

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

MODELO DE PELE HUMANA RECONSTRUÍDA COMO
PLATAFORMA PARA ESTUDOS DE FOTOENVELHECIMENTO

BIANCA DE LIMA ALMEIDA

MANAUS

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

BIANCA DE LIMA ALMEIDA

MODELO DE PELE HUMANA RECONSTRUÍDA COMO
PLATAFORMA PARA ESTUDOS DE FOTOENVELHECIMENTO

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

Orientadora: Profa. Dr^a Marne Carvalho de Vasconcellos

MANAUS

2020

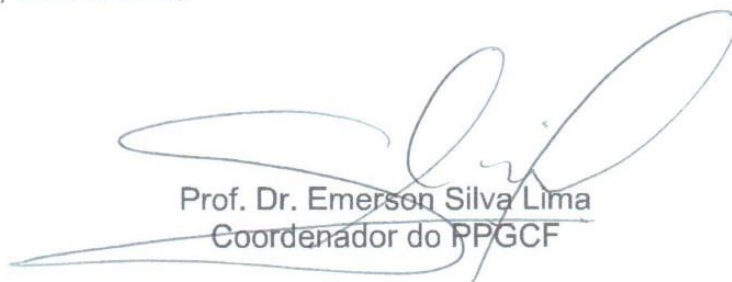
“Modelo de pele humana reconstruída como plataforma para estudos de fotoenvelhecimento”

DISCENTE: BIANCA DE LIMA ALMEIDA

PARECER:


Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, AM, 30/01/2020.



Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Coordenador do PPGCF

A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes professores:



Profa. Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos
Orientadora e presidente da banca



Profa. Dra. Raquel Carvalho Montenegro
Membro externo (UFC)



Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Membro interno (UFAM)

Ficha Catalográfica

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

A447m	<p>Almeida, Bianca de Lima</p> <p>Modelo de pele humana reconstruída como plataforma para estudos de fotoenvelhecimento / Bianca de Lima Almeida . 2020 75 f.: il. color; 31 cm.</p> <p>Orientador: Marne Carvalho de Vasconcellos Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Amazonas.</p> <p>1. pele humana. 2. métodos alternativos. 3. radiação. 4. uvb. I. Vasconcellos, Marne Carvalho de. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título</p>
-------	---

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, pela oportunidade e experiência incrível que me permitiu ter. Do hospital para o mundo experimental, quanto aprendizado!

À minha família, que mesmo de longe me apoiou. Em especial a minha mãe, por não medir esforços em me proporcionar uma boa educação e bons estudos. Pelas horas no telefone, ouvindo meus desabaços e desesperos com o mestrado!

Ao meu marido, Diego, por aguentar todos os meus choros, desde o começo do mestrado, com as disciplinas que pareciam ser impossíveis de passar, o estágio em farmacodinâmica, no qual passei noites em claro estudando e preparando aulas, e todas as lágrimas que derramei até esse projeto dar certo!! Esse teve muitaaaaaa paciência!!

Aos meus amigos de laboratório (Biophar), eu não poderia ter encontrado grupo melhor que esse!! Em especial, Leilane Bentes, Elenn Suzany, Kriscia Parente, Lívia Hilgenberg, Bárbara Janaína que estiveram comigo do começo ao fim e a todos que estiveram presentes em algum momento!

Não poderia faltar um parágrafo especial ao grupo da pele!! Leilane e Elenn, uma vida é pouco para agradecer tanto conhecimento repassado! Sou muito grata!! Vocês me ensinaram tudo, desde a pipetagem ao cometinha!! MUITÍSSIMO obrigada meninas, sem a ajuda de vocês, esse momento não estaria acontecendo!!

À professora Dr^a Marne Carvalho de Vasconcellos, pela oportunidade de ser orientada pela mesma, oportunidade esta que me permitiu adentrar no mundo da cultura de células, pelos conhecimentos repassados e pela contribuição no meu desenvolvimento acadêmico e profissional.

Ao professor Dr. Emerson Silva Lima, por contribuir com conhecimentos, ideias e opiniões relevantes e não medir esforços para desenvolvimento do projeto.

Aos professores que me ajudaram ao longo do mestrado, em especial o professor José Neto.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UFAM) por toda a infraestrutura disponibilizada para realização deste projeto.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

RESUMO

Os efeitos da exposição à radiação ultravioleta na pele humana têm despertado interesse na classe científica, no entendimento das transformações envolvidas. Modelos de pele humana reconstruída *in vitro* foram desenvolvidos como métodos alternativos à utilização de animais em experimentação e mostraram ser ferramentas úteis e eficazes para estudos. Esses modelos expressam diferentes receptores, possuem capacidade proliferativa, síntese de matriz extracelular e funções metabólicas, tornando-se ferramentas de escolha para entender os mecanismos biológicos da pele. Os modelos validados e comercialmente disponíveis são reconstruídos a partir do cultivo de células primárias, enfrentando algumas limitações, quanto a aquisição e reprodução, podendo afetar sua aplicabilidade. Este trabalho teve objetivo de padronizar um modelo de pele humana reconstruída a partir de linhagens de células permanentes e avaliar os efeitos da Radiação Ultravioleta B nesse modelo. Para isso, o trabalho consistiu na padronização do modelo desenvolvido com queratinócitos e fibroblastos humanos de cultivo permanente em um suporte de membrana do tipo *transwell* para posterior exposição à radiação ultravioleta B. Para a padronização, foram testados os tempos de cultivo 10, 15 e 18 dias. Os ensaios de viabilidade celular foram realizados pelo método do MTT e a análise histológica por coloração com hematoxilina e eosina. A condição que melhor representou a estrutura morfológica da pele humana, com epiderme e derme foi a de 10 dias de cultivo. As doses de radiação utilizadas foram 50mJ/cm², 150mJ/cm², 500mJ/cm² e 1500mJ/cm². Nas menores doses houve uma pequena redução na viabilidade celular (50 e 150 mJ/cm²), o oposto ocorreu nas doses de 500 e 1500mJ/cm², apresentando redução da viabilidade em mais de 50%. Os cortes histológicos evidenciaram alteração na camada epidérmica da pele após exposição, de forma dose-dependente, visualizando a diminuição da espessura do epitélio, separação e vacuolização das células na camada epitelial. A atividade proteolítica de MMPs 2 e 9 foi avaliada por método zimográfico. A menor dose de radiação desencadeou atividade genotóxica confirmada, por meio do ensaio cometa em pH alcalino. Diante do exposto, com este trabalho foi possível padronizar um modelo de pele humana reconstruída *in vitro* utilizando linhagem de células permanentes como plataforma de estudos de fotoenvelhecimento por meio de radiação UVB. Experimentos futuros são necessários para avaliar o potencial dos danos causados pela radiação e elucidar os mecanismos envolvidos, bem como o comportamento das células expostas no microambiente tridimensional.

Palavras-chave: pele humana, métodos alternativos, radiação, uvb.

ABSTRACT

The effects of exposure to ultraviolet radiation on human skin have aroused interest in the scientific class, in understanding the transformations involved. Models of human skin reconstructed in vitro were developed as alternative methods to the use of animals in experimentation and proved to be useful and effective tools for studies. These models express different receptors, have proliferative capacity, extracellular matrix synthesis and metabolic functions, becoming tools of choice to understand the biological mechanisms of the skin. The validated and commercially available models are reconstructed from the cultivation of primary cells, facing some limitations in terms of acquisition and reproduction, which can affect their applicability. This work aimed to standardize a model of human skin reconstructed from permanent cell lines and evaluate the effects of Ultraviolet Radiation on this model. To this end, the work consisted of standardizing the model developed with permanent culture human keratinocytes and fibroblasts on a transwell-type membrane support for subsequent exposure to ultraviolet B radiation. For standardization, the cultivation times 10, 15 and 18 days were tested. Cell viability assays were performed using the MTT method and histological analysis by staining with hematoxylin and eosin. The condition that best represented the morphological structure of human skin, with epidermis and dermis, was 10 days of culture. The radiation doses used were 50mJ / cm², 150mJ / cm², 500mJ / cm² and 1500mJ / cm². At the lowest doses there was a small reduction in cell viability (50 and 150 mJ / cm²), the opposite occurred at doses of 500 and 1500mJ / cm², showing a viability reduction of more than 50%. Histological sections showed a change in the epidermal layer of the skin after exposure, in a dose-dependent manner, visualizing the decrease in epithelial thickness, separation and vacuolization of cells in the epithelial layer. The proteolytic activity of MMPs 2 and 9 was assessed using a zymographic method. The lowest radiation dose triggered confirmed genotoxic activity, through the comet assay in alkaline pH. In view of the above, with this work it was possible to standardize a model of human skin reconstructed in vitro using lineage of permanent cells as a platform for photoaging studies using UVB radiation. Future experiments are needed to assess the potential for radiation damage and to elucidate the mechanisms involved, as well as the behavior of cells exposed in the three-dimensional microenvironment.

Keywords: human skin, alternative methods, radiation, uvb.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Estrutura da pele. A estrutura da pele é dividida em três camadas principais, a epiderme, derme e hipoderme. A epiderme é perfurada por poros pelos quais sai o suor e o sebo. A derme é irrigada por vasos sanguíneos, abriga glândulas sebáceas, e as glândulas sudoríparas, responsáveis pela secreção do sebo e do suor, assim como os folículos pilosos. A hipoderme corresponde a camada mais profunda, formada por células gordurosas, os adipócitos. Adaptado de (WELLER et al., 2008)..... 19
- Figura 2** - Estrutura da epiderme. A epiderme é formada por várias camadas (estratos) de células justapostas. A camada córnea, lúcida, granulosa, espinhosa e basal. A camada córnea é formada por células achatadas, não-viáveis, anucleadas e queratinizada. A camada granulosa é formada por células achatadas, nucleadas e com grânulos basófilos. A camada espinhosa é formada por células achatadas e nucleadas, as células de Malpighi. A camada basal é formada por colágeno do tipo IV e proteoglicanos, e povoadas principalmente por células-tronco. Fonte: a autora. 20
- Figura 3** - Células que compõem a epiderme. Os queratinócitos são células predominantemente encontradas na epiderme (90-95% das células), sendo distribuídos em todas as subcamadas. As células de Langerhans (2%), melanócitos (3%) e células de Merkel (0,5%) constituem populações menores de células da epiderme. Fonte: a autora. 24
- Figura 4** - - Espectro solar. O espectro solar é composto por radiações eletromagnéticas com intervalo de comprimento de onda. UVC (100 – 290 nm), UVB (290 – 320 nm), UVA (320 – 400 nm), luz visível (400 – 780 nm) e infravermelho (> 780 nm). Fonte: a autora. 31
- Figura 5** - Exposição à radiação ultravioleta na pele. As radiações ultravioletas são absorvidas pelas camadas da pele de acordo com o comprimento de onda que atinge a terra. A radiação UVC (100 – 290 nm) fica barrada na camada de ozônio. A UVB (290 – 320 nm) atinge a epiderme e UVA (320 – 400 nm) atinge epiderme e derme. Fonte: a autora..... 32
- Figura 6** - Os CPDs resultam de ligações covalente entre pirimidinas adjacentes da mesma cadeia de DNA pela formação de um anel de ciclobutano nas posições C-5 e C-6. As 6,4-PP

são resultado da ligação covalente não cíclica entre duas pirimidinas adjacentes na mesma fita de DNA, entre as posições C-6 e C-4, sem formação de anel. Adaptado de: Molecular Biology Web Book – DNA replication, mutation and repair. 33

Figura 7 - Fluxograma das atividades desenvolvidas. 46

Figura 8 - Representação esquemática para reconstrução de derme e epiderme. Uma mistura de colágeno I, nutrientes e fibroblasto humano (MRC5) serão transferidos para uma placa contendo insertos do tipo transwell e levados à estufa por 30 minutos. Em seguida, foi diluído e depositado colágeno IV sob a derme formada e adicionado meio de cultivo na parte externa do inserto, e levado a estufa por 1 hora. Após o tempo, foi depositado queratinócitos humanos na parte interna do inserto. Fonte: a autora. 48

Figura 9 - Zimografia de gel com substrato específico. O substrato é incorporado no gel de SDS-PAGE (gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio). Aplicado 30 µL de proteína por canal. Submetidos a eletroforese a 120V por 1 hora e 30 minutos. Lavagem do gel duas vezes com Triton X-100. Após o gel foi incubado com solução de incubação à temperatura de 37°C para o desenvolvimento da reação proteolítica. O gel foi corado e descorado, e as bandas proteolíticas aparecem em um fundo escuro. Fonte: a autora. 52

Figura 10 – Cultivo do modelo de pele humana reconstruída. A) Insertos com membrana transwell inseridos em placas de cultivo celular de 12 poços. B) Modelo de pele humana reconstruído após 10 dias de cultivo celular. 55

Figura 11 - Padronização do tempo de cultivo da pele humana reconstruída. Todas as condições de cultivo e processamento histológicos realizados foram iguais, exceto o tempo de cultivo que a pele permaneceu em estufa após a montagem. A) 10 dias de cultivo; B) 15 dias de cultivo; C) 18 dias de cultivo. Aumento 20x (barra = 50µm). 56

Figura 12 - Citotoxicidade das doses de radiação. NE = Pele não exposta a radiação; 50mJ/cm²; 150mJ/cm²; 500mJ/cm²; 1500 mJ/cm². ****p<0,001 foi considerado estatisticamente significativo quando comparado ao controle da pele não exposta. Utilizou-se ANOVA oneway seguido do teste de Kruskal-Wallis. 58

Figura 13 - Efeitos da radiação UVB na pele humana reconstruída. Fotomicrografia de cortes histológicos corados por Hematoxilina-Eosina (HE). A) NE, não exposta, controle negativo; B) 50mJ/cm²; C) 150mJ/cm²; D) 500 mJ/cm²; E) 1500 mJ/cm². Aumento de 20x (barra: 50µm). F) NE, não exposta; G) 50mJ/cm²; H) 150mJ/cm²; I) 500 mJ/cm²; J) 1500 mJ/cm². Aumento de 100x (barra = 10µm). 58

Figura 14 - Atividade de MMP-2 e 9 em modelos tridimensional de pele humana reconstruída e em monocamada (HT1080). A) Bandas formadas após a degradação enzimática de MMPs em gel de gelatina. B) Atividade de MMPs 24 horas após a exposição à radiação ultravioleta B. ****p<0,001 foi considerado estatisticamente significativo quando comparado ao controle da pele não exposta. Utilizou-se ANOVA twoway seguido do teste de Sidak. 60

Figura 15 - Efeito da radiação UVB exposta a pele reconstruída na fragmentação do DNA pelo ensaio cometa alcalino. A) Fotomicrografias dos danos na pele não exposta a radiação, pele tratada com (EMS) e da pele exposta a UVB em pH alcalino. B) Índice do dano causado pelo ensaio cometa em pH alcalino. ****p<0,001 foi considerado estatisticamente significativo quando comparado ao controle da pele não exposta. Utilizou-se ANOVA oneway seguido do teste de Tukey. 61

Figura 16 - Frequência do dano causado ao DNA pelo ensaio cometa em pH alcalino. A frequência do dano é expressa em porcentagem (%), sendo a variação do grau 0 a 4 de fragmentação do DNA. ****p<0,001 foi considerado estatisticamente significativo quando comparado ao controle da pele não exposta. Utilizou-se ANOVA twoway seguido do teste de Tukey. 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Subcamadas da Epiderme. Adaptado de MURPHREE, 2017.....	21
Tabela 2 - Principais subcomponentes da derme. Adaptado de MURPHREE, 2017.	25
Tabela 3 - Métodos alternativos validados ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil de acordo com BRASIL (2014).	39
Tabela 4 - Vantagens dos modelos tridimensionais de pele humana. Adaptado de: RADEMACHER et al., (2018).....	41
Tabela 5 - Exposição à radiação ultravioleta B. O tempo de exposição sob cada condição seria exposta a radiação foi calculado pela aplicação na fórmula. A irradiância é medida antes de cada experimento, utilizando um medidor de ultravioleta.	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP-1	Proteína Ativadora - 1
CONCEA	Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal
CC	Citosina - Citosina
CEUA	Comissões de Éticas no Uso de Animais
CPDs	Dímeros de Pirimidina Ciclobutano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's médium</i>
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epitelial
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ERK	Quinase Regulada por Sinal Extracelular
EROS	Espécies Reativa de Oxigênio
IL - 1	Interleucina - 1
IL - 6	Interleucina – 6
iNOS	Óxido Nítrico Sintetase
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MCTI	Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
MMPs	Metaloproteinases de Matriz
MTT	3-[4,5- dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazoliobrometo
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
RENAMA	Rede Nacional de Métodos Alternativos
RUV	Radiação Ultravioleta

TC	Timina – Citosina
TIMPs	Inibidores Teciduais de Metaloproteinases
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
6,4 PP	6,4 Pirimidina – Pirimidona
8-oxo-dG	8-oxo-2'desoxiguanosina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 A pele, uma arquitetura complexa	18
2.2 Histologia e funções da pele	20
2.2.1 A epiderme	20
2.2.2 A derme	25
2.2.3 A hipoderme	27
2.3 Envelhecimento cutâneo	27
2.3.1 Fotoenvelhecimento	30
2.4 Métodos alternativos à utilização de animais	36
2.4.1 Pele Humana Reconstruída <i>in vitro</i>	39
2.4.2 Pele Humana Reconstruída <i>in vitro</i> no envelhecimento da pele	42
3 OBJETIVOS	45
3.1 Objetivo geral	45
3.2 Objetivos específicos	45
4 METODOLOGIA	46
4.1 Tipo de estudo	46
4.2 Delineamento experimental	46
4.3 Padronização da pele humana reconstruída fotoenvelhecida	46
4.3.1 Cultura de células	46
4.3.2 Geração da pele humana reconstruída fotoenvelhecida	47
4.3.3 Condições para Padronização do modelo	49
4.4 Análise histológica	49
4.5 Avaliação da viabilidade celular pelo método MTT	50
4.6 Atividade Proteolítica de Metaloproteinases	51
4.7 Ensaio cometa em pH alcalino	52
5 RESULTADOS	55
5.1 Padronização da pele humana reconstruída fotoenvelhecida	55
5.2 Avaliação da viabilidade celular das peles	57
5.3 Atividade Proteolítica de Metaloproteinases	59
5.4 Avaliação da genotoxicidade	60
6 DISCUSSÃO	63
7 CONCLUSÃO	68

8 REFERÊNCIAS	70
----------------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

Órgão de composição única e arquitetura complexa, a pele desempenha múltiplas funções, reveste e assegura grande parte das relações entre o meio interno e externo, estando como primeira linha de defesa contra agressões de danos ambientais. Sua arquitetura é responsável pelo revestimento do corpo e proteção, e se estrutura em três camadas principais com inter-relações entre elas - epiderme, derme e hipoderme (BARONI et al., 2012; LAICHEONG; MCGRATH, 2017; TOBIN, 2017).

