G. Preparação e Caracterização de Colágeno Aniônico por Hidrólise Seletiva de Grupos Carboxamida Internos, ***Polímeros: Ciência e Tecnologia***, v. 7, p. 40-46, 1997.

DA SILVA, C. M.; SPINELLI, E.; RODRIGUES, S. V. Fast and sensitive collagen quantification by alkaline hydrolysis/hydroxyproline assay, ***Food Chem.***, v. 173, p. 619-623, 2015.

DAVIS, P.; TABOR, B. E. Kinetic study of the crosslinking of gelatin by formaldehyde and glyoxal, ***Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry***, v. 1, p. 799-815, 1963.

DAWOOD, M. S.; SALMAN, S. D. Low level diode laser accelerates wound healing, ***Lasers in medical science***, v. 28, p. 941-945, 2013.

DE MEDEIROS, M. L.; ARA+¦JO-FILHO, I.; DA SILVA, E. n. M. N.; DE SOUSA QUEIROZ, W. S.; SOARES, C. D.; DE CARVALHO, M. G. F.; MACIEL, M. A. M. Effect of low-level laser therapy on angiogenesis and matrix metalloproteinase-2 immunoexpression in wound repair, ***Lasers in medical science***p. 1-9, 2016.

DEBELS, H.; HAMDI, M.; ABBERTON, K.; MORRISON, W. Dermal matrices and bioengineered skin substitutes: a critical review of current options, ***Plastic and reconstructive surgery Global open***, v. 3, 2015a.

DEBELS, H.; HAMDI, M.; ABBERTON, K.; MORRISON, W. Dermal matrices and bioengineered skin substitutes: a critical review of current options, ***Plastic and Reconstructive Surgery Global Open***, v. 3, p. e284, 2015b.

DEYHIMI, P.; KHADEMI, H.; BIRANG, R.; AKHOONDZADEH, M. Histological Evaluation of Wound Healing Process after Photodynamic Therapy of Rat Oral Mucosal Ulcer, ***Journal of Dentistry***, v. 17, p. 43, 2016.

DOURADO, K. B. V.; JUNIOR, L. C. C.; DE PAULO, R. J. F.; GOMES, A. C. Ledterapia: uma nova perspectiva terapêutica ao tratamento de doenças da pele, cicatrização de feridas e reparação tecidual, ***Ensaios e Ciência: C. Biológicas, Agrárias e da Saúde***, v. 15, 2015.

ELSON, N.; FORAN, D. Low Level Laser Therapy in Modern Dentistry, ***Periodontics and Prosthodontics***, v. 1, 2015.

FARFARA, D.; TUBY, H.; TRUDLER, D.; DORON-MANDEL, E.; MALTZ, L.; VASSAR, R. J.; FRENKEL, D.; ORON, U. Low-level laser therapy ameliorates disease progression in a mouse model of Alzheimer's disease, ***Journal of Molecular Neuroscience***, v. 55, p. 430-436, 2015.

FARIA, P. E. P.; FELIPUCCI, D. N. B.; SIMIONI, A. R.; PRIMO, F. L.; TEDESCO, A. C.; SALATA, L. A. Effects of photodynamic process (PDP) in implant osseointegration: a histologic and histometric study in dogs, ***Clinical implant dentistry and related research***, v. 17, p. 879-890, 2015.

FERREIRA DA SILVA, T.; BARRETTO PENNA, A. L. c. Chemical characteristics and functional properties of collagen, ***Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)***, v. 71, p. 530-539, 2012.

FERREIRA, M. C.; PAGGIARO, A. O.; ISAAC, C.; TEIXEIRA NETO, N.; SANTOS, G. B. d. Substitutos cutâneos: conceitos atuais e proposta de classificação, ***Rev Bras Cir Plást***, v. 26, p. 696-702, 2011.

FOOTE, C. S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation, ***Photochem. Photobiol.***, v. 54, p. 659, 1991.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters, ***European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics***, v. 69, p. 1-9, 2008a.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters, ***European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics***, v. 69, p. 1-9, 2008b.

GESZKE-MORITZ, M.; MORITZ, M. Solid lipid nanoparticles as attractive drug vehicles: composition, properties and therapeutic strategies, ***Materials Science and Engineering: C***, v. 68, p. 982-994, 2016.

GILL, S. E.; PARKS, W. C. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing, ***The international journal of biochemistry & cell biology***, v. 40, p. 1334-1347, 2008.

