

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MODELO DE PELE
HUMANA RECONSTRUÍDA *IN VITRO* PARA ESTUDOS DE
CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE**

LEILANE BENTES DE SOUSA

MANAUS

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS- GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LEILANE BENTES DE SOUSA

DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE PELE HUMANA

RECONSTRUÍDA *IN VITRO* PARA ESTUDOS DE

CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do
Amazonas, como parte do requisito para obtenção do título
de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marne Carvalho de Vasconcellos

MANAUS

2018

LEILANE BENTES DE SOUSA

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MODELO DE PELE
RECONSTRUÍDA *IN VITRO* PARA ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE
E GENOTOXICIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do
Amazonas, como parte do requisito para obtenção do título
de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2018.

BANCA EXAMIDADORA



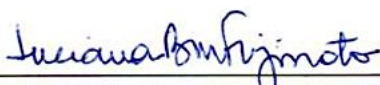
Prof^ª. Dr^ª. Marne Carvalho de Vasconcellos

Orientadora/Presidente – Universidade Federal do Amazonas



Prof^ª. Dr^ª. Raquel Carvalho Montenegro

Membro externo – Universidade Federal do Ceará



Prof^ª. Dr^ª. Luciana Botinelly Fujimoto

Universidade Federal do Amazonas

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor (a).

S725d	Sousa, Leilane Bentes de Desenvolvimento e aplicação de modelo de pele reconstruída <i>in vitro</i> para estudos de citotoxicidade e genotoxicidade / Leilane Bentes de Sousa. 2018 89 f.: il. Color; 31 cm. Orientadora: Marne Carvalho de Vasconcellos Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Amazonas 1. Pele humana. 2. Cultura celular permanente. 3. Segurança. 4. Toxicidade. I. Vasconcellos, Marne Carvalho de II. Universidade Federal do Amazonas III. Título.
-------	--

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar comigo guiando meus caminhos;

À minha família que tanto amo, em especial aos meus pais Adenilde Bentes de Sousa e João Batista Pinto de Sousa, minha irmã Gabriela Bentes de Sousa e minha sobrinha Agatha que está por vir por me apoiarem em todos os momentos e pelo amor incondicional;

Ao meu namorado, Rafael Mendonça, pelo companheirismo, dedicação, paciência e amor;

À minha sogra, Zulmira Mendonça, pelos conselhos, conversas e amor;

À Prof^ª. Dr^ª. Marne Carvalho de Vasconcellos pela oportunidade de orientação, pelos conselhos e por contribuir no meu desenvolvimento acadêmico e profissional;

Ao Prof. Dr. Emerson Silva Lima por não medir esforços para o desenvolvimento dessa pesquisa;

Às Prof^ª. Dr^ª. Raquel Montenegro e Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Negreiros pelo auxílio na realização dos ensaios no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da UFC em Fortaleza-CE.

À Farmacêutica Doutora Tatiana do Nascimento Pedrosa pela contribuição fundamental nessa pesquisa no desenvolvimento do modelo de pele, pelas conversas, risadas, dicas e amizade.

Aos meus grandes amigos e amigas do laboratório e faculdade que me apoiaram nos melhores e piores momentos e contribuíram com meu crescimento profissional e social: Elenn Aranha, Caio Ferreira, Carolina Valentim, Tallita Machado, Maíra Henriques, Lorena Santarém, Gutemberg Soares, Márcia Jesus, Rayanne Souza, Leonard Acho, Ângela Comapa, Kríschia Parente, Bianca Lima, Mayara Costa.

Aos meus amigos de Pitinga-AM pelo apoio incondicional de anos, em especial Geyciane Thamires, Leandro Fontes e Deleon Ramos *in memoriam*;

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas por toda a infraestrutura disponibilizada;

À CAPES, FAPEAM e CNPq pelo apoio financeiro;

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelo auxílio de passagens e ajuda de custo em viagens para treinamentos e congressos;

À todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

RESUMO

O desenvolvimento de métodos alternativos *in vitro* baseia-se no refinamento, redução e substituição ao uso de animais em experimentação e têm sido desenvolvidos para testar a segurança de cosméticos e medicamentos. É importante considerar as dificuldades que o Brasil enfrenta com questões alfandegárias e de perecibilidade que dificultam e até mesmo impedem a utilização de modelos de pele humana reconstruída disponíveis comercialmente. Este trabalho teve como objetivo desenvolver um modelo de pele humana reconstruída (PHR-UFAM) *in vitro* utilizando células de cultura permanente e testar suas aplicabilidades para ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade. Para isso, as peles foram geradas utilizando queratinócitos e fibroblastos (embebidos em colágeno) humanos permanentes. O controle de qualidade das peles foi feito por análise morfológica e imunohistoquímica, a viabilidade pelo teste do MTT com o controle negativo e teste de função barreira. A aplicabilidade para ensaios de genotoxicidade foi avaliada pelo teste do micronúcleo, cometa em pH alcalino e neutro e cometa modificado para detecção de sítios de metilação no DNA com os controles positivos de cada teste definidos pela OECD e pela literatura. A melhor condição testada permitiu o desenvolvimento de uma pele humana reconstruída (PHR-UFAM) com uma camada epidérmica apresentando expressão de marcadores imunohistoquímicos epiteliais (citoqueratinas) e dérmico (vimentina). O modelo atendeu aos parâmetros de qualidade (histologia, viabilidade e função barreira) e apresentou semelhança morfológica com os modelos reconhecidos e validados pela OECD. A aplicabilidade para ensaios de genotoxicidade evidenciou efetividade dos controles positivos: Mitomicina C, que foi capaz de aumentar significativamente a frequência de micronúcleos em 3,03% e 3,51% nas concentrações de 1,5 e 3 µg/mL; Etilmetanossulfonato, que causou dano ao DNA no modelo de pele quando testado nas concentrações de 5 e 10 µM, avaliado pelo ensaio do cometa tanto na versão alcalina (índices de dano iguais a 59,3 e 103,7, respectivamente) quanto na neutra (índices de dano iguais a 40,7 e 125, respectivamente); e 5-azacitidina no ensaio do cometa modificado para detecção de metilação no DNA testada nas concentrações 0,5, 1 e 1,5 µM, que apresentou índices de dano reduzidos iguais a 107,5, 83,1 e 89,3, respectivamente, no modelo de pele PHR-UFAM. Os resultados foram comparados com o controle não tratado. Diante do exposto, com este trabalho foi possível desenvolver um modelo de pele humana reconstruída composta totalmente de células permanentes semelhante aos modelos validados e reconhecidos na literatura. Contudo, é necessária a realização de estudos de validação complementares que comprovem sua efetividade para ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade de substâncias com potencial terapêutico ou cosmético.

Palavras – chave: Pele humana, cultura celular permanente, segurança.

ABSTRACT

Alternative methods are being developed to reduce, refine, and replace (3Rs) animals used in experiments and have been applied to test the safety of cosmetics and medicines. It is important to consider the difficulties that Brazil faces with customs and perishability issues that hinder and even prevent the use of commercially available reconstructed human skin models. The aim of this work was to develop a reconstructed human skin model (PHR-UFAM) and test its applicability for cytotoxicity and genotoxicity assays. For this, skins were generated using permanent human keratinocytes and fibroblasts (embedded in collagen) cells. The quality control was performed by morphological and immunohistochemical analyses, viability by MTT test with negative control, and barrier function test. The applicability for genotoxicity assays was evaluated by micronucleus test, neutral and alkaline comet, and modified comet for detection of DNA methylation sites with positive controls of each test defined by OECD and literature. The best condition tested allowed the development of a reconstructed human skin (PHR-UFAM) with epidermis presenting expression of immunohistochemical markers: epithelial (cytokeratins) and dermal (vimentin). The model followed quality parameters (histology, viability, and barrier function) and presented morphological similarity with models recognized and validated by OECD. The applicability of skin model for genotoxicity assays demonstrated the effectiveness of the positive controls: Mitomycin C that was able to increase significantly the micronucleus frequency when tested at concentrations of 1,5 e 3 µg/mL (3.03% and 3.51%, respectively); Ethylmethanesulfonate caused damage to the DNA when tested at concentrations of 5 e 10 µM by comet assay in both alkaline (damage index values of 59.3 and 103.7, respectively) and neutral (damage index of 40.7 and 125, respectively) versions; and 5-azacytidine in the modified comet assay for methylation detection, tested at concentrations of 0.5, 1 e 1.5 µM showed reduced damage indexes (107.5, 83.1, and 89.3, respectively). The results were similar to skin models validated by OECD and literature. Thus, with this work it was possible to develop a reconstructed human skin model composed entirely of permanent cells. However, further validation studies are required to prove its effectiveness for cytotoxicity and genotoxicity tests of substances with therapeutic or cosmetic potential.