No decorrer dos anos, a pele sofre mudanças estruturais correspondentes às alterações bioquímicas, histológicas e fisiológicas que comprometem suas funções biológicas, abalando a capacidade do organismo em se adaptar ao constante estresse metabólico. Tais mudanças são determinadas por fatores intrínsecos, que ocorrem de forma gradual e natural e por fatores extrínsecos, relacionados à poluição do ar, instabilidade climática e a exposição à radiação ultravioleta (RABE et al., 2006; KOHL et al., 2011; POLJŠAK; DAHMANE; GODIĆ, 2012).

Os efeitos da exposição prolongada à radiação ultravioleta têm adquirido grande importância nas últimas décadas, despertando interesse na classe científica, no entendimento das transformações envolvidas. Modelos de pele humana reconstruída *in vitro* mostraram ser ferramentas úteis e eficazes para estudos em pesquisa pois seu desenvolvimento e cultivo além de ser realizado em um ambiente tridimensional, assim como a pele humana, expressa diferentes receptores, tem capacidade proliferativa, síntese de matriz extracelular e funções metabólicas (BROHEM et al., 2011; FERNANDEZ et al., 2014; PELLEVOISIN; BOUEZ; COTOVIO, 2018).

Dentre as aplicabilidades dos modelos de pele humana reconstruído *in vitro* estão: estudos de interação célula-célula, proliferação e diferenciação celular, triagem de

desenvolvimento de formulação farmacológicas, modelos cosméticos, fotoenvelhecimento, sensibilidade aos raios ultravioleta e câncer de pele, além da possibilidade de serem manipulados facilmente, podendo servir de pilares para modelos com alterações genéticas específicas. Alguns distúrbios de pele também podem colher benefícios ao utilizá-los, como estudos para vitiligo, queloides, genodermatoses e epidermólise bolhosa (BROHEM et al., 2011; FLATEN et al., 2015; PELLEVOISIN; BOUEZ; COTOVIO, 2018).

Modelos validados que representam a espessura total da pele estão disponíveis, porém existem problemáticas envolvidas para adquiri-los. Produzidos no exterior e comercializados em kits específicos, não possibilitam o uso em pesquisas que envolvam mudanças morfológicas ou moleculares. Além disso, por serem oriundos de cultura de células primárias enfrentam algumas limitações quanto o tempo para utilização e diferenças na maturação epitelial, pois dependem de doadores e localização anatômicas do tecido diferentes, impossibilitando assim de serem reproduzidos em larga escala. Portanto, estratégias que permitam a reconstrução de pele humana em uma arquitetura tridimensional válida no Brasil, e ainda, oriundas de cultura de células permanente, será de grande relevância para pesquisas e indústrias, e podem melhorar a reprodutibilidade e a consistência dos modelos de pele, reduzindo as variações intra e interlaboratoriais (BROHEM et al., 2011; FLATEN et al., 2015; PEDROSA, 2016).

Com este trabalho pretende-se contribuir com um modelo de pele humana reconstruída a partir de linhagens de células permanentes, como plataforma de estudos para fotoenvelhecimento, possibilitando elucidar mecanismos complexos de diferentes sistemas biológicos frente a exposição à radiação ultravioleta B. Além disso, o modelo permite futuramente testar diferentes compostos com capacidade de reverter ou minimizar os danos causados pela radiação. Além de desafiar diferentes hipóteses, o modelo contribui para a redução e refinamento dos ensaios em animais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A pele, uma arquitetura complexa

A pele humana é considerada o maior órgão do corpo humano, constituindo cerca de 15% do peso corporal, com extensão de 1,5 a 2 m². Órgão de composição única e arquitetura complexa, que desempenha múltiplas funções, a pele reveste e assegura grande parte das relações entre o meio interno e o externo, estando como primeira linha de defesa contra agressões de danos ambientais (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2017; TOBIN, 2017).

A arquitetura complexa está estruturada em três compartimentos principais, inter-relacionados entre si, dentre eles, a epiderme, ou componente epitelial, camada mais superficial da pele, responsável pelo primeiro contato com o ambiente externo. A derme, ou componente conjuntivo, a camada média, tecido de sustentação no qual atravessa vasos e nervos, onde estão implantados os anexos cutâneos como as glândulas sudoríparas, pêlos, glândulas sebáceas e unhas. E por fim, a hipoderme, formada por tecido adiposo que se amolda aos músculos adjacentes. A **figura 1** mostra uma representação da estrutura da pele e seus componentes (WELLER et al., 2008; BARONI et al., 2012; MARIONNET; TRICAUD; BERNERD, 2015).

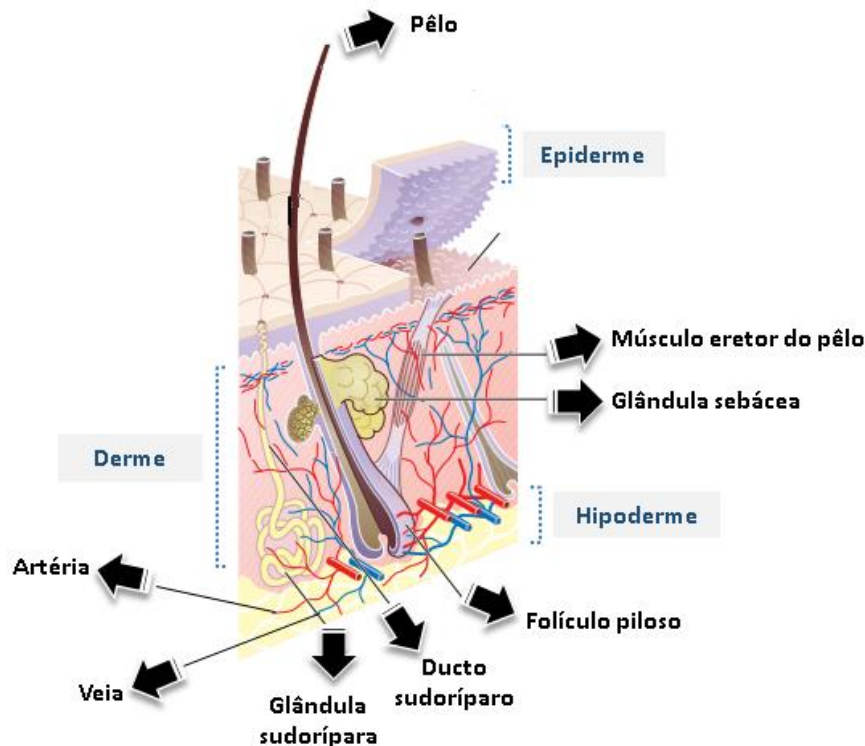


Figura 1 - Estrutura da pele. A estrutura da pele é dividida em três camadas principais, a epiderme, derme e hipoderme. A epiderme é perfurada por poros pelos quais sai o suor e o sebo. A derme é irrigada por vasos sanguíneos, abriga glândulas sebáceas, e as glândulas sudoríparas, responsáveis pela secreção do sebo e do suor, assim como os folículos pilosos. A hipoderme corresponde a camada mais profunda, formada por células gordurosas, os adipócitos. Adaptado de (WELLER et al., 2008).

Em comunicação dinâmica as alterações internas e externas do organismo frente à fatores ambientais, o revestimento cutâneo atua em conjunto com outros órgãos, recebendo constantemente informações sobre o ambiente através das terminações nervosas presentes nela, enviando os comandos para o sistema nervoso central, exercendo funções como: proteção contra agentes microbianos e raios ultravioleta, controle hemodinâmico, equilíbrio de água e eletrólitos no organismo, manutenção da temperatura corporal, síntese de vitamina D após exposição à radiação solar, além da proteção contra desidratação e atrito (WELLER et al., 2008; BROHEM et al., 2011; BARONI et al., 2012).

As defesas contra alterações dependem em partes da viabilidade da pele, podendo o aspecto da pele trazer informações relevantes sobre o estado de saúde do indivíduo, pois por ser um tecido dinâmico, permite que manifestações do organismo se expressem por alterações

cutâneas, como as rugas, que no decorrer da idade se manifestam em graus variáveis individualmente e podem alterar a defesa da pele a agressores externos. Além disso, o comprometimento de qualquer uma dessas funções pode levar a alterações patogênicas, incluindo câncer de pele (BROHEM et al., 2011; TOBIN, 2017).

2.2 Histologia e funções da pele

2.2.1 A epiderme

Estruturada por epitélio escamoso estratificado, a epiderme constitui uma vital barreira contra agressores externos. Sua estrutura consiste de variadas células compactadas que se diferem de acordo com a morfologia, grau de maturidade e profundidade, e são subdivididas em camadas ou estratos: estrato córneo, camada granulosa, camada espinhosa e camada basal (**Figura 2**) (**Tabela 1**) (ROBINSON; DOBRUCKI, 2006; BROHEM et al., 2011; BARONI et al., 2012).

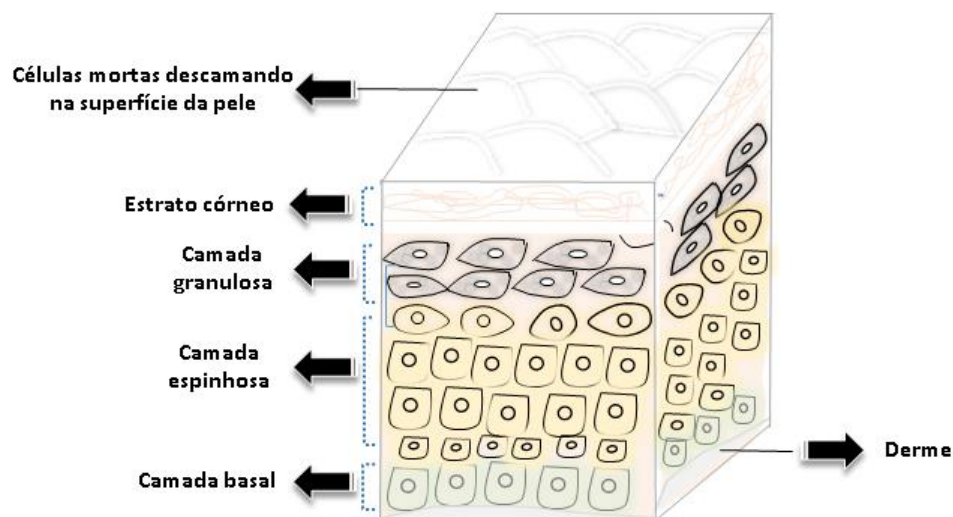


Figura 2 - Estrutura da epiderme. A epiderme é formada por várias camadas (estratos) de células justapostas. A camada córnea, lúcida, granulosa, espinhosa e basal. A camada córnea é formada por células achatadas, não-viáveis, anucleadas e queratinizada. A camada granulosa é formada por células achatadas, nucleadas e com grânulos basófilos. A camada espinhosa é formada por células achatadas e nucleadas, as células de Malpighi. A camada basal é formada por colágeno do tipo IV e proteoglicanos, e povoadas principalmente por células-tronco. Fonte: a autora.

Tabela 1 - Subcamadas da Epiderme. Adaptado de MURPHREE, 2017.

Subcamadas	Descrição	Função
Estrato Córneo	- Camada mais externa - Composto por queratinócitos mortos preenchidos com queratina proteica - Constantemente descartado e reabastecido por subcamadas abaixo	Barreira contra penetração por irritantes ou patógenos
Camada Lúcida	- Presente apenas em solas dos pés e palmas das mãos	Fornece espessuras nas solas dos pés e palmas das mãos
Camada Granulosa	- 1 a 5 células de espessura - As ceramidas dos corpos de Odland (encontradas nos queratinócitos) são liberadas dessa camada	As ceramidas formam uma camada lipofílica que mantém hidratações e retarda a perda de água
Camada Espinhosa	- Contém desmossomos ou junções célula a célula	Fornece adesão celular e resistência a forças mecânicas
Camada Basal	- Camada única de células reprodutoras	Queratinócitos migram em direção ao estrato córneo e se tornam preenchidos com queratina

Os queratinócitos são células predominantemente encontradas na epiderme (90-95% das células), sendo distribuídos em todas as subcamadas, de acordo com a proliferação, diferenciação, morte celular, que representam seus estágios de maturação. As células de Langerhans (2%), melanócitos (3%) e células de Merkel (0,5%) constituem populações menores de células da epiderme. A camada é considerada um tecido altamente mitótico, devido os queratinócitos se dividirem milhares de vezes durante a vida de um indivíduo (ROBINSON; DOBRUCKI, 2006; BROHEM et al., 2011; TOBIN, 2017).

Constantemente, os queratinócitos, sintetizam proteínas estruturais e lipídios, migrando das camadas basais para as camadas externas da epiderme, sofrendo alterações morfológicas e bioquímicas, levando a perda metabólica na camada superior. Além disso, os queratinócitos são interconectados por desmossomos, junções celulares importantes para a coesão de células nas

camadas nucleadas da epiderme, uma vez que são eliminados na camada anucleada, através do processo de descamação (BARONI et al., 2012; TOBIN, 2017).

A camada superior da epiderme, o estrato córneo, é constituído de células achatadas, não-viáveis, anucleadas e queratinizadas, que conferem proteção contra o atrito, invasão de microorganismos e perda de água. Essa proteção é possível devido às características dos corneócitos, células originadas por queratinócitos modificados, ricos em proteínas e estão envolvidas por um envelope lipídico e unidas por corneodesmossomos, se destacando como a principal barreira de proteção da pele, permitindo evitar os possíveis danos que podem ser causados por mudanças na temperatura e umidade, pela ação dos raios ultravioleta, fatores mecânicos e agentes patogênicos (BARONI et al., 2012; MENON; CLEARY; LANE, 2012).

Abaixo do estrato córneo está localizada a camada granulosa, formada por células achatadas, nucleadas e com grânulos basófilos, chamados de grânulos querato-hialina e grânulos lamelares. Os grânulos querato-hialina encontram-se dispersos no citoplasma e contêm proteínas ricas em histidina fosforilada e cistina, responsáveis pela impermeabilização da pele. Os grânulos lamelares contêm glicoproteínas, glicosilceramidas, ácidos graxos, fosfolípídeos e colesterol que, ao migrarem para o estrato córneo, o conteúdo do grânulo se dispersa dentro das células, sofrendo modificações por enzimas, ficando dispostas sobre as células e na matriz extracelular, formando uma barreira lipídica semipermeável, responsáveis pela impermeabilização da pele à água, impedindo a desidratação, além disso, constitui uma barreira útil contra a penetração de substâncias (BROHEM et al., 2011; BARONI et al., 2012; MURPHREE, 2017).

Em sequência, a camada espinhosa é formada por células achatadas e nucleadas, as células de Malpighi, que são queratinócitos diferenciados unidos devido à presença de projeções citoplasmáticas, de grande quantidade de desmossomos e de feixes de filamentos de queratina entre as células (tonofilamentos), formados por glicoproteínas e lipoproteínas. Atuam

na manutenção da coesão entre as células da epiderme e na resistência ao atrito. Na parte superior desta camada, os queratinócitos sintetizam citoqueratinas de maior peso molecular, produzindo proteínas envolvidas na queratinização, como a involucrina, a loricrina e a filagrina (WELLER et al., 2008; BARONI et al., 2012; MURPHREE, 2017).

A camada basal, também conhecida como camada germinativa, basicamente é formada por colágeno do tipo IV e proteoglicanos, é povoada principalmente por células-tronco (*stem cells*), onde parte dessas células passa por intensa divisão celular, sendo responsável pela renovação contínua da epiderme, juntamente com as células da camada espinhosa, fornecendo células para substituir as que são perdidas na camada córnea, levando a nutrição das demais camadas, aumentando a produção de queratina. O processo de renovação da epiderme depende além da idade e localização da pele no corpo humano, de um equilíbrio entre a proliferação e descamação, variando de 15 a 30 dias (BARONI et al., 2012).

Os melanócitos, as células de Langerhans e células de Merkel também compõem a epiderme (**Figura 3**). Os melanócitos são células dendríticas arredondadas e nucleadas que surgem a partir da crista neural no período embrionário, sintetizam melanina, embalada em organelas subcelulares (melanosomas) e seus prolongamentos penetram em reentrâncias das células na camada basal e espinhosa, produzindo e transferindo pigmento de melanina, responsáveis pela cor parda-amarelado a marrom escuro da pele, para as células que estão presente nesta camada. Cada melanócito fornece melanina a aproximadamente 30- 40 queratinócitos circundantes. A melanina protege o núcleo da célula epidérmica contra a ação dos raios ultravioleta (BARONI et al., 2012; LAI-CHEONG; MCGRATH, 2017).