HERRMANN, D.; CONWAY, J. R.; VENNIN, C.; MAGENAU, A.; HUGHES, W. E.; MORTON, J. P.; TIMPSON, P. Three-dimensional cancer models mimic cell-matrix interactions in the tumour microenvironment, ***Carcinogenesis***, v. 35, p. 1671-1679, 2014.

HOAR, T. P.; SCHULMAN, J. H. Transparent water-in-oil dispersions: the oleopathic hydro-micelle, ***Nature***, v. 152, p. 102-103, 1943.

HOFMAN, K.; HALL, B.; CLEAVER, H.; MARSHALL, S. High-throughput quantification of hydroxyproline for determination of collagen, ***Analytical biochemistry***, v. 417, p. 289-291, 2011.

HOLMES, R. +.; KIRK, S.; TRONCI, G.; YANG, X.; WOOD, D. Influence of telopeptides on the structural and physical properties of polymeric and monomeric acid-soluble type I collagen, ***Materials Science and Engineering: C***, v. 77, p. 823-827, 2017.

HUGHES, O. B.; RAKOSI, A.; MACQUHAE, F.; HERSKOVITZ, I.; FOX, J. D.; KIRSNER, R. S. A Review of Cellular and Acellular Matrix Products: Indications, Techniques, and Outcomes, ***Plastic and Reconstructive Surgery***, v. 138, p. 138S-147S, 2016.

ISAAC, C.; DE LADEIRA, P. R. S.; DO RÊGO, F. M. P.; ALDUNATE, J. C. B.; FERREIRA, M. C. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica, ***Revista de Medicina***, v. 89, p. 125-131, 2010.

ISSA, M. C. A.; MANELA-AZULAY, M. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica, ***Anais Brasileiros de Dermatologia***, v. 85, p. 501-511, 2010.

JAYASREE, R. S.; GUPTA, A. K.; RATHINAM, K.; MOHANAN, P. V.; MOHANTY, M. The influence of photodynamic therapy on the wound healing process in rats, ***Journal of biomaterials applications***, v. 15, p. 176-186, 2001.

JESUS, P. d. C.; SAEKI, S. I.; TEDESCO, A. C. An ex vivo study of photobiostimulation in the treatment of skin pathologies, ***Journal of biophotonics***, v. 9, p. 1189-1198, 2016a.

JESUS, P. d. C.; SAEKI, S. I.; TEDESCO, A. C. An ex vivo study of photobiostimulation in the treatment of skin pathologies, ***Journal of biophotonics*** 2016b.

JIANG, Z.; SHAO, J.; YANG, T.; WANG, J.; JIA, L. Pharmaceutical development, composition and quantitative analysis of phthalocyanine as the photosensitizer for cancer photodynamic therapy, ***Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis***, v. 87, p. 98-104, 2014.

KANITAKIS, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin, ***European journal of dermatology: EJD***, v. 12, p. 390-399, 2002.

KARU, T. I. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation, ***Lasers Life Sci***, v. 2, p. 53-74, 1988.

KEPP, O.; GALLUZZI, L.; LIPINSKI, M.; YUAN, J.; KROEMER, G. Cell death assays for drug discovery, ***Nat. Rev. Drug Discov.***, v. 10, p. 221-237, 2011.

KLEIN, T.; BISCHOFF, R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases, ***Amino Acids***, v. 41, p. 271-290, 2011.

KNAGGS, H. The cell biology of the extracellular matrix by Elizabeth D Hay. pp 468. Plenum Press, New York. 1991. $89: ISBN 0-306-43951-4, ***Biochemical Education***, v. 20, p. 187, 1992.

KOLAR, K. Colorimetric determination of hydroxyproline as measure of collagen content in meat and meat products: NMKL collaborative study, ***J. Assoc. Off Anal. Chem.***, v. 73, p. 54-57, 1990.

KULKARNI, S. A.; FENG, S. S. Effects of particle size and surface modification on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles for drug delivery, ***Pharmaceutical research***, v. 30, p. 2512-2522, 2013.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, ***Colloids and Surfaces B: Biointerfaces***, v. 75, p. 1-18, 2010.

KUPAI, K.; SZUCS, G.; CSEH, S.; HAJDU, I.; CSONKA, C.; CSONT, T.; FERDINANDY, P. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography, ***Journal of Pharmacological and Toxicological Methods***, v. 61, p. 205-209, 2010.