Keywords: Human skin, permanent cell culture, security.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Camadas da pele e seus componentes celulares..	15
Figura 2 - Camadas da epiderme e seus constituintes celulares.....	16
Figura 3 - Diferenciação dos queratinócitos e expressão de proteínas na epiderme..	17
Figura 4 - Camadas da epiderme e os tipos de queratinas produzidas.	19
Figura 5 - Derme: componentes estruturais e celulares.....	21
Figura 6 – Microscopia óptica evidenciando as diferenças entre a pele murina e a pele humana	35
Figura 7 - Fluxograma de atividades desenvolvidas.	39
Figura 8 – Esquema representativo das condições de cultivo para padronização da pele humana reconstruída in vitro PHR-UFAM.	42
Figura 9 – Imagem de fluorescência de uma célula binucleada corada com Laranja de Acridina positiva para micronúcleo.....	47
Figura 10 – Classificação dos cometas segundo o tipo de dano ao DNA (grau 0 a grau 4) conforme tamanho da fragmentação do DNA (cauda do cometa).	49
Figura 11 - Comparativo entre os cortes histológicos da (A) epiderme e derme humana, (B) PHR-UFAM e os modelos validados pelo Guia OECD 439 como métodos alternativos à pele humana (C) EpiSkin (D) EpiDerm™ Tissue Model, (E) SkinEthic™ RHE, (F) LabCyte EPI-MODEL e o modelo de epiderme desenvolvido pela Universidade de São Paulo - USP (G) Epiderme-USP.	54
Figura 12- Coloração diferencial por Hematoxilina/Eosina e imunomarcagem para coquetel de citoqueratinas (CKpool U16) e vimentina (U999) da PHR-UFAM na ausência de Soro Fetal Bovino (SFB) e Fator de Crescimento de Queratinócitos (KGF)..	55
Figura 13 – Avaliação da função barreira do modelo de pele humana reconstruída da UFAM (PHR-UFAM).....	57
Figura 14 – Viabilidade celular de fibroblastos, queratinócitos e pele humana reconstruída PHR-UFAM sem tratamento (meio) e tratados com acetona e Mitomicina C (MIT) pelo método de exclusão por Azul de Tripán.....	59
Figura 15 – Representação gráfica do percentual de células mono e binucleadas após tratamento de 24 horas com Mitomicina C em fibroblastos humanos (MRC5), queratinócitos humanos (HACAT) e PHR-UFAM nas concentrações de 1,5 e 3 µg/Ml.....	61

Figura 16 – Frequência de células micronucleadas após tratamento de 24 horas com Mitomicina C em fibroblastos humanos (MRC5), queratinócitos humanos (HACAT) e PHR-UFAM nas concentrações de 1,5 e 3 µg/mL..	62
Figura 17 – Efeito do tratamento do Etilmetanossulfonato (EMS) em fibroblastos, queratinócitos e PHR-UFAM na fragmentação do DNA pelo ensaio do cometa em pH alcalino.	64
Figura 18 – Efeito do tratamento do Etilmetanossulfonato (EMS) em fibroblastos, queratinócitos e PHR-UFAM na fragmentação do DNA pelo ensaio do cometa em pH neutro.	65
Figura 19 – Viabilidade celular de fibroblastos, queratinócitos e pele humana reconstruída PHR-UFAM submetidos ao tratamento com 5-azacitidina (5-AZA) pelo método de exclusão por Azul de Tripan.....	67
Figura 20 - Efeito do tratamento com 5-azacitidina (5-AZA) em fibroblastos, queratinócitos e PHR-UFAM na fragmentação do DNA pelo ensaio do cometa modificado para detecção de sítios de metilação do DNA.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Métodos alternativos ao uso de animais reconhecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal em 2014. Adaptado de CONCEA (2015).	30
Tabela 2 – Fatores de crescimento utilizados como aditivos para formação da pele artificial in vitro. Adaptado de (PEDROSA, 2016).	33
Tabela 3 - Coloração diferencial por Hematoxilina/Eosina e Picrocirius entre as condições testadas da PHR-UFAM na ausência (-) ou presença (+) de Soro Fetal Bovino (SFB) e Fator de Crescimento de Queratinócitos (KGF).	53
Tabela 4 – Valores de densidade óptica (DO) para o controle negativo em ensaio de MTT para o modelo de pele humana reconstruída da UFAM (PHR-UFAM) e os modelos validados e descritos no Guia OECD 439, bem como o modelo de epiderme desenvolvido pela USP.....	56
Tabela 5 – Comparação entre a função barreira obtida para o modelo de equivalente de pele humana reconstruída da UFAM (PHR-UFAM) e os modelos de pele validados segundo o guia OECD 439	57
Tabela 6– Percentual de células mono/binucleadas e presença de micronúcleos após tratamento de 24 horas com Mitomicina C em fibroblasto humano (MRC5), queratinócito humano (Hacat) e PHR-UFAM. O percentual de cada tratamento foi calculado a partir da contagem de 500 células em triplicata.	60

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 A pele humana	15
2.1.1 Epiderme: componentes estruturais e células	16
2.1.2 Membrana basal: junção dermo-epidérmica.....	20
2.1.3 Derme: componentes estruturais e células.....	20
2.1.4 Hipoderme: Tecido adiposo subcutâneo.....	22
2.2 Segurança de cosméticos e medicamentos	23
2.2.1 Genotoxicidade e análises toxicológicas envolvendo alterações no DNA.....	26
2.3 Métodos alternativos ao uso de animais em experimentação.....	30
2.4 Pele humana reconstruída.....	32
2.5 Necessidade do desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais em experimentação utilizando pele humana reconstruída.....	34
3 OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo Geral	38
3.2 Objetivos Específicos	38
4 METODOLOGIA.....	39
4.1 Tipo de estudo	39
4.2 Desenho experimental	39
4.3 Cultura celular	40
4.4 Geração da pele humana reconstruída (PHR-UFAM).....	41
4.5 Condições para padronização da PHR-UFAM.....	41
4.6 Controle de qualidade da PHR-UFAM	42
4.6.1 Morfologia e imunohistoquímica	42
4.6.2 Viabilidade celular.....	43
4.6.3 Avaliação da função barreira da PHR-UFAM – Tempo de Exposição 50 (ET50) e Concentração de exposição 50 (EC50).....	44

4.7 Avaliação da genotoxicidade em modelo de pele reconstruída <i>in vitro</i> PHR-UFAM	45
4.7.1 Ensaio para detecção de micronúcleos	45
4.7.2 Ensaio do cometa em pH alcalino e neutro	47
4.7.3 Ensaio do cometa modificado para detecção de sítios de metilação no DNA	50
4.8 Análise estatística dos resultados	51
5 RESULTADOS	52
5.1 Geração da pele humana reconstruída PHR-UFAM	52
5.2 Controle de qualidade da PHR-UFAM	53
5.2.1 Morfologia e imunohistoquímica	53
5.2.2 Viabilidade celular do controle negativo.....	55
5.2.3 Avaliação da função barreira da PHR-UFAM – Tempo de Exposição 50 (ET50) e Concentração de exposição 50 (EC50).....	56
5.3 Avaliação da genotoxicidade em modelo de pele reconstruída <i>in vitro</i> PHR-UFAM	58
5.3.1 Ensaio para detecção de micronúcleos	58
5.3.2 Ensaio do cometa em pH alcalino e neutro	62
5.3.3 Ensaio do cometa modificado para detecção de sítios de metilação no DNA	66
6 DISCUSSÃO	70
7 CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

1 INTRODUÇÃO

A pele é considerada uma importante função barreira que protege o organismo humano contra agentes físicos, químicos e infecciosos do ambiente externo, mas seu papel se estende além das propriedades de revestimento e proteção do corpo. Sua relação com os demais órgãos é singular e está integrada aos sistemas de forma que permite o equilíbrio deste com o ambiente externo (BARBOSA, 2011; BARONI et al., 2012; PROKSCH; BRANDNER; JENSEN, 2008; WICKETT; VISSCHER, 2006).

Quando exposta a agentes externos (físicos, químicos ou infecciosos) a pele é responsável por desencadear uma série de eventos com o objetivo de reestabelecer a homeostase. Esses eventos devem a participação de células, ativação do sistema imunológico, liberação de sinalizadores, mudanças estruturais, dentre outras. As manifestações clínicas decorrentes dessa exposição podem variar de edema e eritema leves à exsudação. Quando o dano persiste e não consegue ser reparado, processos crônicos podem se estabelecer e desencadear doenças como dermatite, pêfigo vulgar, necrólise epidérmica tóxica (síndrome de Lyell) dentre outras (PROKSCH, BRANDNER & JENSEN, 2008).