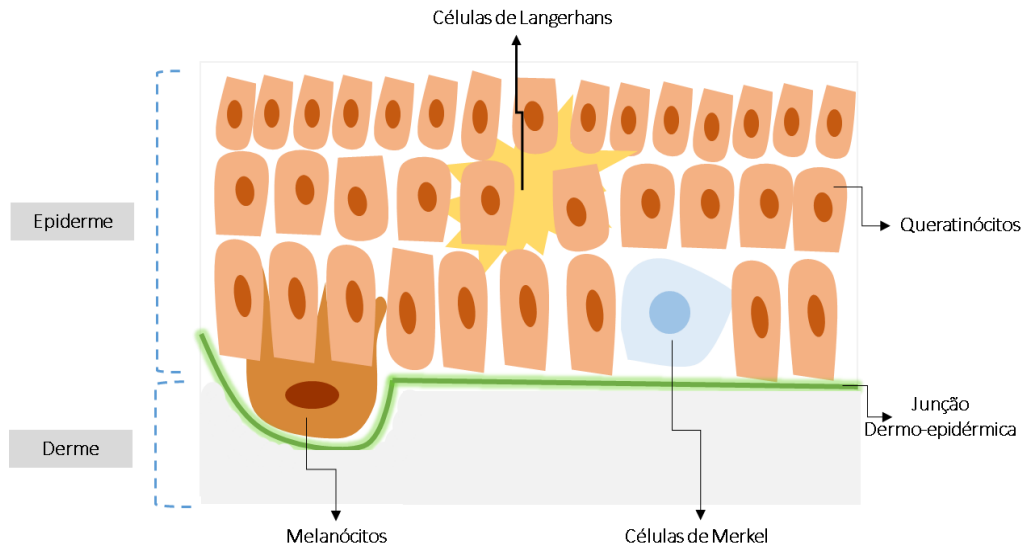


Figura 3 - Células que compõem a epiderme. Os queratinócitos são células predominantemente encontradas na epiderme (90-95% das células), sendo distribuídos em todas as subcamadas. As células de Langerhans (2%), melanócitos (3%) e células de Merkel (0,5%) constituem populações menores de células da epiderme. Fonte: a autora.

As células de Langerhans também são células dendríticas, imunocompetentes, derivadas da medula óssea, que reconhecem, fagocitam e processam antígenos estranhos na pele, comunicando aos linfócitos T a presença de corpos estranhos, levando ao início da resposta imunológica, sendo primordial para a barreira imune da epiderme. Já as células de Merkel, diferente dos melanócitos e células de Langerhans, não são células dendríticas, possuem tonofilamentos e desmossomos ocasionais que a ligam às células adjacentes. São células neuroendócrinas cutâneas, localizadas principalmente em regiões sensíveis ao toque como a ponta dos dedos, e são responsáveis por receber informações do meio ambiente e as enviar para o sistema nervoso central, participando da constituição do componente do nervo sensorial da pele (WELLER et al., 2008; BARONI et al., 2012; LAI-CHEONG; MCGRATH, 2017).

A epiderme não é um tecido vascularizado, sendo os nutrientes que à suprem provindos da camada derme da pele. Ambas as camadas são conectadas através de uma matriz extracelular, conhecidas como membrana basal ou junção dermo-epidérmica, constituída por

queratinócitos da epiderme e fibroblastos da derme, que conferem suporte mecânico para a adesão das duas camadas (WELLER et al., 2008; BROHEM et al., 2011).

A junção dermo-epidérmica é composta por colágeno IV, laminina, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e fatores de crescimento com propriedades biológicas variáveis. Todos os componentes arquitetados em uma rede de fibras de proteínas, controlam o transporte de moléculas em ambas as camadas da pele, sendo capazes de ligar uma variedade de citocinas e fatores de crescimento, representando um reservatório para liberação controlada durante processos de remodelação ou reparo fisiológico (WELLER et al., 2008; BROHEM et al., 2011).

2.2.2 A derme

Camada intermediária da pele, a derme é estruturada por uma matriz de tecido conjuntivo contendo fibras, filamentos, substância fundamental amorfa, as quais acomodam vasos, nervos e anexos epidérmicos. São subdivididas em três camadas: a camada papilar, formada por tecido conjuntivo frouxo, camada subpapilar, estruturalmente idêntica a derme papilar, porém dispõe-se em torno dos anexos cutâneos e a camada reticular, formada por tecido conjuntivo denso (**Tabela 2**) (BARONI et al., 2012; SHIMIZU, 2016).

Tabela 2 – Principais subcomponentes da derme. Adaptado de MURPHREE, 2017.

Subcomponentes	Função ou descrição
Derme papilar	- Contém alças capilares responsáveis pelo fornecimento de nutrientes e oxigenação da camada germinativa do estrato da epiderme
Derme reticular	- Fibras colágenas que a compõem entrelaçam-se como uma rede, formando o tecido conjuntivo denso - Fornece plexo vascular, linfáticos e proteínas do tecido conjuntivo, como colágeno.

Dentre as células da derme, os fibroblastos são abundantemente encontrados e são responsáveis pela síntese e renovação da matriz extracelular, além de produzirem fibras colágenas, fibras elásticas e glicosaminoglicanos. Outras células são encontradas em um número menor na derme, como fagócitos mononucleares residentes e transitórios, linfócitos, células de Langerhans e mastócitos (WELLER et al., 2008; BARONI et al., 2012; SHIMIZU, 2016).

As fibras de colágeno (principalmente os tipos I e III) constituem os principais componentes da derme, sendo as mais espessas encontradas na camada reticular, o tipo I é responsável por 80% das fibras e o tipo III responsável por 15%. A maior parte do restante é considerada colágeno tipo V. Os tipos IV, VII e XVII são encontrados principalmente nas membranas basais, associados aos queratinócitos epidérmicos. As fibras elásticas, com resistência inferior às de colágeno, formam uma rede que confere elasticidade a pele, se estende desde a junção dermo-epidérmica até a hipoderme. São encontradas principalmente na derme do couro cabeludo, face e órgãos extensíveis, como artérias e tendões (WELLER et al., 2008; SHIMIZU, 2016).

A substância amorfa da derme é constituída por glicosaminoglicanos (ácido hialurônico e sulfato de dermatan, sulfato de heparano e sulfato de condroitina) complexados ao núcleo da proteína e existentes como proteoglicanos. Considera-se a substância fundamental amorfa pois fornece massa, permitindo que a derme atue como um amortecedor de atritos, age como um lubrificante durante o movimento da pele e permite que nutrientes, hormônios e produtos residuais transitem pela derme (WELLER et al., 2008).

Os vasos sanguíneos da derme atuam na regulação da temperatura corporal interna ideal para o organismo. Fibras nervosas presentes na derme podem penetrar a epiderme, apresentando função sensorial a estímulos como calor e dor além da função mecânica como a vibração e o

tato. Pêlos, glândulas sebáceas, sudoríparas e unhas também compõem a derme (WELLER et al., 2008).

2.2.3 A hipoderme

Comumente chamada de tecido subcutâneo, a hipoderme constitui a camada mais profunda da pele. Composto por células adiposas separados por septos de colágeno com estruturas nervosas, vasculares e linfáticas que compreendem a função de amortecer a pressão física externa contra traumas, reter a umidade e gerar calor (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2017; SHIMIZU, 2016).

2.3 Envelhecimento cutâneo

O envelhecimento cutâneo pode ser considerado um acúmulo de diferentes alterações danosas em células e tecidos. Tais alterações refletem em mudanças nas características estruturais celulares e de matriz extracelular, levando a diminuição, ao longo dos anos, das funções biológicas da pele, perdendo a capacidade em se adaptar ao constante estresse exógeno e endógeno de agentes físicos, químicos e biológicos (RABE et al., 2006; KOHL et al., 2011).

O processo de envelhecimento da pele engloba duas teorias, na qual pode ser causada por fatores intrínsecos (endógenos), decorrente de fatores cronológicos e fisiológicos e, fatores extrínsecos (exógenos), causado pela exposição à fatores ambientais. De natureza complexa e multifatorial, os dois fatores se sobrepõem, e ambos levam a mudanças na integridade da pele (RABE et al., 2006; POLJŠAK, DAHMANE, GODIĆ, 2012).

As mudanças que acompanham o envelhecimento intrínseco advêm de mecanismos genéticos determinados, mecanismos epigenéticos e pós-transducionais, conduzindo o envelhecimento a uma variação significativa entre populações, indivíduos da mesma etnia e até

entre diferentes locais anatômicos do próprio indivíduo. As alterações são instaladas de forma gradual e estão intimamente ligadas com a qualidade e hábitos de vida, sendo visualmente perceptíveis em uma idade avançada (POLJŠAK; DAHMANE; GODIĆ, 2012; TOBIN, 2017).

Os mecanismos genéticos contribuem com menos de 3% do processo de envelhecimento. Essa teoria envolve as porções terminais dos cromossomos, os telômeros, que encurtam a cada ciclo celular e quando atingem um tamanho crítico, ocorre a parada do ciclo celular ou apoptose. Segundo PENG et al., 2015, o papel do encurtamento dos telômeros nas células-tronco da pele permanece incompreensível, uma vez que os níveis detectáveis de proteína da telomerase e sua atividade são apenas detectados em certos componentes de células-tronco da pele, em células da epiderme basal, em queratinócitos e no componente protuberante do folículo piloso. Não sendo detectada em células epiteliais humanas ou fibroblastos (POLJŠAK; DAHMANE; GODIĆ, 2012; PENG et al., 2015).

Outra teoria que promete explicar o processo de envelhecimento se concentra no dano ao DNA e ao simultâneo processo de reparo, que induz a alterações epigenéticas em todo o genoma, levando à senescência celular, perda da função celular adequada e aberrações genômicas. O estresse oxidativo e a diminuição de níveis hormonais também são teorias que contribuem para o processo do envelhecimento (POLJŠAK; DAHMANE; GODIĆ, 2012).

O estresse oxidativo é causado tanto por fatores intrínsecos como extrínsecos. Trata-se de um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a defesa antioxidante. O aumento dessa produção pode levar a transcrição do fator c-Jun via MAPK (proteínas cinases ativadas por mitogênio), ativando, por sua vez, o fator decisivo de transcrição AP-1 (proteína ativadora 1), que leva à expressão de metaloproteinases da matriz extracelular, MMP-1 (colagenase intersticial), MMP-3 (estromelina 1) e MMP-9 (gelatinase b) e impede a expressão de procolágeno. Resultando em níveis elevados de colágeno degradado. A produção ROS aumenta com a idade, e a capacidade das células da pele humana de reparar o DNA

diminui do longo dos anos, logo, constitui um papel importante no envelhecimento (KOHL et al., 2011; POLJŠAK; DAHMANE; GODIĆ, 2012).

A diminuição da proliferação celular na epiderme e derme com consequência na redução de fibroblastos são consequências dos fatores endógenos no processo do envelhecimento. A diminuição da síntese e atividade de elastina e colágeno comprometem a elasticidade, resistência e hidratação da pele, podendo ter influência no processo de cicatrização lenta e descamação ineficaz do estrato córneo. Além disso, a derme pode ficar atrófica e haver perda de tecido adiposo na hipoderme. O encolhimento da junção dermo-epidérmica também pode contribuir para a fragilidade da pele e na redução de nutrientes que suprem a epiderme e derme (KHAVKIN; ELLIS, 2011; TOBIN, 2017).

Ainda que o processo de envelhecimento intrínseco seja inevitável, o envelhecimento extrínseco é susceptível de precaução e tratamento, pois resulta da ação de fatores externos, como a poluição ambiental, instabilidade climática, tabaco, alimentação, álcool e principalmente a exposição aos raios ultravioletas emitidos pelo sol. No entanto, é difícil dissociar os dois tipos de envelhecimento, uma vez que a exposição aos fatores externos contribuem acelerando o processo de envelhecimento intrínseco (POLJŠAK; DAHMANE; GODIĆ, 2012; TOBIN, 2017).

A exposição à radiação ultravioleta (RUV) é responsável por mais de 80% do envelhecimento da pele, embora essa exposição também possa causar queimaduras e bronzeados. O fotoenvelhecimento ocorre devido à exposição acumulada ao sol sem proteção solar, levando a características na pele como rugas acentuadas, pele amarelada com manchas, textura áspera, seca e menos elástica. Em contrapartida, a pele envelhecida por fatores endógenos apresenta aspectos mais sutis como, rugas finas e discretas, sem manchas, textura mais lisa e ligeiramente atrofiada (TOBIN, 2017).

2.3.1 Fotoenvelhecimento

O fotoenvelhecimento consiste em características senescentes aceleradas devido ao processo cumulativo de exposição solar, que depende do grau de exposição e da pigmentação da pele. Essas características levam a alterações desfavoráveis na função fisiológica após a maturação, levando a morte. Sob outra perspectiva, o envelhecimento refere-se à passagem do tempo do nascimento à morte, que é imparcial e independente quanto aos méritos e deméritos, não podendo ser interrompido. Contudo, os efeitos da fotolesão são evidentes muitos anos antes do envelhecimento intrínseco ser aparente (HAN; CHIEN; KANG, 2014; INOUE, 2017).

O espectro solar consiste em radiação eletromagnética com intervalos de comprimento de onda, e incluem: radiação ultravioleta (100-400nm), luz visível (400-780nm) e infravermelho (>780nm). A radiação ultravioleta (RUV) que atinge a terra corresponde a 5% desse espectro, porém é mais deletério para a pele (SVOBODOVA; WALTEROVA; VOSTALOVA, 2006; TOBIN, 2017).

A RUV compreende três categorias, UVA, UVB e UVC e diferem de acordo com o comprimento de onda e o nível da camada da pele que esses raios atingem. Parte da radiação é absorvida pela camada de ozônio (até 310 nm), portanto, os raios UVC em sua totalidade, não atingem a terra, pois o comprimento de onda varia de 100 – 290 nm. Além disso, grande parte dos raios UVB também ficam barrados na camada de ozônio (**Figura 4**) (SVOBODOVA; WALTEROVA; VOSTALOVA, 2006).

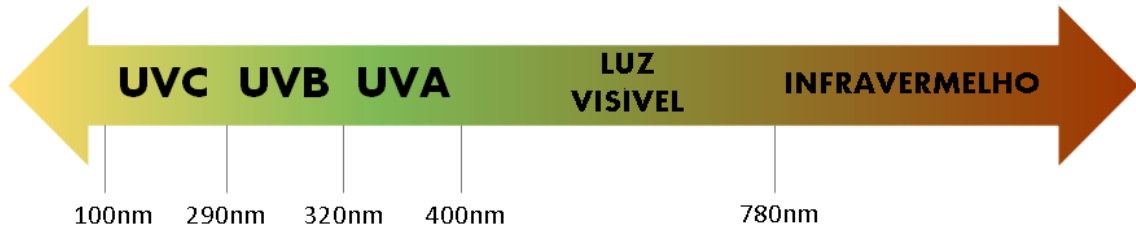


Figura 4 - Espectro solar. O espectro solar é composto por radiações eletromagnéticas com intervalo de comprimento de onda. UVC (100 – 290 nm), UVB (290 – 320 nm), UVA (320 – 400 nm), luz visível (400 – 780 nm) e infravermelho (> 780 nm). Fonte: a autora.

O comprimento de onda é inversamente proporcional à energia que as radiações conduzem. Dessa forma, a radiação UVA (320 – 400 nm), com maior comprimento de onda é absorvido menos intensamente nas camadas da pele, atingindo queratinócitos da epiderme e fibroblastos da derme, enquanto a radiação UVB (290 – 320 nm), apesar de apenas parte atingir a terra, possui um menor comprimento de onda, com maior energia, sendo profundamente absorvido na epiderme, levando a uma resposta aguda (**Figura 5**) (SILVEIRA, PEDROSO, 2014; INOUE, 2017; TOBIN, 2017).

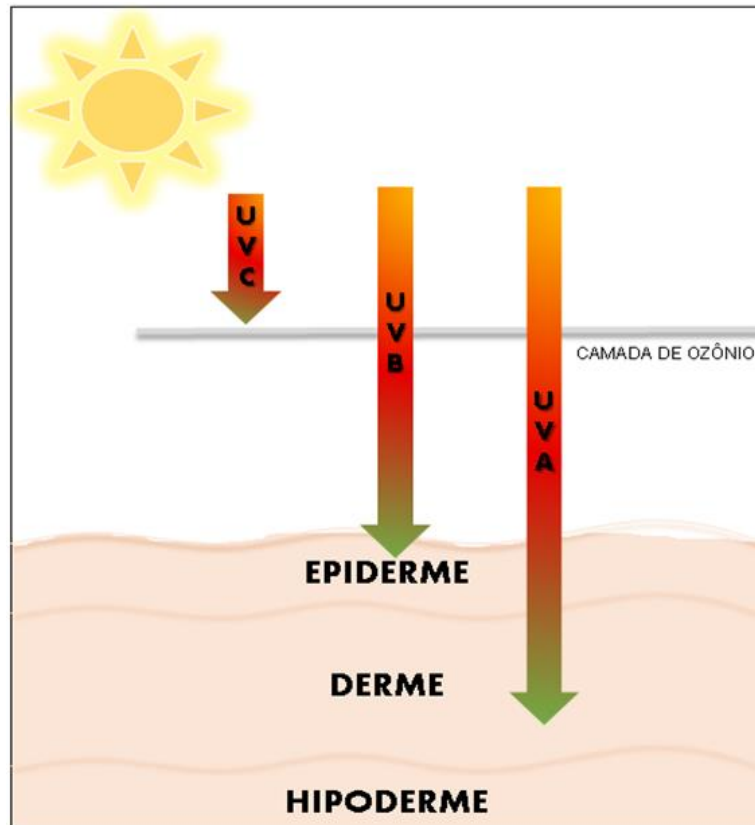


Figura 5 - Exposição à radiação ultravioleta na pele. As radiações ultravioletas são absorvidas pelas camadas da pele de acordo com o comprimento de onda que atinge a terra. A radiação UVC (100 – 290 nm) fica barrada na camada de ozônio. A UVB (290 – 320 nm) atinge a epiderme e UVA (320 – 400 nm) atinge epiderme e derme. Fonte: a autora.