LANGER, R.; VACANTI, J. Advances in tissue engineering, ***Journal of Pediatric Surgery***, v. 51, p. 8-12, 2016.

LAU, P.; BIDIN, N.; KRISHNAN, G.; ANAYBBALEG, S. M.; SUM, M. B. M.; BAKHTIAR, H.; NASSIR, Z.; HAMID, A. Photobiostimulation effect on diabetic

wound at different power density of near infrared laser, ***Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology***, v. 151, p. 201-207, 2015.

LAZARO, J. L.; IZZO, V.; MEAUME, S.; DAVIES, A. H.; LOBMANN, R.; UCCIOLI, L. Elevated levels of matrix metalloproteinases and chronic wound healing: an updated review of clinical evidence, ***Journal of wound care***, v. 25, p. 277-287, 2016.

LEE, H. y.; INSELMAN, A. L.; KANUNGO, J.; HANSEN, D. K. Alternative models in developmental toxicology, ***Systems biology in reproductive medicine***, v. 58, p. 10-22, 2012.

LINDLEY, L. E.; STOJADINOVIC, O.; PASTAR, I.; TOMIC-CANIC, M. Biology and Biomarkers for Wound Healing, ***Plastic and Reconstructive Surgery***, v. 138, p. 18S-28S, 2016.

LIU, T. C.-Y.; WU, D. F.; ZHU, L.; PENG, P.; LIU, L.; YANG, X. B. Microenvironment dependent photobiomodulation on function-specific signal transduction pathways, ***International Journal of Photoenergy***, v. 2014, 2014.

LUBART, R.; FRIEDMANN, H.; SINYKOV, M.; GROSSMAN, N. Biostimulation of photosensitized fibroblasts by low incident levels of visible light energy, ***Laser Therapy***, v. 7, p. 101-105, 1995.

LUBART, R.; EICHLER, M.; LAVI, R.; FRIEDMAN, H.; SHAINBERG, A. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity, ***Photomedicine and Laser Therapy***, v. 23, p. 3-9, 2005.

MA, H.; LI, Y. x.; CHEN, H. l.; KANG, M. l.; LIU, T. C.-Y. Effects of low-intensity laser irradiation on wound healing in diabetic rats, ***International Journal of Photoenergy***, v. 2012, 2012.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, É. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares-Parte1, ***An Bras Dermatol*** 2003.

MANICONE, A. M.; MCGUIRE, J. K. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation, ***Seminars in Cell & Developmental Biology***, v. 19, p. 34-41, 2008.

MARIA DE FÁTIMA, G. S.; ANDRADE, Y. A. d. M. V.; MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização, ***Medicina (Ribeirao Preto. Online)***, v. 41, p. 259-264, 2008.

MARTIN, P.; NUNAN, R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing, ***British Journal of Dermatology***, v. 173, p. 370-378, 2015.

MARTINS, D. O.; SANTOS, F. M.; BRITTO, L. R.; LEMOS, J. B.; CHACUR, M. Neurochemical effects of photobiostimulation in the trigeminal ganglion after inferior alveolar nerve injury, ***Journal of biological regulators and homeostatic agents***, v. 31, p. 147-152, 2017.

MEHNERT, W.; MADER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications, ***Advanced drug delivery reviews***, v. 47, p. 165-196, 2012a.

MEHNERT, W.; MADER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications, ***Advanced drug delivery reviews***, v. 47, p. 165-196, 2012b.

MEHRABAN, N.; FREEMAN, S. H. Developments in PDT Sensitizers for Increased Selectivity and Singlet Oxygen Production, v. 8, 2015.

MENDONÇA, R. J. d.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização, ***Anais Brasileiros de Dermatologia***, v. 84, p. 257-262, 2009.

MENDOZA-GARCIA, J.; SEBASTIAN, A.; ALONSO-RASGADO, T.; BAYAT, A. Optimization of an ex vivo wound healing model in the adult human skin: Functional evaluation using photodynamic therapy, ***Wound Repair and Regeneration***, v. 23, p. 685-702, 2015.

NICHOLAS, M. N.; JESCHKE, M. G.; AMINI-NIK, S. Methodologies in creating skin substitutes, ***Cellular and Molecular Life Sciences***, v. 73, p. 3453-3472, 2016.