Alterações nos padrões funcionais da pele podem levar a processos patogênicos, essas alterações podem ser decorrentes da toxicidade de substâncias químicas como medicamentos ou cosméticos. O estudo de como ocorrem essas alterações nas funções biológicas da pele, ou mesmo avaliação da presença e magnitude das mesmas, frente a esses xenobióticos é crítico no desenvolvimento de produtos totalmente seguros para uso humano. Com o cenário atual em prol do uso racional de animais de experimentação, muito utilizados para avaliar toxicidade de substâncias, diversos modelos *in vitro* estão sendo regulamentados e validados pelos órgãos internacionais para reduzir o uso de animais e orientar melhor os ensaios pré-clínicos.

Uma vez que as células que compõem o tecido da pele humana crescem dentro de uma matriz tridimensional (3D) continuamente cercada por células vizinhas, as culturas de células em monocamada (2D), atualmente muito utilizadas, não retratam fielmente a arquitetura fisiológica da pele. Com isso, vários tipos de peles artificiais ou reconstruídas em cultura tridimensional *in vitro* estão sendo desenvolvidas e validadas. Contudo, essas peles possuem algumas limitações tais como: requerem culturas de células primárias (retiradas do tecido *in vivo*), possuem um tempo para utilização limitado, necessitam ser importadas de outros países e muitas vezes por questão de logística e regulamentação rigorosa de tecidos vivos, impossibilita a realização de testes em países como o Brasil (BROHEM et al., 2011; WEVER et al., 2015).

A avaliação do potencial genotóxico (dano ao DNA) de substâncias é tradicionalmente realizada em animais por meio das alterações em suas células após exposição ao produto. Esse dano pode ser detectado precocemente por ensaios *in vitro* utilizando cultura de células. Assim, a utilização de novos métodos *in vitro* são importantes para direcionar melhor os ensaios com animais e seres humanos (FRÖTSCHL, 2015; VASQUEZ, 2012).

Nesse contexto, o desenvolvimento de métodos alternativos eficazes para ensaios *in vitro* de segurança disponíveis e mais viáveis para a realização pelos laboratórios, bem como, outros testes de pesquisa e desenvolvimento de cosméticos e medicamentos, é necessário para refinar, reduzir e substituir modelos com animais e melhorar o cenário da pesquisa e desenvolvimento no Brasil. Sendo assim, com esta pesquisa pretende-se contribuir com um modelo de pele humana *in vitro* totalmente constituída de células de linhagens permanentes aplicada para o estudo da toxicidade de substâncias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A pele humana

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano, compreendendo cerca de 15 a 20% do seu peso total, com uma área superficial que varia de 0,2 m² no nascimento a 1,8-2,5 m² no ser humano adulto e uma espessura de 1,5 a 4 mm. Sua constituição complexa, incluindo vários tipos celulares, permite com que este órgão seja responsável por funções vitais para o ser humano, tais como termorregulação, percepção sensorial, excreção e absorção, bem como, proteção a injúrias, infecção e desidratação (ANDERSON, 2014; HARRIS, 2009; MARTIN, VULIN & HENDRY, 2016).

Como mostrado na figura 1, a pele é dividida em dois principais compartimentos estruturais: a epiderme, primeira barreira física química/bioquímica (antimicrobiana e imunidade inata) e imunológica adaptativa; e a derme, responsável pelo suporte mecânico e nutricional da pele. Alguns anatomistas referem-se à tela subcutânea como parte da pele e a chamam de hipoderme (ANDERSON, 2014; BARONI et al., 2012; PROKSCH, BRANDNER & JENSEN, 2008).

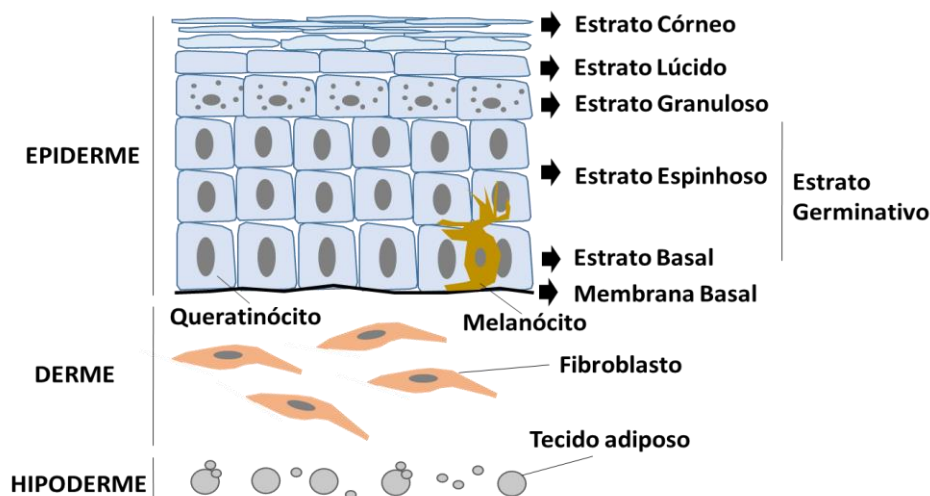


Figura 1- Camadas da pele e seus componentes celulares. A pele é dividida histologicamente em duas camadas principais, a epiderme (subdividida em estratos ou camadas) e a derme. A hipoderme constitui a tela subcutânea. Fonte: a autora.

Tanto a epiderme quanto a derme participam na formação da estrutura da matriz altamente especializada, a membrana basal, o qual separa fisicamente esses compartimentos, proporcionando uma interface dinâmica e estabilizadora. Embora toda a estrutura da pele participe ativamente na defesa do hospedeiro, a epiderme possui importante ação na perda de água e outros componentes do corpo para o ambiente externo, bem como na proteção do corpo contra uma variedade de estímulos ambientais (BARONI et al., 2012).

2.1.1 Epiderme: componentes estruturais e células

A epiderme estruturalmente é constituída por vários estratos ou camadas anatomicamente distintas (Figura 2). A camada mais superficial, com apenas 10-20 μm de espessura, é denominada estrato córneo de onde provém a principal barreira de absorção de componentes bem como controle da perda de água através da pele. Abaixo do estrato córneo encontra-se a epiderme viável, com cerca de 50-100 μm de espessura, constituída principalmente de células denominadas queratinócitos que dão origem ao estrato córneo. As camadas são definidas quanto a posição, morfologia e estado de diferenciação dos queratinócitos (BOUWSTRA et al., 2003).

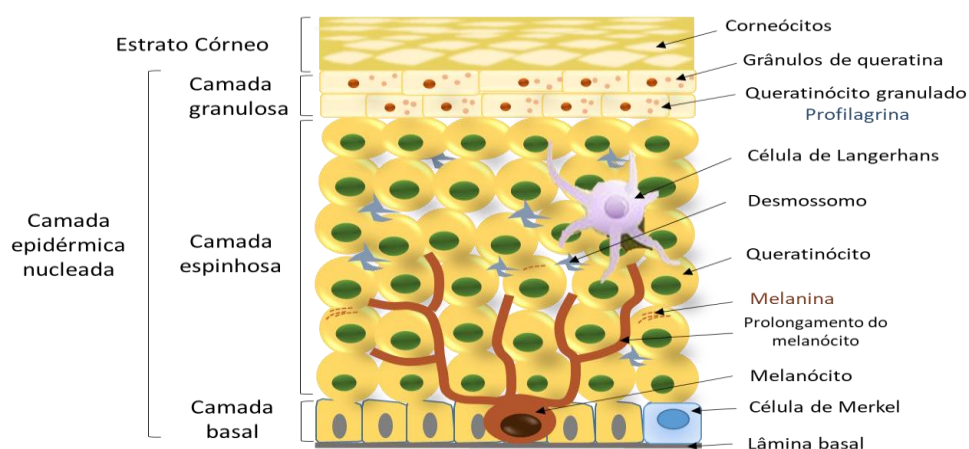


Figura 2 - Camadas da epiderme e seus constituintes celulares. A epiderme é dividida em estrato córneo (camada mais externa) composta de corneócitos e uma camada epidérmica nucleada subdividida em camada granulosa, espinhosa e basal. Seus principais constituintes celulares são os fibroblastos, queratinócitos, melanócito, célula de Langerhans, célula de Merkel. Fonte: a autora.

A epiderme compõe a primeira linha de defesa do organismo contra agentes externos e sua principal função é proteger a pele de ameaças ambientais potencialmente perigosas. O estrato córneo compreende a barreira física da pele. Os lipídeos, ácidos, enzimas hidrolíticas, peptídeos microbianos e macrófagos constituem a barreira química/bioquímica da pele e os constituintes humoral e celular do sistema imune a barreira imunológica da pele (BARONI et al., 2012; PROKSCH, BRANDNER & JENSEN, 2008)

A camada epidérmica é constituída em cerca de 80% por queratinócitos, que se proliferam do estrato basal movendo-se até o estrato granuloso, onde se diferenciam em corneócitos compondo o estrato córneo. Os queratinócitos sintetizam e expressam diferentes proteínas estruturais e lipídeos durante sua maturação (Figura 3). A fase final da diferenciação dos queratinócitos está associada com mudanças importantes em sua estrutura até sua transformação em grandes células anucleadas, os corneócitos do estrato córneo (BOUWSTRA & PONEC, 2006; BROHEM et al., 2011; WICKETT & VISSCHER, 2006).