Por tratar-se de um processo cumulativo, a pele gravemente fotoenvelhecida possui características marcantes devido as alterações histológicas observadas na epiderme e derme. As alterações na epiderme contribuem para o aspecto e textura áspera e pigmentação irregular, devido queratinócitos atípicos e uma distribuição irregular de queratinócitos e melanina. Já as alterações dérmicas, a principal característica é a perda de elasticidade, caracterizada pela elastose solar, devido a degradação de fibras elásticas, redução das fibras de colágeno e aumento da substância fundamental amorfa (RIJKEN, BRUIJNZEEL-KOOMEN, 2011).

A exposição a UVB provoca danos diretos na estrutura DNA, promovendo distorções em sua estrutura, interferindo no processo de replicação e transcrição, levando a mutações no material genético. Essa interação induz processos oxidativos causando a formação de

fotoprodutos, sendo os mais comuns dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD) e 6,4-pirimidina-pirimidona (6,4-PP), que podem estar relacionadas a lesões cutâneas pré-malignas (fotocarcinogênese) (**Figura 6**) (SVOBODOVA, WALTEROVA, VOSTALOVA, 2006; INOUE, 2017).

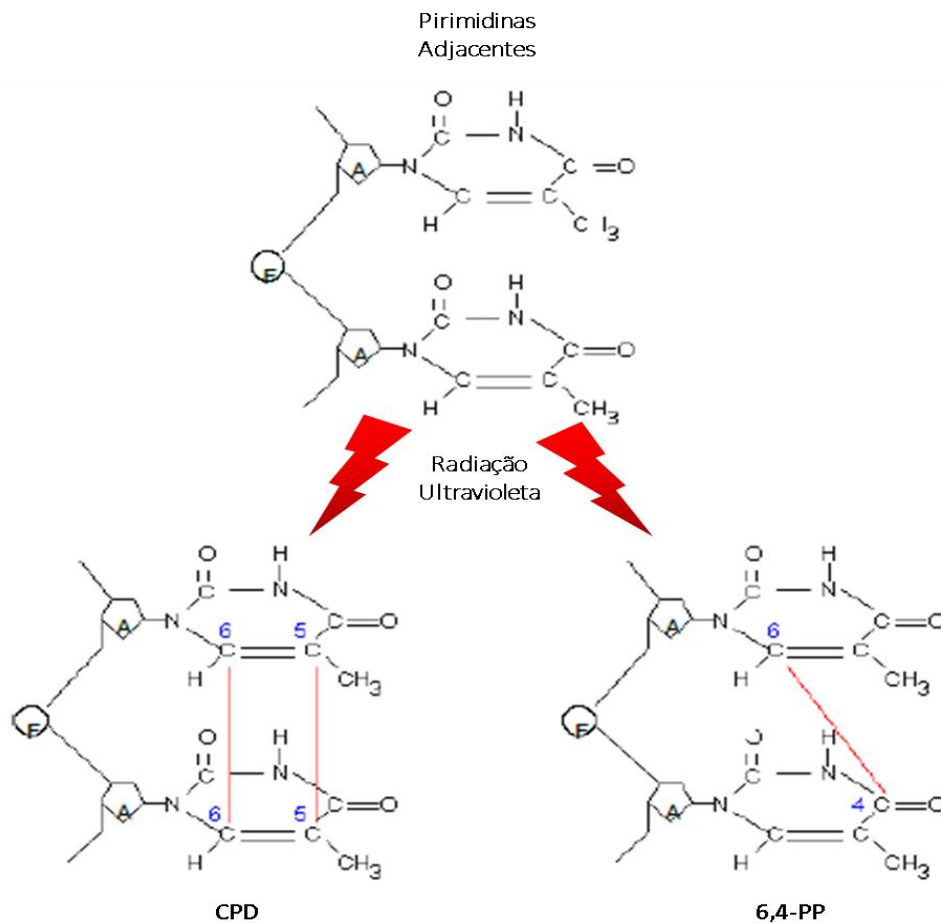


Figura 6 - Os CPDs resultam de ligações covalente entre pirimidinas adjacentes da mesma cadeia de DNA pela formação de um anel de ciclobutano nas posições C-5 e C-6. As 6,4-PP são resultado da ligação covalente não cíclica entre duas pirimidinas adjacentes na mesma fita de DNA, entre as posições C-6 e C-4, sem formação de anel. Adaptado de: Molecular Biology Web Book – DNA replication, mutation and repair.

A proporção dos danos causados por CPDs e 6,4-PP são 75% e 25%, respectivamente. Sendo, os danos 6,4-PP reparados com mais facilidade pelo sistema de reparo por excisão de nucleotídeos (NER), podendo acontecer em até 6h. Como os danos do tipo CPD não conseguem ser facilmente reparados (demora até 24h), acontecem de forma mais frequente. A replicação dos dímeros pode levar a mutações pontuais, caso as células não consigam ser reparadas antes

do processo de replicação, sendo timina-citosina (TC) e citosina-citosina (CC) as mais mutagênicas, e suas mutações se relacionam, frequentemente, ao gene *TP53*. O processo de apoptose ou reparo liderado pelo gene *P53*, quando for ineficiente, pode sofrer mutação e aumentar a probabilidade de desenvolvimento da célula cancerosa (SCHUCH et al., 2009; INOUE, 2017).

Mutações em genes com importantes funções regulatórias também podem ser observados no processo inicial da tumorigênese, como: *TP53*, *RAS*, *P16INK4A* e receptor do fator de crescimento epitelial (*EGFR*). Nucleotídeos não reparados ou mal reparados se acumulam de forma gradativa nas células à medida que a pessoa envelhece, porque a capacidade de reparo do DNA diminui conforme o envelhecimento. Ao passo que as mutações se acumulam, a função celular também diminui, resultando em senescência do tecido (INOUE, 2017; MARTENS et al., 2018).

As respostas induzidas por UVA nas células ocorrem indiretamente por processos oxidativos. Através da geração de espécies reativas de oxigênio (EROS), podem causar danos às proteínas celulares, lipídios e ácidos nucleicos envolvidos no processo de transcrição do DNA, levando a mutações indiretas, sendo a 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxo-dG) a lesão mais frequente induzida no DNA. Profundamente penetrante a UVA leva a danos do tecido conjuntivo na derme e também tem sido associada a 67% dos melanomas malignos. O UVB também participa de danos indiretos às macromoléculas, provocando a produção de radicais livres e a redução dos antioxidantes da pele (SVOBODOVA, WALTEROVA, VOSTALOVA, 2006; INOUE, 2017; TOBIN, 2017).

A energia liberada pela radiação é absorvida por cromóforos celulares (como, DNA e aminoácidos aromáticos), sendo convertido em energia química. Quando energizados constituem uma das principais fontes de radicais livres. Ao serem emitidas, alteram a órbita dos elétrons, tornando os átomos, especialmente de oxigênio, altamente reativos, com formação de

oxigênio molecular, peróxido de hidrogênio e outros radicais relacionados a depleção dos sistemas de defesa antioxidantes, podendo reagir com moléculas do DNA, alterando seus processos de duplicação e codificação de proteínas, induzindo o dano (RABE et al., 2006; POLJŠAK, DAHMANE, GODIĆ, 2012).

Grande parte do oxigênio consumido pelos tecidos é advindo do metabolismo oxidativo que envolve a redução de oxigênio molecular na mitocôndria por fosforilação oxidativa, porém, somente 95 a 98% desse oxigênio é consumido, o restante pode não receber todos os elétrons e produzir EROS, levando a mutações no DNA mitocondrial, que podem estar envolvidas no processo de envelhecimento (RABE et al., 2006; POLJŠAK; DAHMANE; GODIĆ, 2012).

A resposta celular à RUV envolve vias de transdução de sinal e fatores de transcrição, como p38, MAPK, ERK1 / 2, JNK. As MAPKs são proteínas quinase ativada por mitógeno, envolvidas na regulação da proliferação, diferenciação e adaptação celular ao estresse e apoptose. A ativação de subfamílias das MAPK, como a quinase regulada por sinal extracelular (ERK), a quinase c-Jun N-terminal (JNK) e as quinases p38, resulta no aumento da expressão do fator de transcrição c-Jun na pele, que em conjunto com o fator de transcrição constitutivamente expresso (c-Fos) formam um complexo denominado fator de transcrição proteína ativadora AP-1 (SILVEIRA; PEDROSO, 2014).

A proteína AP-1 leva à indução de membros da família das metaloproteinases de matriz (MMP), capazes de degradar estruturas proteicas como o colágeno, elastina e outras proteínas presentes na matriz extracelular da pele. Os níveis de MMPs aumentam quando expostos a RUV devido a degradação do tecido. Esse aumento também envolve a geração de EROS, pois oxidantes ativam MMPs (QUAN et al., 2009; SILVEIRA, PEDROSO, 2014).

As metaloproteinases envolvidas são: MMP-1 (colagenase), que degrada fibras de colágeno do tipo I e III, a MMP-3 (stromelisina-1), degrada colágeno do tipo IV e MMP-9

(gelatinase-B), degrada fragmentos de colágeno gerados pela MMP-1. Uma vez ativada, todas as MMPs podem ser inibidas por inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) que são regulados por citocinas (IL-1, IL-6, TNF- α) e fatores de crescimento. No entanto, após a exposição a RUV, a degradação de MMPs é elevada, superando a expressão de TIMPs, promovendo a degradação da matriz celular (QUAN et al., 2009; SILVEIRA, PEDROSO, 2014).

Além disso, a exposição à radiação UVA induz a produção de óxido nítrico sintetase (iNOS), enzima que catalisa a superprodução de óxido nítrico (NO), um radical livre envolvido na inibição da proliferação de fibroblastos na derme. Estudos realizados por Choe et al., (2003) demonstraram que o doador de NO poderia ainda, aumentar níveis de expressão de metaloproteinases (MMP-1 e MMP-2), levando a alterações no tecido conjuntivo da pele, também observadas no fotoenvelhecimento (CHOE et al., 2003).

2.4 Métodos alternativos à utilização de animais

Os animais são fundamentais para o avanço da ciência devido a semelhança com o organismo humano, porém métodos alternativos estão cada vez mais sendo implementados na ciência moderna para contribuir com a pesquisa científica, diminuindo assim o uso de animais para um número mínimo, sempre que possível ou refinando técnicas metodológicas com o intuito de diminuir a dor ou desconforto sofrido pelos animais durante os testes (FLECKNELL, 2002).

A preocupação com a utilização de animais em testes clínicos é uma causa antiga que tem tomado espaço nos últimos anos. No século XIX, o pesquisador Marshall Hall propôs um código de ética na prática da pesquisa, no qual incluíam a redução de repetições desnecessárias para obtenção de resultados, redução da dor imposta aos animais e mencionou ainda à substituição de animais de grande porte por animais menores. No final da década de 50, Russel

e Burch propuseram uma nova ciência e publicaram o livro “*Principles of Humane Experimental Technique*” (Princípios da Técnica Experimental Humana), lançando o conceito dos 3Rs: “*Reduction, Replacement e Refinement*” (Redução, Reposição e Refinamento) para guiar uma utilização mais poupada e proveitosa de animais na experimentação (TANNENBAUM; BENNETT, 2015).

Conceituando o princípio dos 3Rs, a redução apresenta a ideia de usar sempre que possível o menor número de animais durante a pesquisa para obter quantidade e precisão; a reposição se remete ao uso de modelos alternativos de pesquisa, como exemplo podemos citar o uso de técnicas *in vitro* de cultura de células e tecidos; o refinamento visa o aperfeiçoamento de todos os processos envolvidos na pesquisa experimental, com o objetivo da redução do uso e sofrimento (dor e estresse) dos animais (TANNENBAUM; BENNETT, 2015).

O princípio sugerido por Russel e Bruch em 1959 não teve relevância significativa naquela época, e sim a partir da década de 80, onde órgãos estatais de cada país desenvolveram leis e protocolos com base no princípio dos 3Rs, identificando obrigações legais envolvidas na busca de reduzir, refinar e substituir o uso experimental de animais, sempre que possível. A busca por desenvolver, validar e discutir alternativas para a substituição de teste em animais estimularam e resgataram interesses de diversas instituições no oferecimento de encontros e seminários para discussão em prol da causa (CAZARIN; DUQUE, 2004).

No Brasil, em 2008, foi aprovada a lei 11.794/2008, conhecida como Lei Arouca, que regulamenta o uso de animais em pesquisa e ainda estabelece a criação do Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal (CONCEA). As competências atribuídas ao CONCEA são muitas e envolvem: expedir e fazer cumprir normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade de ensino e pesquisa; credenciar as instituições para criação ou utilização dos animais; monitorar e avaliar novas técnicas alternativas em substituição ao uso

de animais tanto no ensino como na pesquisa; estabelecer e rever normas técnicas de instalação e funcionamento de biotérios e laboratórios de experimentação (BRASIL, 2008).

O CONCEA conta ainda com entidades locais nas instituições, as Comissões de Éticas no Uso de Animais (CEUA), que avaliam projetos de pesquisa para aprovação ou não, seguindo as diretrizes postuladas pelo conselho (BRASIL, 2008).

Em 2012, através da portaria nº 491, o Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) criou a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA), composto por laboratórios centrais e associados de âmbito público ou privado, que tem por responsabilidade estimular a implementação de métodos alternativos, monitorar o desempenho de laboratórios associados, promover o desenvolvimento, validação e certificação de novos métodos com qualidade dos ensaios (BRASIL, 2012).

A validação dos métodos alternativos envolve a confiabilidade e a relevância de uma abordagem, método, procedimento ou avaliação para uma finalidade definida. Na Europa, por exemplo, foi criado o Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos (EURL-ECVAM), no qual é o responsável pela validação desses métodos e publicação de relatórios e atualizações sobre o desenvolvimento, validação e aceitação regulatória dos mesmos, além disso, possui um sistema que fornece informações e atualizações de status de novos métodos desenvolvidos até a sua validação (PELLEVOISIN; BOUEZ; COTOVIO, 2018).

A resolução normativa do CONCEA nº 18, reconhece dezessete métodos alternativos validados ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. Os métodos estão divididos em sete grupos e incluem alternativas de substituição para testes de irritação e corrosão da pele e ocular, fototoxicidade, absorção cutânea, sensibilização cutânea, toxicidade aguda e genotoxicidade (**Tabela 3**). Todas as alternativas descritas na normativa estão validados por centros internacionais de validação, com protocolos publicados pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), e possuem aceitação regulatória

internacional. Ficando estabelecido o prazo de até cinco anos para substituição obrigatória dos testes em animais para os métodos alternativos validados, cabendo à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) verificar a apresentação de dados que comprovem a segurança dos produtos que são registrados na agência (BRASIL, 2014).

Tabela 3 - Métodos alternativos validados ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil de acordo com BRASIL (2014).

Grupos	Métodos / Guia OECD
Avaliação do potencial de irritação e corrosão da pele	<ul style="list-style-type: none"> - Corrosão dérmica <i>in vitro</i>: Teste de Resistência Elétrica Transcutânea (OECD 430) - Corrosão dérmica <i>in vitro</i>: Teste da Epiderme Humana Reconstituída (OECD 431) - Teste de Barreira de Membrana <i>in vitro</i> (OECD 435) - Teste de irritação Cutânea <i>in vitro</i> (OECD 439)
Avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular	<ul style="list-style-type: none"> - 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)
Avaliação do potencial de fototoxicidade	<ul style="list-style-type: none"> - Teste de fototoxicidade <i>in vitro</i> 3T3 NRU (OECD 432) - Absorção cutânea método <i>in vitro</i> (OECD 428) - Sensibilização cutânea: Ensaio do Linfonodo Local (OECD 429) - Versões não radioativas do Ensaio do Linfonodo Local (OECD 442A e 442B)
Avaliação de toxicidade aguda	<ul style="list-style-type: none"> - Toxicidade Aguda Oral – Procedimento de Doses Fixas (OECD 420) - Toxicidade Aguda Oral – Classe Tóxica Aguda (OECD 423) - Toxicidade Aguda Oral – Procedimento “<i>Up and Down</i>” (OECD 425) - Estimativa da dose inicial para teste de toxicidade aguda oral sistêmica (OECD 129)
Avaliação de genotoxicidade	<ul style="list-style-type: none"> - Teste do Micronúcleo em Célula de Mamífero <i>in vitro</i> (OECD 487)

2.4.1 Pele Humana Reconstruída *in vitro*

Em razão das mudanças regulatórias apresentadas anteriormente, os modelos *in vitro* mostraram ser ferramentas úteis e eficazes para estudos em pesquisa, porém técnicas

convencionais baseadas em cultura de células, como culturas em monocamadas (2D), não são representantes fidedignos a morfologia complexa e os aspectos organizacionais da pele humana. Acredita-se que um modelo tridimensional de pele humana reconstruída seja um candidato promissor, pois seu desenvolvimento e cultivo além de ser realizado em um ambiente tridimensional, assim como a pele humana, expressa diferentes receptores, tem capacidade proliferativa, síntese de matriz extracelular e funções metabólicas (BROHEM et al., 2011; FERNANDEZ et al., 2014).

Os primeiros modelos *in vitro* envolveram queratinócitos humanos oriundos de cultura de células primárias, onde se proliferavam e diferenciavam na derme profunda. O modelo ficou intitulado como equivalente vivo da pele, amplamente utilizados em clínicas para queimaduras graves e feridas crônica. Em busca de melhorias, foi desenvolvido o cultivo dos queratinócitos de cultura primária (extraídos de biópsia de pele humana) em uma membrada de suporte, que permitisse a proliferação e diferenciação na epiderme humana reconstruída. Modelos comerciais estão disponíveis envolvendo as duas abordagens, como EpiSkin®, EpiDerm®, SkinEthic® (BROHEM et al., 2011; FLATEN et al., 2015).