NOVAES, R. D.; GONÇALVES, R. V.; CUPERTINO, M. C.; ARAÚJO, B. M.; REZENDE, R. M.; SANTOS, E. C.; LEITE, J. P.; MATTA, S. L. The energy density of laser light differentially modulates the skin morphological reorganization in a murine model of healing by secondary intention, ***International journal of experimental pathology***, v. 95, p. 138-146, 2014.

NYAME, T. T.; CHIANG, H. A.; ORGILL, D. P. Clinical applications of skin substitutes, ***Surgical Clinics***, v. 94, p. 839-850, 2014.

OLIVEIRA, A. G. d.; SCARPA, M. V. n.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsions: Structure and application as drug delivery systems, ***Quimica Nova***, v. 27, p. 131-138, 2004.

PEPLOW, P. V.; CHUNG, T. Y.; BAXTER, G. D. Laser photobiomodulation of proliferation of cells in culture: a review of human and animal studies, ***Photomedicine and Laser Surgery***, v. 28, p. S-3, 2010.

POHLMANN, M.; ROSSI, W. S.; BRENDLER, C. F.; TEIXEIRA, F. G.; JÚNIOR, W. K. FABRICAÇÃO DIGITAL PARA AUXILIAR NO ENSINO-APRENDIZADO DE ALUNOS COM DEFICIÊNCIA VISUAL: ESTUDO DE CASO DOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS, ***Blucher Design Proceedings***, v. 2, p. 2389-2396, 2016.

PRESCIMONE, T.; TOGNOTTI, D.; CASELLI, C.; CABIATI, M.; D'AMICO, A.; DEL RY, S.; GIANNESSI, D. Reappraisal of Quantitative Gel Zymography for Matrix Metalloproteinases, ***Journal of Clinical Laboratory Analysis***, v. 28, p. 374-380, 2014.

PRIMO, F. L.; DA COSTA REIS, M. B.; PORCIONATTO, M. A.; TEDESCO, A. C. In vitro evaluation of chloroaluminum phthalocyanine nanoemulsion and low-level laser therapy on human skin dermal equivalents and bone marrow mesenchymal stem cells, ***Curr. Med. Chem.***, v. 18, p. 3376-3381, 2011.

PRIMO, F. L.; DE PAULA, L. B.; DE SIQUEIRA-MOURA, M. P.; TEDESCO, A. C. Photobiostimulation on wound healing treatment by ClAlPc-nanoemulsion from a multiple-wavelength portable light source on a 3D-human stem cell dermal equivalent, ***Curr. Med. Chem.***, v. 19, p. 5157-5163, 2012.

PRIMO, F. L.; TEDESCO, A. C. Combining photobiology and nanobiotechnology: a step towards improving medical protocols based on advanced biological models, ***Nanomedicine. (Lond)***, v. 8, p. 513-515, 2013.

PRINDEZE, N. J.; MOFFATT, L. T.; SHUPP, J. W. Mechanisms of action for light therapy: a review of molecular interactions, ***Experimental Biology and Medicine***, v. 237, p. 1241-1248, 2012.

RA, H. J.; PARKS, W. C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity, ***Matrix biology***, v. 26, p. 587-596, 2007.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters, ***Progress in Polymer Science***, v. 36, p. 887-913, 2011.

REDDY, G. K.; ENWEMEKA, C. S. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues, ***Clin. Biochem.***, v. 29, p. 225-229, 1996.

RICCI, S.; DGÇÖESPOSITO, V.; FORMISANO, P.; DI CARLO, A. Substrate-zymography: a still worthwhile method for gelatinases analysis in biological samples, ***Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)***, v. 54, p. 1281-1290, 2016.

ROBERTSON, C. A.; EVANS, D. H.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT, ***Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology***, v. 96, p. 1-8, 2009.

ROHANI, M. G.; PARKS, W. C. Matrix remodeling by MMPs during wound repair, ***Matrix biology***, v. 44GÇô46, p. 113-121, 2015.

RUCKER, R. B.; MURRAY, J. Cross-linking amino acids in collagen and elastin, ***Am J Clin Nutr***, v. 31, p. 1221-1236, 1978.