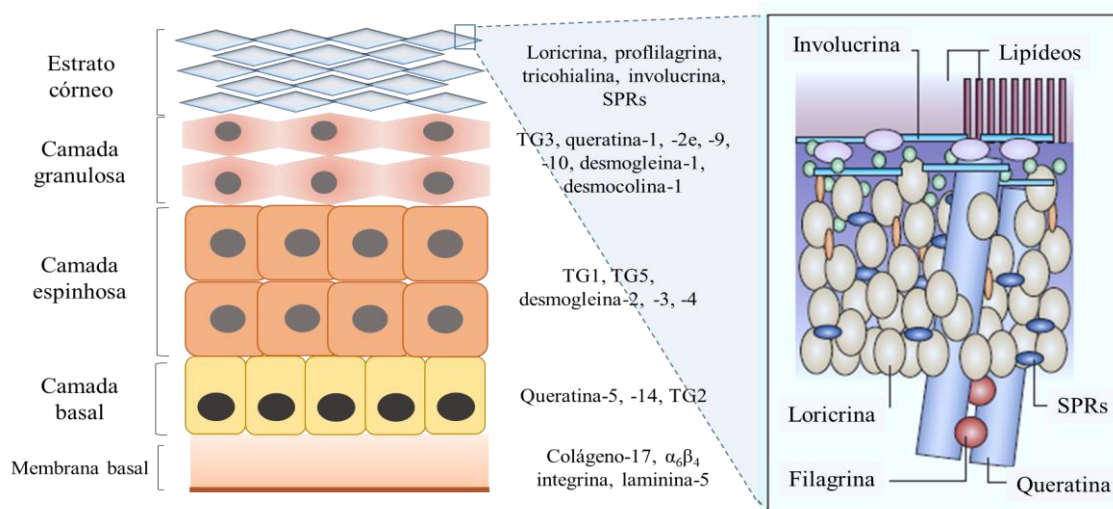


Figura 3 - Diferenciação dos queratinócitos e expressão de proteínas na epiderme. As proteínas que são expressadas em locais na epiderme durante a diferenciação estão envolvidas com o processo de cornificação. A nível molecular, a camada córnea é formada por proteínas que possuem alta afinidade por transglutaminases (TG), com lipídeos específicos na parte externa, para garantir as propriedades físicas específicas da pele. SPR, proteínas pequenas ricas em prolina; TG, transglutaminases. Adaptado de Candi, Schmidt & Melino (2005).

A diferenciação epidérmica inicia com a migração dos queratinócitos da membrana basal e finaliza com a formação da camada cornificada. As mudanças estruturais dos queratinócitos até a fase de corneócitos, envolve também a formação de filamentos de queratina, invólucro celular composto de proteínas reticuladas ou proteínas de invólucro cornificadas, bem como, um envelope lipídico covalentemente ligado. Além disso, os desmossomos, que interconectam queratinócitos adjacentes, são importantes para a coesão célula-célula nas camadas da epiderme viável ou nucleada e são essas estruturas eliminadas durante o processo de descamação (BARONI et al., 2012; CANDI, SCHMIDT & MELINO, 2005).

No estágio terminal de diferenciação, os polipeptídeos de filagrina, uma proteína de matriz presente no interior dos queratinócitos no estrato granuloso, agregam o citoesqueleto de queratina para formar uma densa matriz lipídica/protéica reticulada por transglutaminases que formam o envelope celular cornificado, o qual contribui para as propriedades biomecânicas do estrato córneo, prevenindo a perda de água epidérmica e impedindo a entrada de alérgenos, produtos químicos tóxicos e organismos infecciosos na pele. A reticulação inclui a participação de proteínas estruturais, como involucrina, loricrina, trico-hialina, dentre outras (ANDERSON, 2014; CANDI, SCHMIDT & MELINO, 2005; STEINERT & MAREKOV, 1995).

Os principais produtos protéicos estruturais envolvidos na proliferação dos queratinócitos basais são as queratinas. Esses produtos se agrupam em filmes intermediários e, juntamente com as tubulinas e microfilamentos de actina, formam o citoesqueleto de células epiteliais. As queratinas são classificadas em tipo I (ácidas) ou tipo II (neutras à básicas), elas se ligam aos pares para formar filamentos intermediários de acordo com o estágio de diferenciação dos queratinócitos. Por exemplo, pares de queratinas 5 e 14 são encontradas no

estrato basal, enquanto pares de queratinas 1 e 10 estão presentes na camada de células suprabasais como esquematizado na figura 4.

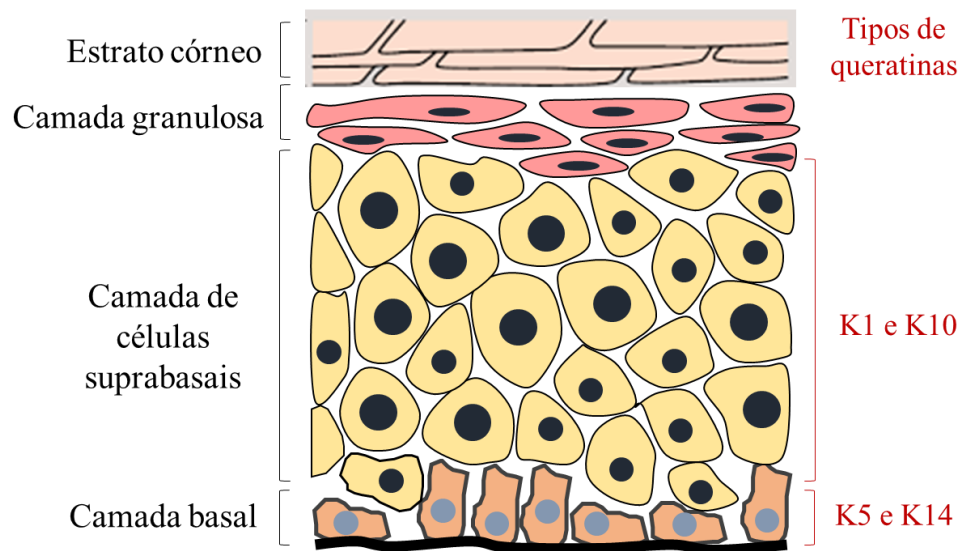


Figura 4 - Camadas da epiderme e os tipos de queratinas produzidas. Na camada epidérmica as queratinas 1 (K1) e 10 (K10), queratinas 5 (K5) e 14 (K14) são produzidas na camada suprabasal e basal, respectivamente. Fonte: a autora.

Em locais específicos, quantidades significativas de queratinas são expressas, tais como queratina 9 nas palmas das mãos e solas dos pés, e queratina 2e em locais espessos. Em um estágio mais avançado, as células adquirem grânulos de queratohialina, que contém profilagrina, citada anteriormente como precursor da proteína interfilamentar filagrina. No processo de queratinização, a filagrina agrega filamentos de queratina em feixes compactados promovendo o colapso da célula em uma forma achatada, característica dos corneócitos da camada cornificada (CANDI, SCHMIDT & MELINO, 2005).

Os queratinócitos são as células mais abundantes da epiderme. Contudo, outros tipos importantes de células podem ser encontrados como nas células de Langerhans (elementos imunocompetentes), células de Merkel (constituem o sistema nervoso sensorial da pele), melanócitos (produtores de grânulos de pigmento chamados melanossomos contendo melanina

que protege a pele contra a radiação ultravioleta e dar cor a pele), leucócitos e linfócitos (BARONI et al., 2012; HOLÍKOVÁ et al., 2001; WICKETT & VISSCHER, 2006).

2.1.2 Membrana basal: junção dermo-epidérmica

O estrato basal da epiderme está intimamente relacionado com a derme através de um sistema de conexões de fibras proteicas que constituem a membrana basal, responsável pela ancoragem da camada epidérmica ao tecido conjuntivo solto da derme. A membrana basal é constituída, principalmente, de colágeno IV, laminina, proteoglicanos e glicosaminoglicanos, bem como, fatores de crescimento com amplas funções biológicas (BALASUBRAMANI, KUMAR & BABU, 2001; BROHEM et al., 2011; IOZZO, 2005).

A membrana basal dermo-epidérmica atua controlando a passagem de moléculas bioativas em ambas direções, através da ligação a uma variedade de citocinas e fatores de crescimento, representando um reservatório controlado fundamental para o remodelamento fisiológico e reparo da pele. Em situações patológicas como inflamação ou câncer, o aumento da liberação de fatores decorrentes da destruição da membrana basal contribui para a ativação da reação no estroma (IOZZO, 2005; MUELLER & FUSENIG, 2004).