Atualmente existem modelos que representam a espessura total da pele. Sobre matrizes de colágeno povoadas de fibroblastos (representando a derme) e uma justaposição epidérmica povoada por queratinócitos, representando a epiderme. Os modelos com espessura total são comercializados e podem ser aplicados a estudos de interação célula-célula, proliferação e diferenciação celular, triagem de desenvolvimento de formulação farmacológicas, modelos cosméticos, fotoenvelhecimento, sensibilidade aos RUV e câncer de pele, além da possibilidade de serem manipulados facilmente, podendo servir de pilares para modelos com alterações genéticas específicas. Alguns distúrbios de pele também podem colher benefícios ao utilizá-los, como estudos para vitiligo, queloides, genodermatoses e epidermólise bolhosa (BROHEM et al., 2011; FLATEN et al., 2015; PELLEVOISIN; BOUEZ; COTOVIO, 2018).

Atualmente, com o constante avanço das pesquisas, modelos de pele in vitro foram aperfeiçoados, agregando diferentes tipos de células, como melanócito e precursores das células de Langerhans, permitindo que diversas funções da pele sejam replicadas, abrangendo novos caminhos para a pesquisa. Algumas limitações ainda tornam o modelo inferior à pele humana, porém superior aos modelos em monocamada, dentre as limitações estão: a ausência de vascularização na pele, sem formação de folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas, ausência de células do sistema imunológico (BROHEM et al., 2011; PELLEVOISIN; BOUEZ; COTOVIO, 2018).

A pesquisa direcionada aos modelos levam a conhecimentos na compreensão do mecanismo a ser modelado, identificação dos componentes celulares e a procura por condições de cultura ideais para promover sua proliferação e diferenciação celular, pois o desenvolvimento envolve um período prolongado em cultura, com diferentes fatores suplementares que suprem as necessidades das células de modo necessário para proliferação e diferenciação. As linhagens celulares podem ser de origem primárias ou imortalizadas, sendo que as células primárias têm um tempo de vida limitado, limitando o número de reconstruções, além disso, dependem da permissão do Conselho de Ética para serem reproduzidas, uma vez que consistem de tecidos extraídos de biópsia humana. Em contrapartida as células imortalizadas apresentam maior reprodutibilidade. A **tabela 4** mostra as vantagens dos modelos tridimensionais de pele humana (BROHEM et al., 2011; PELLEVOISIN; BOUEZ; COTOVIO, 2018).

Tabela 4 - Vantagens dos modelos tridimensionais de pele humana. Adaptado de: RADEMACHER et al., (2018).

Trata-se de um modelo humano

Um modelo de pele 3D representa realisticamente as características estruturais da pele humana (consiste em uma epiderme totalmente diferenciada e estratificada, que mostra uma fisiologia de barreira semelhante à pele humana normal)

Sem considerações éticas importantes em relação ao uso de animais

Pode ser modificado (por exemplo, adicionando citocinas específicas e fatores de crescimento para simular condições inflamatórias e doentes)

É por si só estéril e pode ser seletivamente colonizado por microorganismos específicos

Microorganismos de interesse podem ser aplicados na superfície para estudar sua interação com uma barreira intacta ou podem ser adicionados ao meio de cultura para simular a penetração da barreira

É possível usar e estudar células derivadas de pacientes (por exemplo, queratinócitos de pacientes com dermatite atópica ou psoríase) e focar em tipos específicos de células. As células imunológicas podem ser integradas

Células portadoras de mutações intrínsecas específicas podem ser usadas (por exemplo, por interferência de RNA)

As células que superexpressam o gene de interesse pode ser usado

Modelos padronizados de pele humana estão disponíveis comercialmente

Os modelos validados e comercializados são produzidos no exterior e vendidos em kits específicos, não possibilitando o uso em algumas pesquisas que envolvem mudanças morfológicas ou moleculares. Além disso, a dificuldade para importação é um problema pertinente. Portanto, estratégias que permitam a reconstrução de pele humana em uma arquitetura tridimensional válida no Brasil, será de grande relevância para pesquisas e indústrias (PEDROSA, 2016).

2.4.2 Pele Humana Reconstruída *in vitro* no envelhecimento da pele

Pesquisas desenvolvidas por diferentes métodos mostram que modelos de pele reconstruídas são ferramentas de escolha para entender os mecanismos biológicos que acompanham e induzem o aparecimento dos sinais clínicos relacionados ao envelhecimento (PELLEVOISIN; BOUEZ; COTOVIO, 2018).

Modelos de pele reconstruídos foram utilizados para avaliar a diferença da origem e idade das células de fibroblastos na pele. Foi demonstrado que equivalentes dérmicos contendo fibroblastos papilares eram mais potentes na promoção da morfogênese de uma epiderme estratificada e diferenciada corretamente do que aqueles que continham fibroblastos da retícula derme. Essas diferenças foram ainda mais evidenciadas, à medida que a idade dos doadores de

fibroblastos aumentava. Além disso, a secreção de (MMP-1) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) aumentaram na presença de fibroblastos papilares, enquanto os níveis de MMP-3 e fator de crescimento de queratinócitos (KGF) foram maiores na presença de fibroblastos reticulares. Contudo, descobriu-se que fibroblastos papilares e reticulares exercem funções e atividades distintas na pele, podendo ter influência em processos de cicatrização e envelhecimento da pele (MINE et al., 2008).

Os Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs) são açúcares que reagem com a porção amina livre de lisina e arginina nas proteínas, ocorre de forma lenta e trata-se de um processo não enzimático de proteínas da matriz extracelular (MEC) na derme. A formação de AGEs são comuns na fisiopatologia de distúrbios relacionados ao envelhecimento, comprometendo a cicatrização e perda de elasticidade da pele. Com intenção de analisar o papel desempenhado pelos AGEs na pele, PENNACCHI *et al.*, 2015, desenvolveu uma pele reconstruída de espessura total com fibras de colágeno glicadas. Como resultado, descobriu-se que a glicação do colágeno induziu a expressão de carboximetililina (LMC) na derme e epiderme e, decorrente disso, um fenótipo de envelhecimento que consiste em uma fraca estratificação de camadas epidérmicas e vacuolização do citoplasma de queratinócitos. Além do aumento da expressão de marcadores de adesão célula-célula, como desmogleína e E-caderina, em peles glicadas (PENNACCHI et al., 2015).

Como já mencionado anteriormente, a exposição acumulada aos RUV pode induzir uma interrupção na arquitetura normal da pele e, finalmente, causar fotoenvelhecimento prematuro e até câncer de pele. Dessa forma, os efeitos dos RUV (UVB e UVA) são investigados continuamente em modelos de pele reconstruída com espessura total combinando exposição acumulada ou tratamentos específicos (PELLEVOISIN; BOUEZ; COTOVIO, 2018).

Para investigar a influência de fibroblastos cronicamente fotoexpostos na pigmentação cutânea, Bernerd e Asselineau, 2008, desenvolveram e caracterizaram um modelo funcional de

pele reconstruída pigmentada, composta por uma epiderme contendo melanócitos, cultivada em um equivalente dérmico com fibroblastos. A epiderme reconstruída em equivalentes dérmicos contendo fibroblastos de uma pele fotoenvelhecida (três cepas diferentes, doadores com mais de 70 anos de idade) foi comparada com modelos de pele reconstruída contendo fibroblastos de um jovem não exposto pele (16-21 anos, três cepas). Os dados demonstram que a presença no equivalente dérmico dos fibroblastos fotoenvelhecidos naturais, em comparação com os fibroblastos jovens não expostos, estimula a pigmentação epidérmica, conforme revelado por um aumento no conteúdo de melanina. Esses resultados sugerem claramente que os fibroblastos de uma pele exposta ao sol cronicamente podem contribuir para a hiperpigmentação observada durante o fotoenvelhecimento (BERNERD; ASSELINEAU, 2008).

Em um estudo experimental, Song et al., em 2017, explorou os efeitos antienvelhecimento de um peptídeo, denominado PAL-12. Para tal, foi utilizado um modelo de pele reconstituído completo, já validado e comercializado, o Keraskin-FT, no qual foi exposto a radiação UVB (125 mJ/cm^2) e posteriormente tratado topicamente com PAL-12. Curiosamente PAL-12 suprimiu a expressão de MMP-1 induzida por UVB e aumentou ligeiramente os níveis de expressão de colágeno-1 e fibronectina-1. Além disso, PAL-12 impediu a diminuição da viabilidade celular após a exposição à radiação. Esses resultados indicam o PAL-12 como novo candidato eficaz contra o fotoenvelhecimento cutâneo induzido por UVB (SONG et al., 2017).

Diante do exposto sobre o tema abordado, este trabalho destaca a importância e o poder da pele humana reconstruída para modelar diferentes sistemas biológicos para decifrar mecanismos complexos e desafiar diferentes hipóteses.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Padronizar um modelo de pele humana reconstruída fotoenvelhecida por Radiação Ultravioleta B a partir de linhagens de células permanentes.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a viabilidade celular do modelo e da aplicabilidade das diferentes doses de exposição à radiação UVB;
- Analisar a arquitetura histológica do modelo antes e após a exposição à radiação UVB;
- Definir marcadores e critérios para futuro estudos de fotoenvelhecimento no modelo;
- Investigar a atividade proteolítica de metaloproteinases de matriz envolvidas no processo do fotoenvelhecimento;
- Avaliar o potencial genotóxico da menor dose de exposição à radiação ultravioleta B (50mJ/cm²) no qual o modelo foi exposto.

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo

Estudo experimental *in vitro*.

4.2 Delineamento experimental

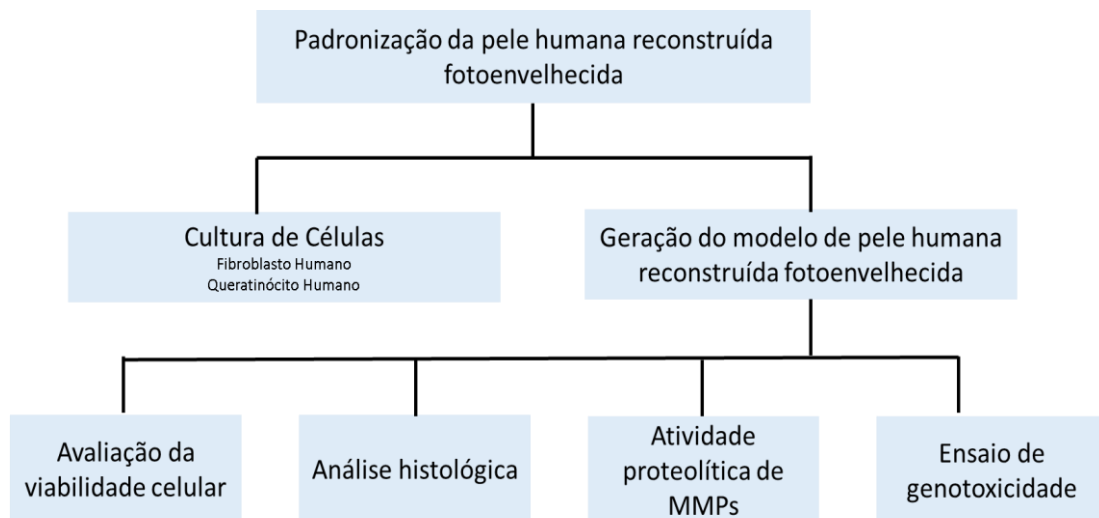


Figura 7 - Fluxograma das atividades desenvolvidas.

4.3 Padronização da pele humana reconstruída fotoenvelhecida

4.3.1 Cultura de células

O modelo de pele humana reconstruída fotoenvelhecida *in vitro* foi desenvolvido a partir da reprodução do modelo PHR-UFAM previamente desenvolvido por Sousa (2018), com modificações, no Laboratório de Atividades Biológicas – BIOPHAR. O modelo é desenvolvido a partir do cultivo de células de origem humana de fibroblasto humano (MRC5) e queratinócitos humanos (HaCat) de linhagens permanentes, oriundas do banco de células da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas. Para análise proteolítica de

metaloproteinases, foi utilizado o cultivo de células de fibrosarcoma humano (HT1080) de linhagens permanentes, oriundas do banco de células da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

A linhagem celular MRC5 e HT1080 foram cultivadas e mantida em garrafa apropriada para esta finalidade e a linhagem celular HaCat foi cultivada em garrafas estéreis para cultura celular cobertas com colágeno do tipo IV. As células foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico Penicilina/Estreptomicina, mantidas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂.

Para manutenção das peles em cultivo, o meio de cultivo RAFT foi preparado de acordo com Souza (2018), com modificações.

4.3.2 Geração da pele humana reconstruída fotoenvelhecida

Inicialmente, para elaboração do modelo PHR-UFAM foi utilizado mistura de colágeno tipo I (700 µL), tampão de reconstituição (contendo NaOH 0,05 M; NaHCO₃ 2,2%; HEPES 200 mM - 108 µL) e mistura de nutrientes HAM-F12 10x (108 µL por pele), em que serão adicionadas às células cultivadas de MRC5 (na proporção de 25 x 10⁴), ressuspensas em Soro Fetal Bovino (50 µL por pele). A combinação de meio, tampão de reconstituição, nutrientes e células, serão transferidos para uma placa contendo insertos do tipo *transwell* (no qual permite o crescimento celular em três dimensões) e será mantido em estufa a 37°C com injeção de 5% de CO₂ por um tempo de 30 minutos. Tempo necessário para atingir o objetivo de gelificação do colágeno e estabilização do pH (modificado de SOUSA, 2018).

Após os 30 minutos, foi adicionado na parte externa do inserto 1300 µL de meio de cultivo RAFT (acrescido de Toxina colérica 1 µM, Insulina 5 mg/mL, Apo-transferrina 1 mg/mL, Hidrocortisona-21 0,1 mg/mL, Epidermal Growth Factor 2 µg/mL e Transforming growth

fator- α TGF- α , 100 $\mu\text{g/mL}$). Sobre o compartimento dérmico formado, foi adicionado 100 μL por pele da mistura de colágeno IV em meio de cultura DMEM e levado a estufa por 1 hora. Após o tempo determinado, foi plaqueado suspensão de células HaCat (50×10^4) em meio de cultivo RAFT, 300 μL por pele (**Figura 8**) (modificado de SOUSA, 2018).

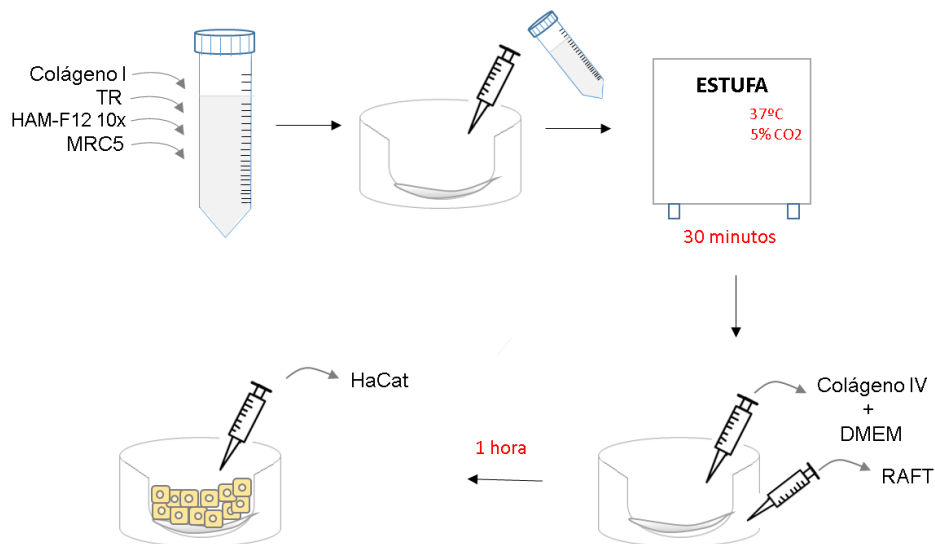


Figura 8 - Representação esquemática para reconstrução de derme e epiderme. Uma mistura de colágeno I, nutrientes e fibroblasto humano (MRC5) serão transferidos para uma placa contendo insertos do tipo transwell e levados à estufa por 30 minutos. Em seguida, foi diluído e depositado colágeno IV sob a derme formada e adicionado meio de cultivo na parte externa do inserto, e levado a estufa por 1 hora. Após o tempo, foi depositado queratinócitos humanos na parte interna do inserto. Fonte: a autora.

As células foram mantidas por 24 horas submersas meio de cultivo RAFT em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Posteriormente, o RAFT foi retirado do interior do inserto e substituído por meio RAFT contendo também vitamina C (1 μL por pele), promovendo uma superfície ar-líquida necessária para estratificação da epiderme. A pele foi mantida por 10 dias em estufa a 37°C com injeção de 5% de CO₂ para diferenciação dos queratinócitos da epiderme. A troca de meio de cultura da parte externa ao inserto foi realizada a cada dois dias (modificado de SOUSA, 2018).

Posteriormente aos 10 dias de cultivo, foi retirado o meio de cultura disposto na placa e trocado por Tampão Fosfato Salino (PBS), onde as peles foram expostas à radiação ultravioleta B, emitidas por lâmpada Philips modelo TLK 40W/12R – UVB equipados com um filtro acetato

de celulose (Kodacel). As doses utilizadas foram 50mJ/cm², 150mJ/cm², 500mJ/cm² e 1500mJ/cm². Sendo, o tempo de exposição à radiação calculado de acordo com o guia OECD 432:

$$t \text{ (min.)} = \frac{\text{dose de irradiação (J/cm}^2\text{)} \times 1000}{\text{irradiância (mW/cm}^2\text{)} \times 60}$$

A intensidade da luz (irradiância) foi avaliada antes de cada ensaio, utilizando um medidor de ultravioleta de banda larga (modelo MRU-201) devidamente calibrado para esta finalidade. O tempo de exposição à luz é calculado através da aplicação na fórmula mencionada acima, como resultado obtivemos o tempo em minutos (OECD, 2004).