SAHU, K.; SHARMA, M.; BANSAL, H.; DUBE, A.; GUPTA, P. K. Topical photodynamic treatment with poly-L-lysine-chlorin p6 conjugate improves wound healing by reducing hyperinflammatory response in Pseudomonas aeruginosa-infected wounds of mice, ***Lasers in medical science***, v. 28, p. 465-471, 2013.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L. d. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos, ***Química nova. São Paulo. Vol. 26, n. 5 (2003), p. 726-737*** 2003.

SHOULDERS, M. D.; RAINES, R. T. Collagen structure and stability, ***Annual review of biochemistry***, v. 78, p. 929-958, 2009.

SILVA, A. P.; NUNES, B. R.; DE OLIVEIRA, M. C.; KOESTER, L. S.; MAYORGA, P.; BASSANI, V. L.; TEIXEIRA, H. F. Development of topical nanoemulsions containing the isoflavone genistein, ***Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences***, v. 64, p. 32-35, 2009.

SILVA, J. C.; LACAVA, Z. G. M.; KUCKELHAUS, S.; SILVA, L. P.; NETO, L. F. M.; SAURO, E. E.; TEDESCO, A. C. Evaluation of the use of low level laser and

photosensitizer drugs in healing, ***Lasers in surgery and medicine***, v. 34, p. 451-457, 2004.

SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos, ***Química Nova***, v. 25, p. 801-807, 2002.

SIQUEIRA-MOURA, M. P.; PRIMO, F. L.; ESPREAFICO, E. M.; TEDESCO, A. C. Development, characterization, and photocytotoxicity assessment on human melanoma of chloroaluminum phthalocyanine nanocapsules, ***Mater. Sci. Eng C. Mater. Biol. Appl.***, v. 33, p. 1744-1752, 2013.

SMALLEY, K. S.; LIONI, M.; NOMA, K.; HAASS, N. K.; HERLYN, M. In vitro three-dimensional tumor microenvironment models for anticancer drug discovery, ***Expert. Opin. Drug Discov.***, v. 3, p. 1-10, 2008.

SNOEK-VAN BEURDEN, P. A.; VON DEN HOFF, J. W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors, ***Biotechniques***, v. 38, p. 73-83, 2005.

SPERANDIO, F. F.; SIMOES, A.; ARANHA, A. C. l. C. a.; CORRÊA, L.; ORSINI MACHADO DE SOUSA, S. Photodynamic therapy mediated by methylene blue dye in wound healing, ***Photomedicine and Laser Surgery***, v. 28, p. 581-587, 2010.

STOCKERT, J. C.; BLAZQUEZ-CASTRO, A.; CANETE, M.; HOROBIN, R. W.; VILLANUEVA, A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets, ***Acta Histochem.***, v. 114, p. 785-796, 2012.

TADROS, T. F. Surfactants In Nano-Emulsions, ***Applied Surfactants: Principles And Applications***p. 285-308, 2005.

TOKITO, A.; JOUGASAKI, M. Matrix Metalloproteinases in Non-Neoplastic Disorders, ***International Journal of Molecular Sciences***, v. 17, p. 1178, 2016.

TOREZAN, L.; NIWA, A. B. M.; FESTA NETO, C. Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações, ***Anais Brasileiros de Dermatologia***, v. 84, p. 445-459, 2009.

TURRIONI, A. P.; BASSO, F. G.; MONTORO, L. A.; ALMEIDA, L. F. D.; SOUZA COSTA, C. A.; HEBLING, J. Transdentinal photobiostimulation of stem cells from human exfoliated primary teeth, ***International endodontic journal***, v. 50, p. 549-559, 2017.

VANDOOREN, J.; GEURTS, N.; MARTENS, E.; VAN DEN STEEN, P. E.; OPDENAKKER, G. Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes, ***Nat Meth***, v. 10, p. 211-220, 2013.

VENUS, M.; WATERMAN, J.; MCNAB, I. Basic physiology of the skin, ***Surgery-Oxford International Edition***, v. 28, p. 469-472, 2010.

VERMA, D. D.; VERMA, S.; BLUME, G.; FAHR, A. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin, ***International journal of pharmaceutics***, v. 258, p. 141-151, 2003.

WICKETT, R. R.; VISSCHER, M. O. Structure and function of the epidermal barrier, ***American journal of infection control***, v. 34, p. S98-S110, 2006.

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

YAMAUCHI, M.; SHIIBA, M. Lysine hydroxylation and cross-linking of collagen, ***Post-translational Modifications of Proteins: Tools for Functional Proteomics***p. 95-108, 2008.