2.1.3 Derme: componentes estruturais e células

A derme corresponde à estrutura abaixo da epiderme, com cerca de 15-40 vezes maior tamanho comparada a esta. Ela é formada basicamente por três camadas: papilar, subpapilar e reticular (Figura 5). A camada papilar projeta-se entre as cristas epidérmicas e é constituída de fibras, nervos sensoriais terminais e possui rica suplementação com capilares sanguíneos. A camada subpapilar subjacente possui os mesmos componentes da camada papilar. Por fim, a

camada reticular representa a maior parte da derme e é constituída de denso tecido conectivo de fibras. A parte mais baixa encontra-se em contato com a camada de gordura subcutânea (SHIMIZU, 2016).

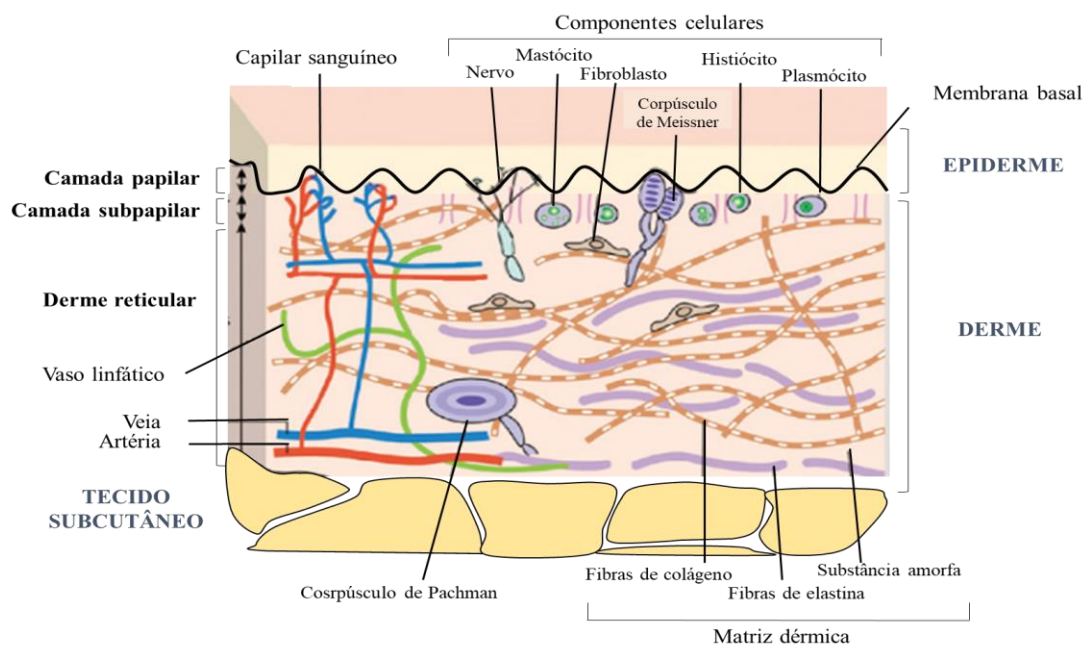


Figura 5 - Derme: componentes estruturais e celulares. A derme é formada basicamente por três camadas: papilar, subpapilar e reticular. Suas funções incluem o fornecimento de energia e nutrição para a epiderme, além de força considerável à pele em virtude do arranjo de sua matriz dérmica. Adaptado de Shimizu (2016).

A derme é composta de tecido fibroso e matriz dérmica, ela é responsável por fornecer energia e nutrição à epiderme e confere força considerável à pele em virtude do arranjo de suas fibras de colágeno. As fibras de colágeno, principalmente tipo I são os maiores componentes da derme, representando cerca de 80% do seu peso. Em menor quantidade tem-se fibras de elastina, fibras reticulares e matriz. Fibroblastos, macrófagos, mastócitos, plasmócitos, células endoteliais e nervos compõem a derme. Vasos sanguíneos, linfáticos, nervos glândulas sebáceas e folículos pilosos também estão presentes (BROHEM et al., 2011; SHIMIZU, 2016).

As principais células da derme são os fibroblastos, responsáveis pela produção de colágeno, fibras e de uma substância gelatinosa, a substância amorfa, na qual os elementos dérmicos estão mergulhados. A substância amorfa ou substância amorfa fundamental permite

a adesão de diversos componentes do meio extracelular, é basicamente constituída de glicosaminoglicanos incluindo ácido hialurônico, sulfato de dermatan ou condroitino sulfato B, sulfato de heparana, sulfato de condroitina e sulfato de queranato (BARBOSA, 2011).

As fibras de colágeno que compõem a derme apresentam pouca extensibilidade, entretanto, são extremamente fortes e resistentes a tensão aplicada paralelamente às fibras, essas características são importantes na manutenção da força dinâmica da pele. Quando as fibras de colágeno são produzidas e ocorre a maturação da derme, os fibroblastos interrompem suas atividades e tornam-se fibrócitos (WONG, MCGRATH & NAVSARIA, 2007).

2.1.4 Hipoderme: Tecido adiposo subcutâneo

Os adipócitos são as células que compõem majoritariamente o tecido adiposo e são responsáveis pelo armazenamento de lipídeos na forma de triacilglicerol, necessários para o fornecimento de energia ao corpo. Na hipoderme, é possível encontrar também células inflamatórias (macrófagos), do sistema imune (leucócitos, linfócitos), pré-adipócitos e alguns fibroblastos. Além disso, são encontrados constituintes não celulares que compreendem tecido conectivo, tecido vascular e neural (IBRAHIM, 2009).

O tecido adiposo, não apenas deve ser considerado o local passivo de armazenamento de lipídeos, mas também desempenha funções metabólicas e endócrinas complexas. Entre os produtos endócrinos produzidos pelo tecido adiposo estão: o fator de necrose tumoral- α , a interleucina-6, a proteína estimulante de acilação e a leptina. Os produtos liberados neste tecido podem contribuir para a regulação da produção hepática de insulina, alteração no desacoplamento de proteína 3 expressa no músculo esquelético, dentre outras ações (COELHO, OLIVEIRA & FERNANDES, 2013; KERSHAW & FLIER, 2004).

2.2 Segurança de cosméticos e medicamentos

A segurança é definida como ausência razoável de risco de lesão significativa em condições de uso previsíveis, ou seja, é a probabilidade do produto de não provocar danos significativos aos usuários. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) exige que os fabricantes desses produtos apresentem dados sobre eficácia e segurança em ensaios pré-clínicos, através do controle da toxicidade do produto final e dos seus ingredientes, para dar prosseguimento aos ensaios clínicos em humanos (BRASIL, 2012; ROMANOWSKI; SCHUELLER, 1996).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária define cosméticos, bem como, produtos de higiene pessoal e perfumes, como substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, com uso exclusivo para limpeza, perfumaria e alteração da aparência e ou correção de odores, proteção ou manutenção de seu bom estado (BRASIL, 2015a).

Assim como outros produtos que promovem a saúde, os cosméticos podem oferecer riscos quanto ao seu uso e desencadear reações adversas como irritação (ardor, prurido e até mesmo destruição do tecido), sensibilização (reação alérgica envolvendo a resposta imunológica imediata ou tardia), sensações de desconforto (ardência, dor, pinicação) e/ou efeito sistêmico (quando atingem a corrente sanguínea e se espalham para outras partes do corpo) (BRASIL, 2012; CHIARI et al., 2012).

O controle da toxicidade do produto final cosmético e de seus ingredientes antes da sua disponibilização no mercado é necessário para garantir sua segurança, especialmente a longo prazo, visto que são utilizados por longos períodos pelo consumidor e são de livre acesso (ANVISA, 2004; BRASIL, 2016; CHORILLI et al., 2007)

Segundo a legislação sanitária brasileira, a empresa é responsável pela segurança do produto cosmético e deve possuir dados comprobatórios que atestem sua segurança, garantindo que estes não oferecem risco à saúde quando utilizados conforme instruções de uso. Com isso, testes toxicológicos são requeridos para avaliação da segurança (BRASIL, 2015a).

Dentre os ensaios toxicológicos, seis são considerados mínimos para atestar a segurança do produto cosmético: toxicidade sistêmica aguda, corrosividade e irritação dérmica, sensibilização cutânea, absorção/penetração cutânea, doses repetidas e mutagenicidade/genotoxicidade. Os testes para avaliar toxicidade aguda e subcrônica, irritação ocular, irritação de mucosas, efeitos tóxicos pela radiação ultravioleta, carcinogenicidade, teratogenicidade, bem como, toxicocinética e toxicodinâmica, ficam sujeitos a avaliação de acordo com o tipo de produto a ser testado (BRASIL, 2012; SCCS, 2016).