Após os devidos tempos de exposição, as peles retornaram para estufa, substituindo o PBS da parte externa do inserto por meio de cultivo RAFT, por 24 horas. Após esse período, os métodos propostos abaixo foram realizados com o propósito de avaliar os efeitos da radiação ultravioleta B no modelo de pele humana reconstruída *in vitro*.

4.3.3 Condições para Padronização do modelo

Durante o processo de padronização do modelo, foi analisado o tempo de cultivo das peles em estufa após a realização da montagem. Foram testadas as seguintes condições: 10 dias, 15 dias e 18 dias de cultivo. Os resultados foram analisados por análise histológica.

4.4 Análise histológica

Com o propósito de analisar morfológicamente os tecidos modificados por exposição à radiação, o controle utilizado foi a pele não exposta a RUV, denominada de NE.

As amostras da pele fotoenvelhecida foram isoladas em cassetes e imersas em recipiente contendo formol tamponado a 10%, durante 24 horas (PENNACCHI et al., 2015).

Após a fixação no formol, a pele reconstruída foi desidratada em álcool em sucessão crescente de porcentagem e limpa com xilol, em seguida, incluídas em parafina fundida a 60°C, onde foram formados os blocos parafinados após resfriamento. Os blocos formados foram incluídos em um micrótomo, onde procedeu-se cortes histológicos sucessivos de 3 - 4 mm de espessura e transferidos para o banho-maria para serem distendidos e dispostos em lâminas de microscopia limpas e identificadas, levados a estufa a 60°C até secagem (SOUZA, 2018; PENNACCHI et al., 2015).

As lâminas foram coradas segundo as técnicas de coloração de hematoxilina e eosina para análise histológica por microscopia multifotônica.

4.5 Avaliação da viabilidade celular pelo método MTT

O ensaio quantitativo MTT foi realizado para avaliar a viabilidade celular das peles reconstruídas após a exposição à radiação ultravioleta B. Realizado conforme o guia OECD 439 (2010), com modificações, as peles reconstituídas foram colocadas em 300 µl de solução MTT (3-[4,5- dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazoliobrometo) durante 2 horas. O MTT é convertido em formazan azul pelas células viáveis. O produto de formazan azul precipitado é então extraído da amostra utilizando 2 mL do solvente isopropanol por 1 hora. A concentração de formazan é medida pela determinação da densidade óptica a 570 nm utilizando um leitor de placas.

Como controle negativo foi utilizada a pele não exposta a radiação (NE) e para controle positivo foi utilizado um agente sensibilizante, o brometo de 4-nitrobenzila (3,7 µg/mL) (SOUSA, 2018).

4.6 Atividade Proteolítica de Metaloproteinases

Para investigar a atividade proteolítica das MMPs 2 e 9 foram aplicados o método da zimografia. A técnica foi realizada a partir do sobrenadante obtido após 24 horas de exposição das peles à radiação. A técnica consiste em eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (10%), copolimerizado com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e com a gelatina como substrato (1%), no qual foram aplicados 30 µg de proteína (dosadas previamente pelo método de Bradford) por canal. A eletroforese foi conduzida a condições de 120 V por 1 hora e 30 minutos. Após a eletroforese, as enzimas foram renaturadas pela remoção do SDS através da lavagem do gel duas vezes, durante 15 minutos com Triton X-100. Em seguida, o gel ficou incubado com solução previamente preparada (0,05 M TrisHCl - pH 8, 5 mM CaCl₂, 5 µM ZnCl₂), *overnight*, a 37°C. Posteriormente, o gel foi corado com uma solução de azul brilhante de Comassie 0,5% sob agitação, por 30 minutos. Após a coloração, o gel foi descorado em solução de metanol 10% e ácido acético 10% até a percepção das bandas claras formadas. As quantificações das bandas foram analisadas por densidade óptica de pixels no *software* ImageJ, para isso, o gel foi digitalizado (**Figura 9**) (KUPAI et al., 2010; VANDOOREN et al., 2013).

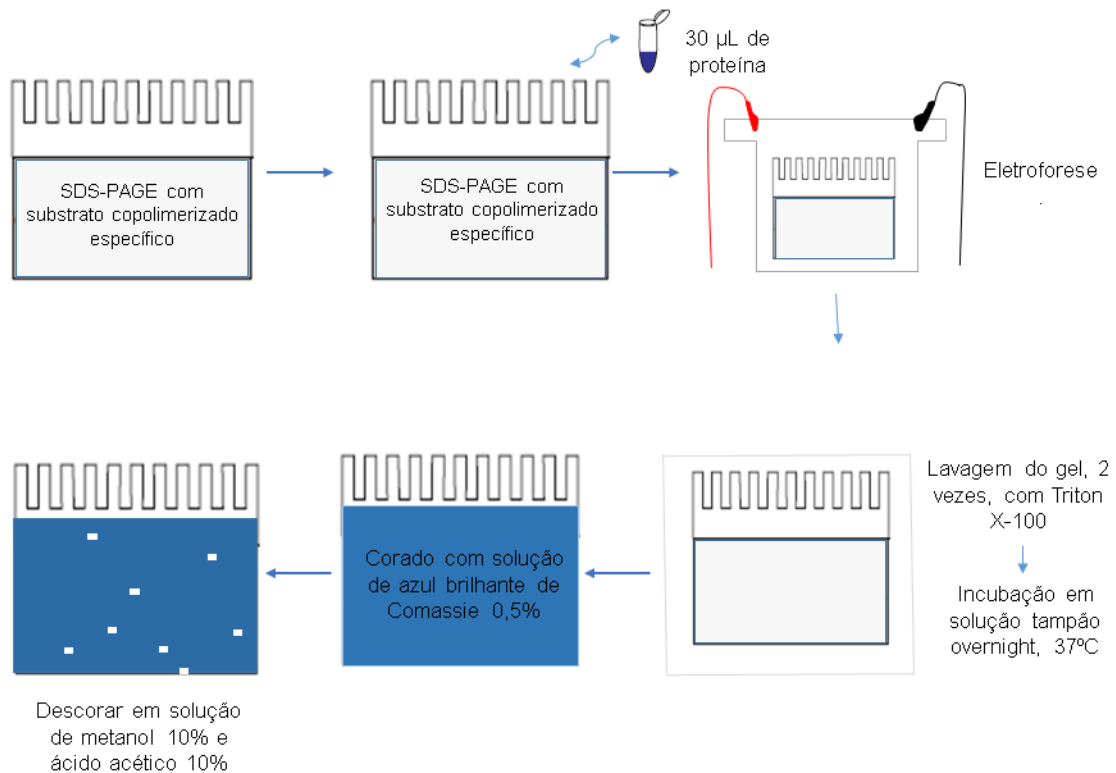


Figura 9 - Zimografia de gel com substrato específico. O substrato é incorporado no gel de SDS-PAGE (gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio). Aplicado 30 µL de proteína por canal. Submetidos a eletroforese a 120V por 1 hora e 30 minutos. Lavagem do gel duas vezes com Triton X-100. Após o gel foi incubado com solução de incubação à temperatura de 37°C para o desenvolvimento da reação proteolítica. O gel foi corado e descorado, e as bandas proteolíticas aparecem em um fundo escuro. Fonte: a autora.

O controle negativo utilizado foi o sobrenadante da pele não exposta a radiação. Foi utilizado a célula HT1080 em um modelo de monocamada para marcação das MMPs no gel, uma vez que, essas células expressam altas quantidades de MMP-2 e 9 (TAKAHASHI; TAKEDA; IMAI, 2013).

4.7 Ensaio cometa em pH alcalino

Os modelos de pele reconstruída fotoenvelhecida foram submetidas à degradação enzimática utilizando colagenase (1mg/mL) com tampão fosfato-salina (PBS) em banho-maria a 37°C por 30 minutos, para a obtenção de um concentrado celular foi centrifugado e obtido o

sobrenadante. Este sobrenadante, posteriormente, foi utilizado para o método descrito a seguir (SOUZA, 2018).

O concentrado celular (50 μ L) foi incorporado a uma solução de agarose de baixo ponto de fusão. Em seguida, o obtido foi colocado em lâmina de microscopia pré-revestida com agarose 1%, de ponto de fusão normal. Sobre a lâmina foram colocadas lamínulas até a solidificação da agarose em temperatura ambiente. Após o tempo de solidificação, as lamínulas foram removidas e as lâminas imersas em uma solução de lise previamente preparada por 1h, contendo 2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA, 10 mM Tris base, 1% Triton X-100, com ajuste para pH 10, a 4°C. Após a lise, as lâminas foram lavadas três vezes, cinco minutos cada vez, com solução tampão (40mM HEPES, 100 mM KCl, 0,5 Mm EDTA, 0,2 mg/mL BSA, com ajuste para pH 8) (SOUSA, 2018).

Em seguida, as lâminas foram dispostas em posição horizontal em uma cuba de eletroforese preenchida com solução de eletroforese por 20 minutos para permitir o relaxamento do DNA. A eletroforese foi conduzida por 20 minutos, com condições de 25 volts e corrente de 300 mA (SOUSA, 2018).

Após a eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e imersas em solução tampão de neutralização (0,4 M de Tris, com ajuste para pH 7,5) durante cinco minutos e fixadas em etanol 100% (SOUSA, 2018).

Para análise dos dados, as lâminas foram lidas no microscópio de fluorescência, utilizando 40 μ L da solução de Syber Green. A análise dos dados foram realizadas através escores padrão determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa formado, no qual indica o grau de quebra do DNA, sendo 0 – sem dano, 1 – cauda inferior ao diâmetro do nucleóide, 2 – cauda de tamanho igual ao diâmetro do nucleóide, 3 – cauda maior que o diâmetro do nucleóide, 4 – o tamanho da cauda é o dobro ou o triplo do tamanho do diâmetro do nucleóide (SOUZA, 2018).

Foram contados 50 cometas por lâmina e os resultados foram expressos de acordo com o índice do dano (ID) e frequência do dano (SOUZA, 2018):

$$\text{ID} = 0 \times (\text{no de cometas grau 0}) + 1 \times (\text{no de cometas grau 1}) + 2 \times (\text{no de cometas grau 2}) + 3 \times (\text{no de cometas grau 3}) + 4 \times (\text{no de cometas grau 4})$$

$$\text{Frequência do dano} = 100 - (50 - \text{no de cometas do grau}) * 100/50$$

Sendo, a frequência de dano calculada como a porcentagem de todos os tipos de cometa encontrado (grau 0 a grau 4) em relação ao total de cometas contados (50 em cada lâmina).

Como controle negativo, foi utilizado a pele não exposta a radiação e o controle positivo a pele tratada por 3 horas com etilmetanossulfonato (SEM - 10 μM), um mutagênico químico (SOUZA, 2018).

4.8 Análise estatística

Os resultados de todos os ensaios foram expressos como média \pm desvio padrão e analisados estatisticamente, usando o software GraphPad Prism 6. Para análise de dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Os demais testes foram utilizados ANOVA *oneway* seguido do teste de Tukey (índice do dano), ANOVA *twoway* seguido do teste de Sidak (zimografia) e ANOVA *twoway* seguido do teste de Tukey (frequência do dano). Foram considerados estatisticamente significativos os resultados com *p value* < 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 Padronização da pele humana reconstruída fotoenvelhecida

Para a geração do modelo, os insertos com membrana *transwell* eram inseridos nos poços de placas de cultivo de 12 poços. Células de MRC5 (25×10^4 por pele) de cultura permanente foram depositadas nos insertos juntamente com colágeno tipo I, tampão de reconstituição e HAM F12 10x. Meio de cultivo RAFT contendo diversos fatores de crescimento (citado anteriormente no item 4.3.2) foi adicionado na parte externa do inserto. Sobre o compartimento dérmico formado foi adicionado 100 μ L por pele da mistura de colágeno IV em meio de cultura DMEM e posteriormente foi plaqueado suspensão de células HaCat (50×10^4) em meio de cultivo RAFT. A pele foi mantida em estufa sob interface ar-líquido por 10 dias com meio de cultivo RAFT acrescido de vitamina C.

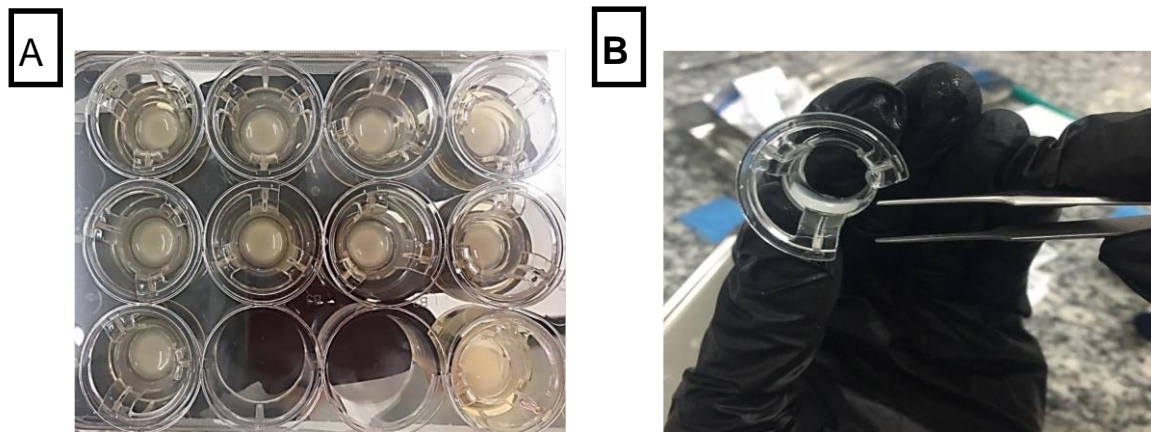


Figura 10 – Cultivo do modelo de pele humana reconstruída. A) Insertos com membrana *transwell* inseridos em placas de cultivo celular de 12 poços. B) Modelo de pele humana reconstruído após 10 dias de cultivo celular.

O tempo de cultivo da pele em estufa foi determinante para a padronização do modelo. Três condições diferentes foram testadas, discordante apenas no tempo de cultivo, e posteriormente avaliadas por meio de análise histológica (**Figura 11**).

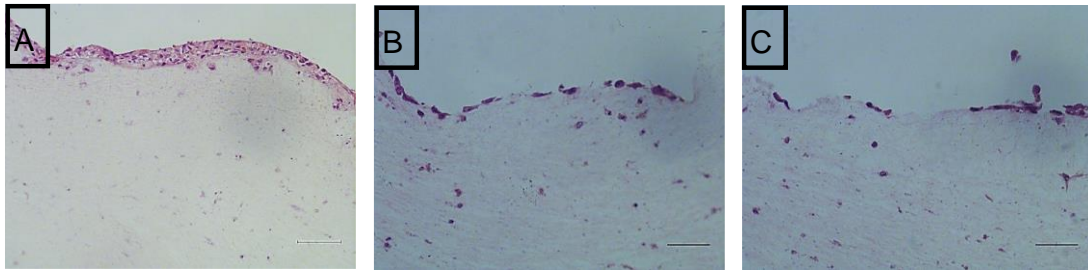


Figura 11 - Padronização do tempo de cultivo da pele humana reconstruída. Todas as condições de cultivo e processamento histológicos realizados foram iguais, exceto o tempo de cultivo que a pele permaneceu em estufa após a montagem. A) 10 dias de cultivo; B) 15 dias de cultivo; C) 18 dias de cultivo. Aumento 20x (barra = 50 μ m).

Analisando as condições testadas, a condição que melhor representou a estrutura morfológica da pele humana, com epiderme e derme, em uma maior quantidade de células foi a condição (A), representando 10 dias de cultivo. A condição (B) e (C) não houve formação de epitélio contínuo. Desta forma, a condição de cultivo de 10 dias foi selecionada para a continuidade do projeto.

Dando continuidade à padronização do modelo, após os 10 dias, as peles foram expostas à radiação ultravioleta B nas doses de 50mJ/cm², 150mJ/cm², 500mJ/cm² e 1500mJ/cm².

O tempo de exposição foi definido de acordo com a aplicação na fórmula, e variou a cada repetição, pois a irradiância varia e é medida antes de cada experimento. Uma vez que foram realizados três experimentos independentes, a **tabela 5** mostra a média da triplicata dos experimentos em cada dose de exposição à radiação UVB.

Tabela 5 - Exposição à radiação ultravioleta B. O tempo de exposição sob cada condição seria exposta a radiação foi calculado pela aplicação na fórmula. A irradiância é medida antes de cada experimento, utilizando um medidor de ultravioleta. \pm

Dose de irradiância	Irradiância	Tempo de exposição
0,05J/cm ² ou 50mJ/cm ²	0,68 mW/cm ²	1 minuto e 13 segundos
0,15 J/cm ² ou 150mJ/cm ²	0,68 mW/cm ²	3 minutos e 40 segundos
500mJ/cm ²	0,68 mW/cm ²	12 minutos e 15 segundos

1500mJ/cm ²	0,53 mW/cm ²	47 minutos e 12 segundos
------------------------	-------------------------	--------------------------

Após a exposição, as peles retornaram para estufa por 24 horas. Após esse período, foram realizadas as análises de viabilidade celular das peles.

5.2 Avaliação da viabilidade celular das peles

A citotoxicidade das diferentes doses de radiação foi analisada utilizando o ensaio de MTT. A viabilidade celular da pele não exposta (NE) foi de 100%, enquanto houve uma pequena redução na viabilidade nas doses menores (50mJ/cm² e 150mJ/cm²). Já os resultados das maiores doses (500mJ/cm² e 1500mJ/cm²) apresentaram uma redução da viabilidade celular em mais de 50% (**Figura 12**).

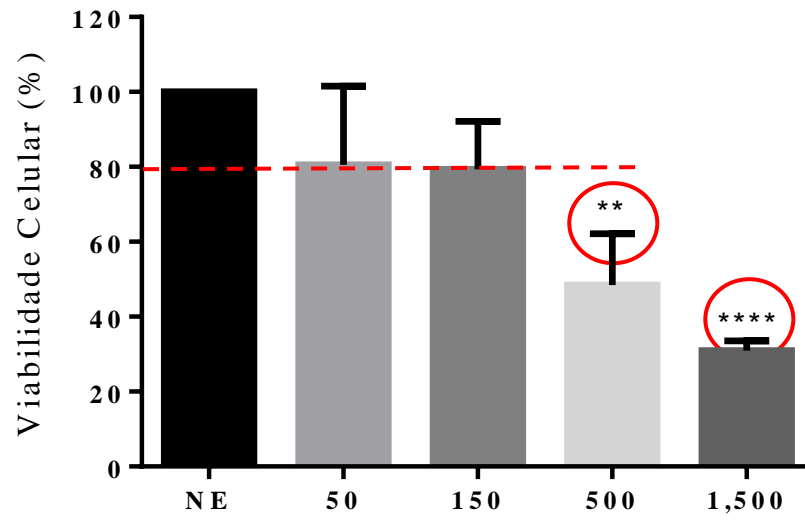


Figura 12 - Citotoxicidade das doses de radiação. NE = Pele não exposta a radiação; 50mJ/cm²; 150mJ/cm²; 500mJ/cm²; 1500 mJ/cm². ****p<0,001 foi considerado estatisticamente significativo quando comparado ao controle da pele não exposta. Utilizou-se ANOVA oneway seguido do teste de Kruskal-Wallis.

As doses escolhidas para radiação UVB causaram diferenças visíveis na histologia da pele, compatíveis com os dados de citotoxicidade do ensaio MTT (**Figura 13**).

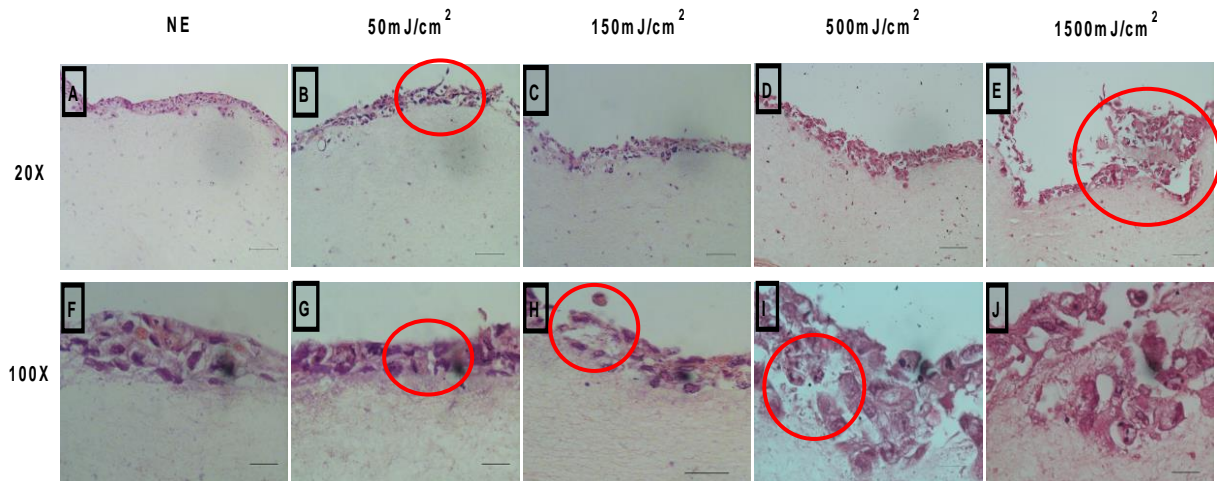


Figura 13 - Efeitos da radiação UVB na pele humana reconstruída. Fotomicrografia de cortes histológicos corados por Hematoxilina-Eosina (HE). A) NE, não exposta, controle negativo; B) 50mJ/cm²; C) 150mJ/cm²; D) 500 mJ/cm²; E) 1500 mJ/cm². Aumento de 20x (barra: 50µm). F) NE, não exposta; G) 50mJ/cm²; H) 150mJ/cm²; I) 500 mJ/cm²; J) 1500 mJ/cm². Aumento de 100x (barra = 10µm).

Observou-se que, em doses maiores, 500mJ/cm² e 1500mJ/cm², a radiação UVB causou a diminuição da espessura do epitélio, separação e vacuolização das células na camada epitelial. Ao ocasionar o espessamento do epitélio, invadiu a matriz com colágeno e ocasionou danos,

lembrando uma degeneração basofílica do colágeno. Também podemos observar a presença de núcleo picnótico (**Figura 13**).

Nas doses de $50\text{mJ}/\text{cm}^2$ e $150\text{mJ}/\text{cm}^2$, os danos observados são menores, porém há uma pequena presença de vacuolização das células na camada epitelial. São observados células com características de queimadura solar correspondentes a queratinócitos apoptóticos. Resultado que condiz com o encontrado no ensaio de viabilidade celular por MTT (**Figura 13**).

Em todas as doses de UVB estudadas houve alteração na camada epidérmica e pequena vacuolização. Observa-se que a grandeza do dano é dose-dependente (**Figura 13**).

5.3 Atividade Proteolítica de Metaloproteinases

A atividade enzimática de MMP-2 e MMP-9 foi avaliada por método zimográfico. Com a utilização da técnica foi possível analisar a atividade de metaloproteinases de matriz extracelular 2 e 9 (**Figura 14**). Na menor dose de exposição à radiação, $50\text{mJ}/\text{cm}^2$, houve um aumento significativo da atividade das MMPs em relação ao controle não exposto. O aumento das atividades de metaloproteinases não foi correlacionada com o aumento das doses de exposição à radiação ($50\text{mJ}/\text{cm}^2$, $150\text{mJ}/\text{cm}^2$, $500\text{mJ}/\text{cm}^2$ e $1500\text{mJ}/\text{cm}^2$). Este resultado pode ser explicado devido à redução da viabilidade celular mostrado no método MTT (item 5.2), pois a medida que diminui a quantidade de células viáveis, pode ocorrer a diminuição da atividade de MMPs.

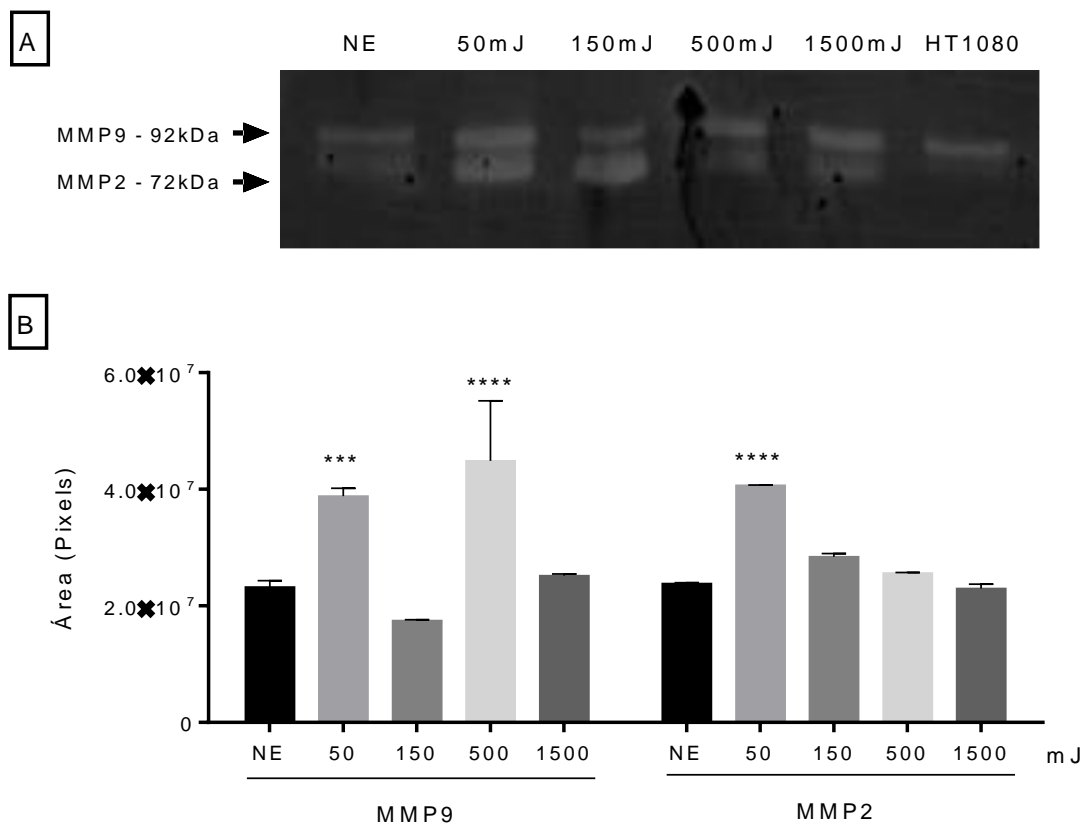


Figura 14 - Atividade de MMP-2 e 9 em modelos tridimensional de pele humana reconstruída e em monocamada (HT1080). A) Bandas formadas após a degradação enzimática de MMPs em gel de gelatina. B) Atividade de MMPs 24 horas após a exposição à radiação ultravioleta B. **** $p < 0,001$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado ao controle da pele não exposta. Utilizou-se ANOVA twoway seguido do teste de Sidak.

5.4 Avaliação da genotoxicidade

A dissociação das células com colagenase 1mg/mL foi necessária para obter células suficientes para o ensaio do cometa em pH alcalino. No controle negativo, foi utilizado o concentrado celular da pele não exposta a radiação e no controle positivo foi utilizado a pele previamente tratada por 3h com EMS, antes de ser realizado a degradação do tecido.

Apenas a menor dose de radiação foi utilizada para este ensaio (50mJ/cm²). A dose de exposição utilizada desencadeou atividade genotóxica, com resultados semelhantes ao controle positivo (**figura 15**). A média \pm desvio padrão do índice de dano foi de $93 \pm 12,61$ e $101 \pm 5,85$,

para $50\text{mJ}/\text{cm}^2$ e EMS, respectivamente. Resultados com significância em relação ao controle negativo.

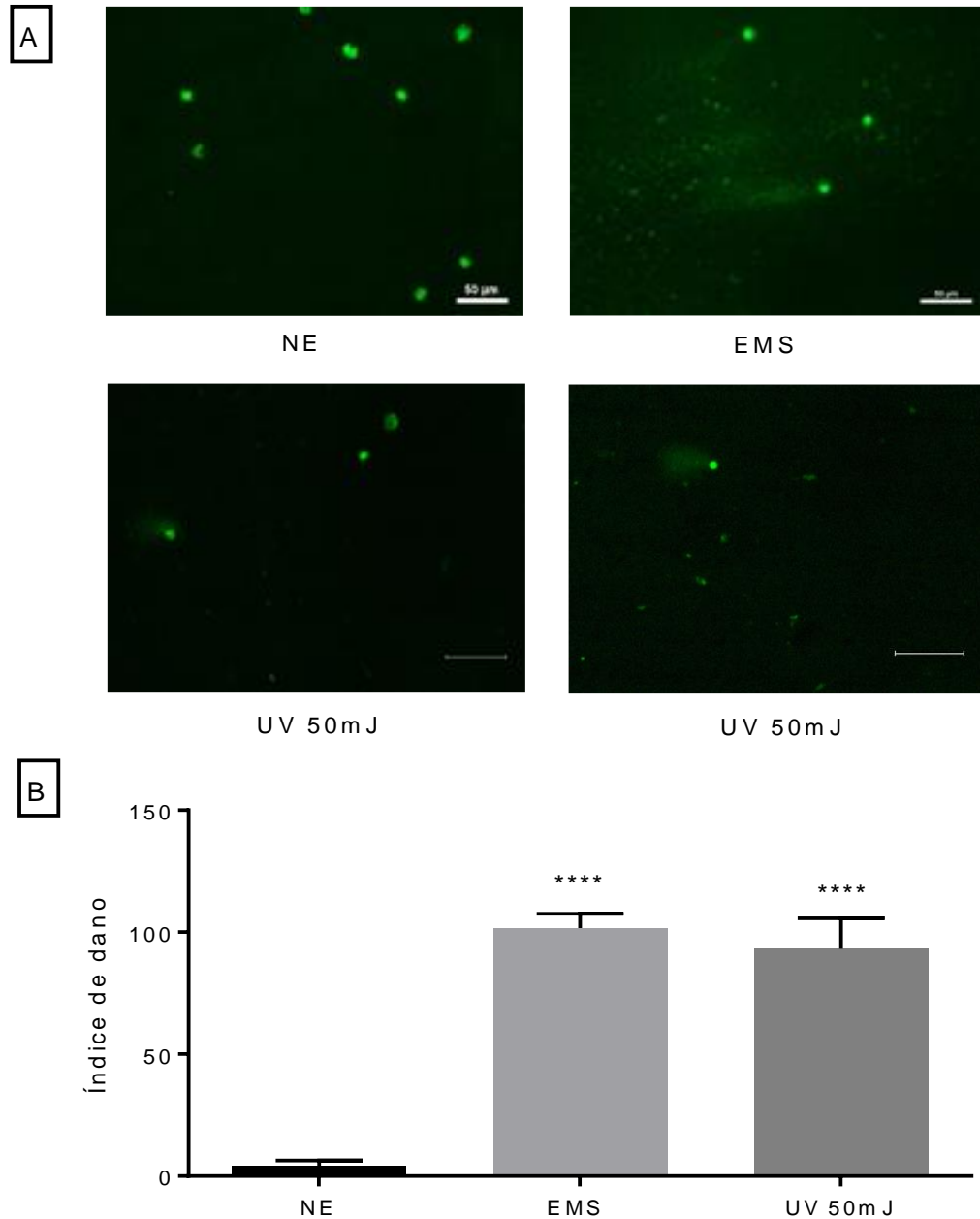


Figura 15 - Efeito da radiação UVB exposta a pele reconstruída na fragmentação do DNA pelo ensaio cometa alcalino. A) Fotomicrografias dos danos na pele não exposta a radiação, pele tratada com (EMS) e da pele exposta a UVB em pH alcalino. B) Índice do dano causado pelo ensaio cometa em pH alcalino. **** $p < 0,001$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado ao controle da pele não exposta. Utilizou-se ANOVA oneway seguido do teste de Tukey.

A frequência do dano encontrado na pele exposta a radiação variou entre todos os danos possíveis, do grau 0 ao 4. Onde obteve uma frequência de $31,2 \pm 11,50$ no grau 0 e $25,3 \pm 4,50$

no grau 4 (**figura 16**). Indicando que, mesmo na menor dose foi possível observar dano ao material genético.

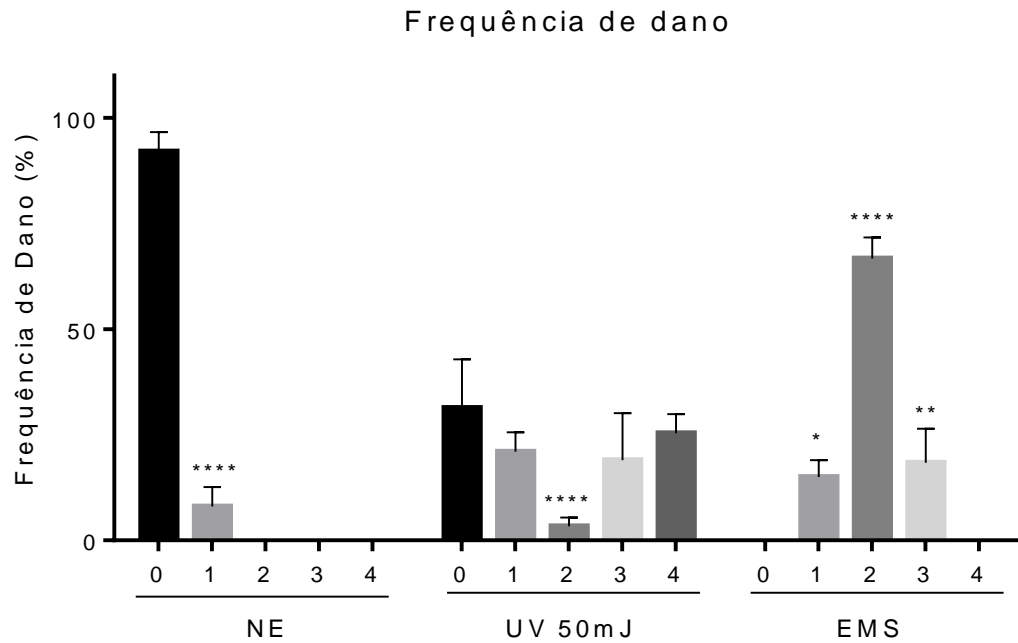


Figura 16 - Frequência do dano causado ao DNA pelo ensaio cometa em pH alcalino. A frequência do dano é expressa em porcentagem (%), sendo a variação do grau 0 a 4 de fragmentação do DNA. **** $p < 0,001$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado ao controle da pele não exposta. Utilizou-se ANOVA twoway seguido do teste de Tukey.

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho analisamos um modelo de pele humana reconstruída como plataforma para estudos de fotoenvelhecimento. Dessa forma, o foco do trabalho foi realizar a padronização do modelo e posteriormente avaliar os efeitos causados pela radiação ultravioleta no mesmo.

A pele obtida após as alterações no protocolo, utilizando cultura de células permanentes, mostrou-se semelhante aos modelos de pele humana reconstruída *in vitro* comercialmente disponíveis, oriundos de cultura de células primárias, conforme descreve BROHEM et al., 2011, quanto a presença de uma epiderme constituída de várias camadas de queratinócitos e uma matriz dérmica composta de fibroblastos embebidos em colágeno, embora a pele desenvolvida neste trabalho não apresentou a formação da camada externa, composta por células anucleadas, o estrato córneo.