Os métodos empregados para atestar a segurança dos cosméticos incluem testes *in vivo* e *in vitro*. Os estudos *in vivo* permitem a investigação de efeitos adversos tóxicos a um animal após aplicação através de uma via de exposição (oral, inalatória ou tópica). Já os testes *in vitro*, são considerados métodos alternativos validados ao uso de animais, cujo objetivo é avaliar o potencial irritativo, alergênico e sistêmico do cosmético testado (CHORILLI & SCARPA, 2007).

Segundo o Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos da ANVISA (2012), são consideradas metodologias *in vivo* os testes para avaliação de toxicidade aguda oral, irritação/corrosividade ocular e cutânea, irritação primária, irritação acumulada, sensibilização dérmica, testes de irritação da mucosa oral, vaginal e peniana, e os testes de comedogenicidade (eritema, edema e presença ou ausência de comedões ou cravos como são conhecidos no Brasil). Todos estes testes utilizam animais de experimentação para avaliação do risco. Entretanto,

diversos aspectos devem ser considerados para que sejam realizados, incluindo o aspecto ético destes animais e aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais.

Medicamento é definido como todo produto farmacêutico, tecnicamente obtido ou elaborado, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico. Para obtenção de seu registro e, assim sua comercialização e disponibilização à população, o medicamento deve passar por vários testes não-clínicos e clínicos para assegurar sua segurança e eficácia para uso humano (ANVISA, 2013; BRASIL, 2015b).

Os estudos não-clínicos são aqueles que precedem os estudos clínicos. Eles incluem métodos *in vivo* com animais e *in vitro* por meio de testes alternativos validados e aceitos internacionalmente para atestar a segurança do novo medicamento. A ANVISA elaborou um Guia para condução destes estudos baseado em documentos de agências reconhecidas, como Food and Drug Administration (FDA), Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), diretrizes da Organização Mundial da Saúde, dentre outros (ANVISA, 2013).

Os estudos não-clínicos propostos pela ANVISA incluem: estudos de toxicidade de dose-única (aguda), toxicidade de doses repetidas, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade (dano ao DNA), tolerância local e carcinogenicidade além de estudos de interesse na avaliação da segurança farmacológica e toxicocinética. Outros estudos também podem ser testados para avaliar a segurança e deverão ser avaliados pelos órgãos competentes de vigilância (ANVISA, 2013).

Além da ANVISA, diversos órgãos e instituições vêm elaborando guias e diretrizes com a intenção de racionalizar os estudos não clínicos, de forma a evitar duplicidade e a utilização desnecessária de animais sem comprometer a qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos. O Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, CONCEA, publicou em 2016 a

Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica com a finalidade de apresentar os princípios e as condutas que garantam o cuidado e manejo eticamente correto dos animais de experimentação (CONCEA, 2016).

2.2.1 Genotoxicidade e análises toxicológicas envolvendo alterações no DNA

Estudos indicam que variações interindividuais em resposta a agentes químicos externos (xenobióticos) são definidas por diferenças genéticas, e que o principal risco antecipado à nível genômico é a mutagênese ou dano físico ao DNA (genotoxicidade). A genotoxicidade é um processo no qual um agente interage com o DNA ou outro alvo celular que controla a integridade do material genético. Isso inclui a indução de adutos de DNA, quebras nas fitas de DNA, pontos de mutação, mudanças numéricas ou estruturais nos cromossomos (ANVISA, 2013; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008; SZYF, 2007).

As diretrizes internacionais recomendam uma bateria de testes para avaliar o potencial genotóxico de uma substância, cujo objetivo é detectar os principais danos ao DNA e capacidade da substância em proporcionar alterações no material genético (mutagenicidade). Duas opções de testes são mundialmente consideradas: a opção 1 consiste em um ensaio de AMES (um teste para mutação de genes em bactérias), um teste citogenético *in vitro* para avaliar dano cromossômico ou um ensaio de mutação do gene Tk de linfoma de camundongo e um teste *in vivo* para dano cromossômico em células hematopoiéticas de roedores; a opção 2 consiste em um ensaio de AMES e um teste *in vivo* de genotoxicidade em dois tecidos diferentes (FRÖTSCHL, 2015; PFUHLER et al., 2010).

Dos métodos alternativos existentes para avaliação da genotoxicidade, apenas o teste do micronúcleo *in vitro* em células de mamíferos é reconhecido pela OECD. Nesse teste, os

micronúcleos são detectados no citoplasma de células interfásicas. Os micronúcleos podem ter origem nos fragmentos de cromossomos acêntricos (sem centrômero, efeito clastogênico), ou de cromossomos inteiros que são incapazes de migrar para os pólos durante a anáfase da divisão celular (efeito aneugênico). O teste do micronúcleo é capaz de detectar substâncias com atividades clastogênicas e aneugênicas em células que sofreram divisão celular durante ou após a exposição à substância (OECD TG 487, 2016).

Na prática, o dano ao DNA recorrente da ruptura de sua cadeia é medido pelo ensaio do cometa, cujo princípio baseia-se na formação de uma cauda no nucleóide (cometa) em decorrência da quebra das fitas do DNA após submissão a uma eletroforese em gel de agarose. É um teste de eletroforese de célula única que detecta danos ao DNA expressos como quebra de fita simples e fitas duplas (FRÖTSCHL, 2015).

Muitas publicações de ensaios de validação do teste do cometa estão disponíveis atualmente. O Comitê de Coordenação Interinstitucional sobre Validação de Métodos Alternativos (ICCVAM) juntamente com o Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos (ECVAM), mostraram que os ensaios do cometa *in vivo* utilizando protocolos padrão internacionalmente recomendados apresentam resultados confiáveis, reprodutivos e fornecem uma base sólida para a OECD elaborar diretrizes técnicas (EFSA, 2012; FDA, 2012; FRÖTSCHL, 2015; VASQUEZ, 2012).

Em 2014, a OECD reconheceu o ensaio do cometa alcalino *in vivo* em células de mamíferos como um método validado para detectar genotoxicidade de substâncias químicas. Contudo, ele inclui a utilização de roedores nos ensaios e não é um teste totalmente *in vitro*. Com isso, a melhoria dos atuais métodos de ensaio de genotoxicidade *in vitro* oferece apoio à utilização de uma estratégia de ensaios alternativos ao uso de animais (OECD TG 489, 2014).

A natureza dinâmica do epigenoma e sua responsividade às múltiplas vias de sinalização celular, sugere que ela é potencialmente vulnerável aos efeitos de xenobióticos, não apenas durante o período crítico de desenvolvimento, mas também ao longo da vida. Estudos evidenciam que os agentes não genotóxicos podem afetar a função dos genes através de mecanismos epigenéticos de forma estável e a longo prazo com consequências que podem ser indistinguíveis dos efeitos dos danos físicos ao DNA. Esses efeitos podem ser transmitidos geneticamente, justificando a necessidade da utilização de testes para avaliar a segurança de xenobióticos por mecanismos não-genotóxicos (ANWAY et al., 2005; FERREIRA et al., 2011).

O ensaio do cometa pode ser facilmente adaptado para a medição da metilação global do DNA. Este processo não é apenas importante para manter a estabilidade do genoma, mas também desempenha um papel importante na regulação genética. A metilação do DNA é um evento epigenético que envolve a modificação química do DNA onde a sequência do DNA não é alterada (BIRD, 2002; NAGANDSMERDON, 2009).

O epigenoma consiste na cromatina e suas modificações, bem como uma modificação covalente pela metilação de anéis de citosina encontrados na sequência dinucleotídica CG. Estudos de metilação têm surgido como um importante campo de pesquisa em muitas doenças, se não todas, uma vez que a alteração do padrão de metilação do DNA pode modificar dramaticamente a transcrição gênica (OLIVEIRA et al., 2010).

A metilação do DNA consiste em uma modificação covalente de um grupamento metil (CH_3) que é transferido as S-adenosilmetionina para o carbono 5 de uma citosina (5-MeC) que geralmente precede uma guanina (CpG), pela ação uma família de enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMT). Os resíduos de CpG aparecem espalhados pelos genomas eucariotos ou agrupados em ilhas (ilhas com cerca de 200 pares de bases no DNA com cerca de 60% de

dinucleotídeos CpG). A maioria dos dinucleotídeos CpG espalhados está metilada, ao contrário das ilhas CpG que encontram-se desmetiladas. Essas ilhas normalmente são regiões promotoras de alguns genes, incluindo genes de reparo, silenciadores oncogênicos, genes envolvidos no controle da proliferação celular, diferenciação e desenvolvimento normal, bem como na impressão parentérica, inativação cromossômica X e preservação da integridade cromossômica por silenciamento de transposons e elementos repetitivos (MORGAN et al., 2004; STEFANSKA; VINKEN; SZYF, 2012; SZYF, 2007).