Segundo Brohem et al., (2011), células da pele cultivadas em monocamadas não conseguem capturar a complexidade do microambiente *in vivo* pois ficam isentas de algumas funções importantes como a expressão de receptores da superfície celular, capacidade proliferativa, síntese da matriz extracelular, densidade celular e funções metabólicas. Embora, não obtenha o processo completo de proliferação, diferenciação, morte e derramamento celular, as funções de proliferação e diferenciação podem ser observadas no presente trabalho, por meio de análises morfológicas, onde ocorre a compartimentação em várias camadas representando diferentes estágios na maturação dos queratinócitos, dado que, essas células crescem dentro de uma matriz tridimensional organizada (3D), continuamente cercada por células vizinhas, semelhantes a pele humana *in vivo*.

Um aspecto interessante observado no modelo foi o menor tempo necessário ao desenvolvimento do epitélio (10 dias em cultivo) quando comparado com os modelos comercializados, EpiDermTM e SkinEthic (14 a 17 dias, respectivamente), ambos desenvolvidos

a partir de cultura de células primárias (PONEC, 2002; PEDROSA, 2016). Após o tempo de cultivo acima de duas semanas, os modelos de pele humana reconstruídos *in vitro*, já comercializados, permanecem viáveis e a espessura do estrato córneo aumenta gradualmente conforme o tempo em cultivo. Entretanto, no presente trabalho, foi realizado experimentos com condições de cultivo de 15 e 18 dias, e não foi possível obter esse aumento e conseqüentemente não ocorreu a formação do estrato córneo, além disso, com a extensão das peles em cultura acima de 10 dias, não houve a formação contínua do epitélio.

A importância da interação de queratinócitos e fibroblastos vem sido destacada, pois fatores solúveis liberados pelos fibroblastos afetam a morfologia da epiderme. A diferenciação dos queratinócitos é afetada pelos fibroblastos e a síntese de elastina pelos fibroblastos é influenciada pelos queratinócitos (BROHEM et al., 2011; DIEKMANN et al., 2016). Portanto, durante um período de 10 dias essa interação de fibroblastos e queratinócitos co-cultivados em um substrato dérmico de colágeno, na interface ar-líquido, permitiu o crescimento e diferenciação de células, a forma e função do tecido.

Células HaCat oriundas de cultura de células permanente são consideradas funcional em modelos de pele, porém possuem uma capacidade insuficiente em produzir epitélio cornificado maduro organizado, podendo ser responsáveis pela incapacidade em gerar o estrato córneo. Essa incapacidade foi observada no modelo desenvolvido, levando a uma organização desordenada do tecido, incluindo a presença de células arredondadas com núcleos de formas anormais e, além disso, após o período prolongado em cultivo, acima de 10 dias, não houve a formação do epitélio. Mesmo com esta limitação, a utilização dessas células (HaCat) são vantajosas em relação a modelos que utilizam células de cultura primária, pois possuem vida útil limitada e diferenças na maturação epitelial, dependendo do fototipo do doador e da localização anatômica do tecido de origem, impossibilitando serem expandidas para as grandes

quantidades e podendo ocorrer variações intra e interlaboratoriais (BROHEM et al., 2011; STARK et al., 2004).

A dose de radiação UVB $50\text{mJ}/\text{cm}^2$ é considerada a dose eritematosa mínima, que pode ser definida como a menor quantidade de energia eritematogênica efetiva, suficiente para produzir a primeira reação perceptível de eritema (MARIONNET; TRICAUD; BERNERD, 2015). Por este motivo, a dose foi escolhida para os experimentos executados nesse trabalho, dando seguimento em uma curva dose-resposta de radiação. De acordo com o demonstrado na análise histológica, após 24 horas de exposição à radiação UVB, foram visualizadas alterações na camada da epiderme correspondente a queratinócitos apoptóticos. Esse resultado foi compatível com os obtidos por Marionnet, Tricaud e Bernerd (2015), em um modelo de pele L'oreal, reconstruídos a partir de células primárias utilizando a mesma exposição de $50\text{mJ}/\text{cm}^2$ de UVB, onde foi citado que as células queimadas se apresentam com forma arredondada, citoplasma eosinofílico, núcleo condensado e localização suprabasal.

A formação dessas células foi associada à presença de lesões no DNA, como CPDs e 6,4 P-P imediatamente após a exposição. Esse dano foi relacionado a consequências deletérias subsequentes exposição ao sol (MARIONNET; TRICAUD; BERNERD, 2015). Neste trabalho, os danos foram analisados pelo ensaio cometa em pH alcalino, onde foi possível identificar lesões no DNA das células. Indicando que, mesmo na menor dose foi possível observar dano ao material genético.

No modelo comercializado EpiDermFT exposto a dose única de 252 e $378\text{mJ}/\text{cm}^2$ de um simulador solar contendo UVA e UVB foram observados a extensa formação de CPDs em tecidos EpiDermFT imediatamente após a exposição. Como os comprimentos de onda UVB não penetram significativamente pele humana além da epiderme, a formação de CPDs na derme implica no componente UVA do simulado solar como agente causador (ARMENTO et al., 2015). Neste trabalho não foram analisados danos específicos do tipo CPDs, mas os resultados

sugerem um acúmulo substancial de DNA fragmentado após submetido a eletroforese, onde o aumento da cauda do cometa indica o grau de fragmentação do DNA, observados após a exposição da pele a uma dose de UVB de $50\text{mJ}/\text{cm}^2$ e no uso do controle positivo. A pele não exposta à radiação não ocorreu essa fragmentação, sendo observados apenas danos de grau 0.

A redução da viabilidade celular causada por UVB em modelos de pele já comercializados (KeraSkin™-FT) a uma dose de $150\text{mJ}/\text{cm}^2$ foi ligeiramente reduzida, resultado consistente com os dados do MTT apresentados neste trabalho, onde as doses de $50\text{mJ}/\text{cm}^2$ e $150\text{mJ}/\text{cm}^2$ foram reduzidas em quase 80%, porém apenas as demais doses ($500\text{mJ}/\text{cm}^2$ e $1500\text{mJ}/\text{cm}^2$ foram consideradas reduções estatisticamente significativas. Além disso, a pele KeraSkin™-FT fotoenvelhecida apresentou um aumento da produção de MMPs 1, 2 e 9 (PARK et al., 2016). O aumento da atividade proteolítica de MMP-9 também foi observado após a exposição a $50\text{mJ}/\text{cm}^2$. Em contrapartida, essa degradação não teve correlação gradual de acordo com o aumento da dose de exposição testada.

Segundo LEE et al., (2019), a exposição da pele reconstruída *in vitro* Keraskin-FT™ a $125\text{mJ}/\text{cm}^2$ de radiação UVB aumentou a expressão de metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs), como a MMP-1, MMP-2 e MMP-9. Inibidores de MMPs tem sido empregado no modelo para testar a capacidade em reduzir os efeitos do fotoenvelhecimento, inibindo a expressão de MMPs, aumentando consequentemente os níveis de colágeno I. No presente estudo, não foram utilizados compostos, porém essa possibilidade pode vir a ser testada no futuro.

Como a autenticidade dos danos induzidos ao DNA em modelos de monocamada produzem resultados positivos irrelevante, sendo necessários ainda estudos *in vivo* para confirmá-los. Os modelos em cultivo 3D são uma opção promissora para detectar danos ao material genético. Já existindo protocolos específicos para realizar o ensaio do cometa em modelos de pele validado pela OECD 439 (PELLEVOISIN; BOUEZ; COTOVIO, 2018).

Os resultados apresentados sugerem que um modelo de reconstrução cutânea completa é essencial para os experimentos cujo um dos objetivos são observar os efeitos biológicos da radiação na pele, uma vez que, a radiação ultravioleta afeta camadas diferentes da pele. Além disso, o desenvolvimento de métodos alternativos eficazes para substituir ensaios *in vivo* com animais e melhorar o cenário da pesquisa e desenvolvimento no Brasil são essenciais para o progresso (BROHEM et al., 2012; SOUSA, 2018).

7 CONCLUSÃO

Com o presente trabalho foi possível padronizar um modelo de pele humana reconstruída *in vitro* utilizando linhagem de células permanentes como plataforma de estudos de fotoenvelhecimento por meio de radiação UVB.

O modelo desenvolvido neste trabalho apresentou semelhança morfológica e estrutural tanto com a pele humana *in vivo*, como a modelos de pele *in vitro* já validados e comercializados, com epiderme e derme. Os modelos validados pela OECD são reconstruídos a partir do cultivo de células primárias, na qual podem ocorrer diferenças na maturação epitelial, dependendo do fototipo do doador e da localização anatômica do tecido de origem, além de possuir um tempo de vida útil limitado e a impossibilidade de ser expandido em grande quantidade. A reconstrução do modelo de pele a partir de linhagens de células permanentes pode melhorar a reprodutibilidade e a consistência dos modelos de pele, reduzindo as variações intra e interlaboratoriais.

Com valores de viabilidade celular dose-dependente, o modelo desenvolvido permanece funcional após a exposição à radiação ultravioleta B. Na menor dose de exposição a UVB (50mJ/cm²) foi possível identificar dois marcadores de fotoenvelhecimento, a atividade de metaloproteinases de matriz extracelular (MMP-9), responsável por degradar colágeno I e a fragmentação do material genético, por meio do ensaio cometa.

A arquitetura tridimensional do modelo permite a penetração da RUV (radiação ultravioleta), em 290 a 320nm. Demonstrando ser uma ferramenta útil para estudar as respostas biológicas de fibroblastos e queratinócitos à exposição solar UVB *in vitro* podendo estar relacionados a respostas clínicas curtas ou de longo prazo, como queimaduras solares e danos cutâneos associados ao processo de fotoenvelhecimento.

Experimentos futuros são necessários para avaliar o potencial dos danos causados pela radiação e elucidar os mecanismos envolvidos, bem como o comportamento das células expostas no microambiente tridimensional.

8 REFERÊNCIAS

ARMENTO, A. J. et al. Evaluation of Cutaneous Damage and Repair Following Acute Solar Ultraviolet Radiation Exposure: Experiments with an In Vitro Reconstructed Human Skin Model and Excised Human Skin . **Applied In Vitro Toxicology**, v. 1, n. 2, p. 109–117, 2015.

BARONI, A. et al. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 3, p. 257–262, 2012.

BERNERD, F.; ASSELINEAU, D. An organotypic model of skin to study photodamage and photoprotection in vitro. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 58, n. 5 SUPPL. 2, p. 8–12, 2008.

BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007_2010/2008/Lei/L11794.htm> Acesso em: 30 jul. 2019.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações. PORTARIA Nº 491, DE 3 DE JULHO DE 2012. Disponível em: <http://www.lex.com.br/legis_23490615_PORTARIA_N_491_DE_3_DE_JULHO_DE_2012.aspx> Acesso em: 24 de julho de 2019.

BRASIL. 2014. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 18, de 24 de setembro de 2014. Disponível em: <http://www.lex.com.br/legis_26001436_RESOLUCAO_NORMATIVA_N_18_DE_24_DE_SETEMBRO_DE_2014.aspx> Acesso em: 28 de julho de 2019.

BROHEM, C. A. et al. Artificial skin in perspective: Concepts and applications. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 24, n. 1, p. 35–50, 2011.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; DUQUE ZAMBRONE, F. A. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: Uma abordagem atual. **Revista**

Brasileira de Ciencias Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 40, n. 3, p. 289–299, 2004.

CHOE, T. et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-1 and -2 expression using nitric oxide synthase inhibitors in UV-irradiated human dermal fibroblasts. **Cosmet Sci**, v. 54, n. 3, p. 229–238, 2003.

DIEKMANN, J. et al. A three-dimensional skin equivalent reflecting some aspects of in vivo aged skin. **Experimental Dermatology**, v. 25, n. 1, p. 56–61, 2016.

FERNANDEZ, T. L. et al. Characterization of a human skin equivalent model to study the effects of ultraviolet B radiation on keratinocytes. **Tissue Engineering - Part C: Methods**, v. 20, n. 7, p. 588–598, 2014.

FLATEN, G. E. et al. In vitro skin models as a tool in optimization of drug formulation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 75, p. 10–24, 2015.

FLECKNELL, P. Replacement, reduction and refinement. **ALTEX: Alternativen zu Tierexperimenten**, v. 19, n. 2, p. 73–78, 2002.

HAN, A.; CHIEN, A. L.; KANG, S. Photoaging. **Dermatologic Clinics**, v. 32, n. 3, p. 291–299, 2014.

INOUE, S. **Skin Aging**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.

KHAVKIN, J.; ELLIS, D. A. F. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 19, n. 2, p. 229–234, 2011.

KOHL, E. et al. Skin ageing. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 25, n. 8, p. 873–884, 2011.

KUPAI, K. et al. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 61, n. 2, p. 205–209, 2010. LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails.

Medicine (United Kingdom), v. 45, n. 6, p. 347–351, 2017.

MARIONNET, C.; TRICAUD, C.; BERNERD, F. Exposure to non-extreme solar UV daylight: Spectral characterization, effects on skin and photoprotection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 1, p. 68–90, 2015.

MARTENS, M. C. et al. Photocarcinogenesis and skin cancer prevention strategies: An update. **Anticancer Research**, v. 38, n. 2, p. 1153–1158, 2018.

MENON, G. K.; CLEARY, G. W.; LANE, M. E. The structure and function of the stratum corneum. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 435, n. 1, p. 3–9, 2012.

MINE, S. et al. Aging alters functionally human dermal papillary fibroblasts but not reticular fibroblasts: A new view of skin morphogenesis and aging. **PLoS ONE**, v. 3, n. 12, 2008.

MURPHREE, R. W. Impairments in Skin Integrity. **Nursing Clinics of North America**, v. 52, n. 3, p. 405–417, 2017.

OECD 432. **Guideline for the testing of chemicals - In vitro 3T3 NRU phototoxicity test. TG 432**. Paris, Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico, 2004.

PARK, H. C. et al. Protective effect of *Cornus walteri* Wangerin leaf against UVB irradiation induced photoaging in human reconstituted skin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 193, n. September 2015, p. 445–449, 2016.

PEDROSA, T. N. **Desenvolvimento de epiderme humana reconstruída (RHE) como plataforma de testes in vitro para irritação, sensibilização, dermatite atópica e fotoimunossupressão**. 2016. 260 f. Tese (Doutorado em Farmácia) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

PELLEVOISIN, C.; BOUEZ, C.; COTOVIO, J. **Cosmetic industry requirements regarding skin models for cosmetic testing**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

PENNACCHI, P. C. *et al.* Glycated Reconstructed Human Skin as a Platform to Study the Pathogenesis of Skin Aging. **Tissue Engineering Part A**, v. 21, n. 17-18, p.2417-2425, set. 2015.

PENG, Y. *et al.* Stem cells and aberrant signaling of molecular systems in skin aging. **Ageing Research Reviews**, v. 19, p. 8–21, 2015.

POLJŠAK, B.; DAHMANE, R. G.; GODIĆ, A. Intrinsic skin aging: The role of oxidative stress. **Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica et Adriatica**, v. 21, n. 2, p. 33–36, 2012.

PONEC, M. Skin constructs for replacement of skin tissues for in vitro testing. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. SUPPL., p. 19–30, 2002.

QUAN, T. *et al.* Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 14, n. 1, p. 20–24, 2009.

RABE, J. H. *et al.* Photoaging: Mechanisms and repair. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 55, n. 1, p. 1–19, 2006.

RADEMACHER, F. *et al.* Skin microbiota and human 3D skin models. **Experimental Dermatology**, v. 27, n. 5, p. 489–494, 2018.

RIJKEN, F.; BRUIJNZEEL-KOOMEN, C. A. F. M. Photoaged Skin: The role of neutrophils, preventive measures, and potential pharmacological targets. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 89, n. 1, p. 120–124, 2011.

ROBINSON, J. P.; DOBRUCKI, J. Cellular and Molecular Imaging. **Current Protocols in Cytometry**, v. 38, n. 1, p. 12.0.1-12.0.3, 2006.

SANCHES SILVEIRA, J. E. P.; MYAKI PEDROSO, D. M. UV light and skin aging. **Reviews on Environmental Health**, v. 29, n. 3, p. 243–254, 2014.

SCHUCH, A. P. et al. Development of a DNA-dosimeter system for monitoring the effects of solar-ultraviolet radiation. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 8, n. 1, p. 111–120, 2009.

SHIMIZU, H. **Shimizu's Dermatology**. 2. ed. India: Wiley Blackwell, 2016.

SONG, D. et al. PAL-12, a new anti-aging hexa-peptoid, inhibits UVB-induced photoaging in human dermal fibroblasts and 3D reconstructed human full skin model, Keraskin-FT™. **Archives of Dermatological Research**, v. 309, n. 9, p. 697–707, 2017.

SOUSA, L.B. **Aplicação de modelo de pele humana reconstruída *in vitro* para estudos de citotoxicidade e genotoxicidade**. 2018. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

Stark H.J., Szabowski A, Fusenig N.E., Maas-Szabowski N. Coculturas organotípicas como equivalentes de pele: Um sistema *in vitro* complexo e sofisticado. **Biol Proced Online**. n. 6 : 55-60, 2004.

SVOBODOVA, A.; WALTEROVA, D.; VOSTALOVA, J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia**, v. 150, n. 1, p. 25–38, 2006.

TAKAHASHI, N.; TAKEDA, K.; IMAI, M. Inhibitory effects of p-dodecylaminophenol on the invasiveness of human fibrosarcoma cell line HT1080. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 19, p. 6015–6021, 2013.

TANNENBAUM, J.; BENNETT, B. T. Russell and Burch's 3Rs then and now: The need for clarity in definition and purpose. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 54, n. 2, p. 120–132, 2015.

TOBIN, D. J. Introduction to skin aging. **Journal of Tissue Viability**, v. 26, n. 1, p. 37–46, 2017.

VANDOOREN, J. et al. Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. **Nature Methods**, v. 10, n. 3, p. 211–220, 2013.

WELLER, R. et al. **Chapter 2: The function and structure of the skin**, p. 19-42, 2008.