Alterações no padrão de metilação podem levar a perda da função de um gene e ser muito mais frequente que a mutação genética. A adição do radical metil pode inibir a transcrição gênica por impedir a ligação de fatores de transcrição nessas regiões. Em contrapartida, a desmetilação leva ao aumento de transcrição gênica. Estudos indicam que alguns xenobióticos podem interferir nas enzimas de metilação interrompendo a organogênese normal e a especificidade do tecido. Essa influência pode ter resultados teratogênicos ao direcionar mecanismos cruciais ou efeitos moduladores da metilação do DNA indetectáveis por um longo período. Isso reforça ainda mais a necessidade de estudos que possam evidenciar alterações no DNA decorrentes da metilação (DOLINOY, JIRTLE & CAROLINA, 2008; SOUBRY et al., 2013, 2015; STEFANSKA, VINKEN & SZYF, 2012).

Alguns estudos epigenéticos com abordagem farmacológica mostram que algumas substâncias podem alterar o padrão de metilação aberrante. Como exemplo, as substâncias 5-azacitidina e decitabina já aprovados pelo FDA são dois agentes desmetilantes (inibidores da enzima de metilação) utilizados em ensaios clínicos tanto de leucemias quanto de tumores sólidos. É evidente a relação da metilação com o câncer, contudo é crescente o interesse desse evento associado a outras doenças ou distúrbios (CHUANG et al., 2005; LYKO; BROWN, 2005; MEJOS et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2010; SOUBRY et al., 2013, 2015).

2.3 Métodos alternativos ao uso de animais em experimentação

Um conjunto de ensaios *in vitro* é sugerido pela ANVISA em substituição ao uso de animais de laboratórios como métodos alternativos para avaliar a segurança de medicamentos e cosméticos. No Brasil, a responsabilidade de monitorar e avaliar a introdução dos testes alternativos que substituam os animais em atividade de ensino e pesquisa é do CONCEA. No ano de 2014, este reconheceu dezessete métodos alternativos validados para análise toxicológica desses produtos farmacêuticos (Tabela 1). Todos os métodos contemplam protocolos publicados nas diretrizes para testes de químicos da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (CONCEA, 2015; OECD, 2015).

Tabela 1 – Métodos alternativos ao uso de animais reconhecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal em 2014. Adaptado de CONCEA (2015).

Desfecho a ser avaliado	Método alternativo reconhecido pelo CONCEA em 2014	Protocolo
Irritação e corrosão	Corrosão dérmica <i>in vitro</i> : Teste de resistência elétrica transcutânea	OECD 430
	Corrosão dérmica <i>in vitro</i> : Teste da epiderme humana reconstruída	OECD 431
	Teste de barreira de membrana <i>in vitro</i>	OECD 435
	Teste de irritação cutânea <i>in vitro</i> .	OECD 439
Irritação e corrosão ocular	Teste de permeabilidade e opacidade de córnea bovina	OECD 437
	Teste de olho isolado de galinha	OECD 438
	Teste de permeação de fluoresceína	OECD 460
Sensibilização cutânea	Sensibilização cutânea: Ensaio do linfonodo local	OECD 429
	Versões não radioativas do Ensaio do linfonodo local	OECD 442A e 442B
Toxicidade aguda	Toxicidade aguda oral – Procedimento de doses fixas	OECD 420
	Toxicidade aguda oral – Classe tóxica aguda	OECD 423
	Toxicidade aguda oral – Procedimento “Up and Down”	OECD 425
	Estimativa da dose inicial para teste de toxicidade aguda oral sistêmica	OECD 129
Genotoxicidade	Teste do micronúcleo em célula de mamífero <i>in vitro</i>	OECD 487

Os métodos alternativos reconhecidos são validados por centros internacionais de validação conforme guias da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico e destinam-se à substituição total, parcial ou redução do uso de animais. Sendo assim, a abrangência de cada método deve ser respeitada conforme especificações. O CONCEA estabeleceu ainda o prazo de cinco anos, contados a partir de 2014, como limite para a substituição obrigatória do método original com animais pelo método alternativo (CONCEA, 2015).

Com o intuito de auxiliar e incentivar os pesquisadores e instituições a desenvolverem e validarem os ensaios alternativos, o Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) estabeleceu a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA) através da Portaria Nº 491, de 03 de julho de 2012. A criação da rede tem por objetivo: estimular a implantação dos ensaios alternativos, monitorar periodicamente os laboratórios, promover a qualidade dos testes, incentivar a implementação do sistema de qualidade e das boas práticas de laboratório e contribuir para o desenvolvimento, validação e certificação de novos métodos alternativos ao uso de animais em experimentação (MCTI, 2012).

Um dos métodos utilizados como alternativa ao uso de animais é a cultura de tecidos, células ou organismos inferiores. Estes testes incluem diversos tipos de culturas celulares (pele, tumores, fígado, mama, dentre outros) e são capazes de avaliar citotoxicidade de substâncias, mecanismos de ação celular, genotoxicidade, dentre outros. Atualmente, o método mais utilizado em pesquisa científica é a cultura em monocamada ou bidimensional. Contudo, novos métodos vêm surgindo com o intuito de se aproximar mais ainda do que ocorre *in vivo*. Um exemplo, é a pele artificial ou equivalente epidérmico/dérmico ou pele humana reconstruída desenvolvida em cultura tridimensional (PADRÓN et al., 2000; RIVERA, 2001).

2.4 Pele humana reconstruída

In vivo, as células que compõem os tecidos e órgãos desenvolvem-se e multiplicam-se em uma estrutura tridimensional. Com isso, o desenvolvimento de modelos de pele humana reconstruída *in vitro* torna-se um importante meio para mimetizar o microambiente de tecidos vivos. Desde 1970, diversos modelos vêm surgindo com uma variedade de aplicações. As peles atualmente disponíveis podem ser categorizadas em três grupos: aquelas que substituem a camada epidérmica apenas, aquelas que fornecem um substituto dérmico, e um pequeno número que fornecem ambas (DESHMUKH et al., 2012; KOJIMA et al., 2014; MACNEIL, 2007; OECD, 2000, 2015).

Os substitutos de pele humana podem ainda ser classificados segundo sua composição e estrutura em três classes: I, II e III. A classe I inclui peles temporárias e com materiais impermeáveis destinada aos estudos de função barreira contra bactérias e perda de água (Opsite[®], Hydrofilm[®], Nexfill[®], Transcyte[®]). A classe II inclui peles simples que mimetizam somente a epiderme (Epidex[®]) ou a derme (OASIS Wound Matrix[®], Matriderm[®], PriMatriz[®], Alloderm[®]). A classe III inclui peles complexas (enxertos de pele, Integra[®], Biobrane[®], Orcel[®], Apligraf[®],) constituídas de uma camada epidérmica de queratinócitos humanos cultivados sobre uma camada dérmica de fibroblastos embebidos em colágeno (BALASUBRAMANI; KUMAR; BABU, 2001; FERREIRA et al., 2011).

Os fibroblastos têm um papel muito importante no desenvolvimento da pele tridimensional. Eles, estimulam a proliferação dos queratinócitos e produzem fatores de crescimento chaves para indução da diferenciação epidérmica. Assim, as peles que apresentam fibroblastos fisiologicamente ativados obtêm um microambiente adequado para regeneração epidérmica e morfogênese ótimas (BOEHNKE et al., 2007; GREEN & YAMADA, 2007).

Um ponto a ser considerado no desenvolvimento de uma pele artificial *in vitro*, é a contração do colágeno na presença dos fibroblastos em virtude do longo período que a pele leva para ser formada, em torno de 11 dias. A contração do colágeno depende da quantidade de fibroblastos e do tempo de cultivo. É decorrente da reorganização do tecido durante sua formação (GRINNELL, 2000).

A células quando cultivadas *in vitro*, são mantidas em meios de cultura ricos em nutrientes capazes de permitir seu desenvolvimento. Na montagem da pele artificial não é diferente, para que haja a formação completa da pele, o meio de cultura é suplementado com diversos aditivos, incluindo soro fetal bovino, vitaminas, minerais, hormônios e fatores de crescimento como mostrado na Tabela 2 (BOUWSTRA et al., 2008; FRANKART et al., 2012).

Tabela 2 – Fatores de crescimento utilizados como aditivos para formação da pele artificial *in vitro*. Adaptado de (PEDROSA, 2016).

CLASSIFICAÇÃO	SUBSTÂNCIA	FUNÇÃO	REFERÊNCIA
PROTEÍNAS E HORMÔNIOS	Epidermal growth fator (EGF)	Promove mitose, acelera a migração dos queratinócitos e sua adesão aos componentes da membrana e induz contração.	(HASSKARL, 2006; WOODLEY, WYNN & KEEFE, 1990)
	Transforming growth fator- α (TNF- α)	Função similar ao EGF, mas é mitógeno mais potente	(ABDEL-NASER et al., 2005)
	Keratinocyte Growth Factor (KGF)	Promove a proliferação e diferenciação dos queratinócitos	(KORIA; ANDREADIS, 2007)
	Insulina	Auxilia no metabolismo lipídico e da glicose, captação de aminoácidos, síntese de DNA	(BAE; PARK; KIM, 2014; KEENAN, PEARSON & CLYNES, 2006)
	Transferrina	Auxilia no transporte de ferro, na redução nos níveis tóxicos de Espécies Reativas de Oxigênio que podem ser gerados pelo ferro proteico não-ligado	(KEENAN, PEARSON & CLYNES, 2006; MAINZER et al, 2014; TAKAGI et al., 2011)
	Hidrocortisona	Promove a proliferação dos queratinócitos	(TAKAGI et al., 2011)
AMPC OU MODIFICADORES DOS NÍVEIS DE AMPC	Toxina colérica/ Isoprotenerol	Promovem o crescimento e aumentam o tamanho das colônias e induzem diferenciação	(HOLBROOK & HENNINGS, 1983)
VITAMINA	Ácido Ascórbico	Induz a secreção e organização da matriz extracelular (MEC) do estrato córneo e melhora a função barreira da epiderme	(AUXENFANS et al., 2009; PASONEN-SEPPÄNEN et al., 2001)
SORO	Soro Fetal Bovino (SFB)	Estimula a diferenciação de células e estratificação	(LAMB; AMBLER, 2013)

A aplicação de peles humanas reconstruídas é muito diversificada e envolve a área farmacêutica, química, cosmética, toxicológica, dentre outras. O Centro Europeu para Validação de Métodos Alternativos aos Testes em Animais (European Centre for the Validation of Alternative Methods to Animal Testing - ECV AM) aprovou os modelos de pele humana reconstruída como cientificamente válidos e são aceitos para prever corrosão da pele, irritação e permeação cutânea. Estudos vem sendo realizados e, em breve, serão validados para prever genotoxicidade, sensibilização cutânea e fototoxicidade da pele a substâncias (DESHMUKH et al., 2012; KOJIMA et al., 2014; OECD, 2015).

Entre os métodos alternativos *in vitro* validados propostos recentemente, aqueles que usam pele humana reconstruída constituem uma abordagem promissora para esses tipos de ensaios, uma vez que, além de mimetizar o local da aplicação do produto, permitem a aplicação tópica e a avaliação de algumas reações clínicas. O uso de pele humana reconstruída, permite a aplicação tópica de substâncias com problemas de solubilidade e estabilidade química em solução aquosa, umas das principais limitações de muitos métodos *in vitro* baseados na utilização de culturas submersas (GIBBS et al., 2013; ROGUETE et al., 2000).

2.5 Necessidade do desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais em experimentação utilizando pele humana reconstruída

A substituição dos testes em animais tem sustentação na política dos 3R's, refinamento, redução e substituição (do inglês refinement, reduction e replacement), proposto por William Russel e Rex Bursh em 1959 no livro *Principles of Humane Experimental Technique*. O termo refinamento tem sido empregado com o intuito de modificar algum procedimento animal objetivando diminuir a dor e o estresse animal e, assim, garantir as melhores condições para os

animais. A concepção de redução visa a utilizador do menor número possível de animais para obter o mesmo resultado ou maximização da informação obtida por animal. Por fim, o termo substituição relaciona-se a utilização de métodos alternativos, como obtenção de células, tecidos ou organismos, para estudos *in vitro* ao invés do sacrifício de animais (BRASIL, 2012; RUSSELL; BURCH, 1959).

Ratos, camundongos e coelhos estão entre as espécies animais mais utilizadas para avaliação da toxicidade de medicamentos e cosméticos. As vantagens da utilização desses animais incluem o pequeno tamanho, manuseio simples e custo relativamente baixo. Contudo, existem diferenças entre a organização estrutural da pele do camundongo, pele murina que mais se assemelha com a humana, e a humana (BROHEM et al., 2011).

Em comparação à pele humana, uma das grandes diferenças da pele murina é a alta densidade de folículos pilosos presentes. Além disso, a derme do murino adulto é fina e a epiderme apresenta apenas 3 camadas, com uma alta taxa de rotatividade, enquanto a derme humana é bastante espessa e a epiderme geralmente apresenta 6-10 camadas de espessura (como mostrado na Figura 6). Os melanócitos dos murinos residem próximos aos folículos pilosos, enquanto os da pele humana são encontrados na membrana basal (BROHEM et al., 2011; GODIN & TOUITOU, 2007).

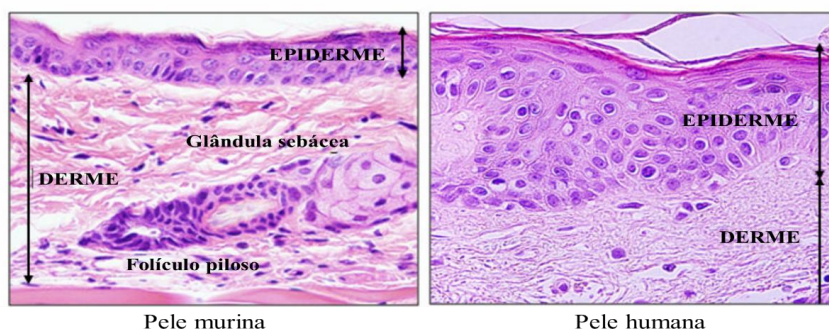


Figura 6 – Microscopia óptica evidenciando as diferenças entre a pele murina e a pele humana. Enquanto a derme murina é menos espessa e a derme é composta basicamente de três camadas, a pele humana é mais espessa e a derme é constituída de 6 a 10 camadas de espessura. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento 60x. Adaptado de Brohem et al. (2011).

Em termos funcionais, estudos demonstram que as peles dos murinos não são capazes de mimetizar a formação dos queloides como em humanos, em vez disso, feridas foram encontradas na pele animal com ausência da proliferação aumentada de fibroblastos, o que difere da pele humana com queloides. A função do epitélio também é diferente, a pele do rato e do camundongo possui menor função barreira à água e absorção percutânea aumentada, limitando os estudos de fármacos com administração tópica (GODIN & TOUITOU, 2007; MENON, 2002).

As culturas em monocamada ou bidimensional apresentam estruturas de sinalização e adesão que podem representar estágios exagerados de situações dinâmicas *in vivo*. Consequentemente, as células podem reagir de forma diferente a perturbações externas quando esse modelo é usado como uma ferramenta para testar respostas de fármacos ou uma função biológica. A utilização de microambientes tridimensionais, como é o caso das pele artificiais, pode poupar tempo e custos a longo prazo ao modelar com mais precisão respostas biológicas que poderiam ocorrer *in vivo* (GREEN & YAMADA, 2007).

Estudos demonstram que a matriz extracelular tridimensional e seus receptores podem promover a polaridade e diferenciação epiteliais normais, fenômeno correlacionado com a natureza tridimensional da pele *in vivo* em que quase todas as células são cercadas por matriz extracelular. Além disso, as células cultivadas em ambientes tridimensionais (fibroblastos e queratinócitos) apresentam morfologias mais próximas do tecido humano *in vivo* em comparação ao modelo convencional de cultivo em monocamada em estrutura bidimensional, 2D (BIRGERSDOTTER, SANDBERG & ERNBERG, 2005; WITTE & JOHN, 2005).

Em relação a avaliação da genotoxicidade, estudos de validação do teste do micronúcleo em peles reconstruídas estão sendo realizados. Contudo, como essas peles são construídas com células primárias que proliferam, as condições de armazenamento durante o transporte podem

afetar a qualidade dos modelos e a consistência dos resultados. Um atraso de um dia, por exemplo, pode comprometer os modelos e também leva à incapacidade de completar o ensaio durante uma semana normal de trabalho (AARDEMA et al., 2010; CURREN et al., 2006; DAHL et al., 2011; MUN et al., 2009).

Poucos são os estudos envolvendo o desenvolvimento de modelos de pele humana reconstruída *in vitro* utilizando totalmente células de cultura permanente. Além disso, apesar de existirem diversos modelos de pele artificiais disponíveis comercialmente, eles são protegidos por patente, seus métodos de produção são secretos e a regulamentação de alguns países pode impedir sua importação. No Brasil, por exemplo, a regulamentação de importação de tecidos vivos é muito rigorosa e impede a disponibilidade e uso desses tecidos visto que todos possuem um tempo de vida útil. Sendo assim, muitas das peles disponíveis comercialmente são caras e inviabiliza sua utilização em laboratórios acadêmicos e privados de países em desenvolvimento (REIJNDERS et al., 2015; WEVER et al., 2015).