

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

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

LEILANE BENTES DE SOUSA

MANAUS

2018

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

LEILANE BENTES DE SOUSA

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

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

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

MANAUS

2018

LEILANE BENTES DE SOUSA

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

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

Aprovada em 27 de fevereiro de 2018.

BANCA EXAMIDADORA



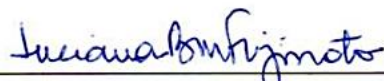
Prof^ª. Dr^ª. Marne Carvalho de Vasconcellos

Orientadora/Presidente – Universidade Federal do Amazonas



Prof^ª. Dr^ª. Raquel Carvalho Montenegro

Membro externo – Universidade Federal do Ceará



Prof^ª. Dr^ª. Luciana Botinelly Fujimoto

Universidade Federal do Amazonas

Ficha Catalográfica

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

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

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar comigo guiando meus caminhos;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

À CAPES, FAPEAM e CNPq pelo apoio financeiro;

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

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

Keywords: Human skin, permanent cell culture, security.

LISTA DE FIGURAS

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

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

LISTA DE TABELAS

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

SUMÁRIO

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A pele humana

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

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

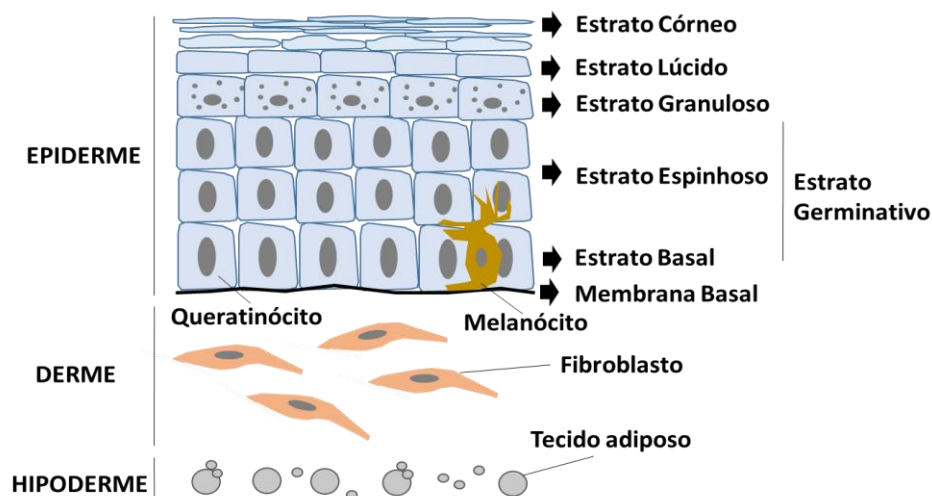


Figura 1- Camadas da pele e seus componentes celulares. A pele é dividida histologicamente em duas camadas principais, a epiderme (subdividida em estratos ou camadas) e a derme. A hipoderme constitui a tela subcutânea. Fonte: a autora.

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

2.1.1 Epiderme: componentes estruturais e células

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

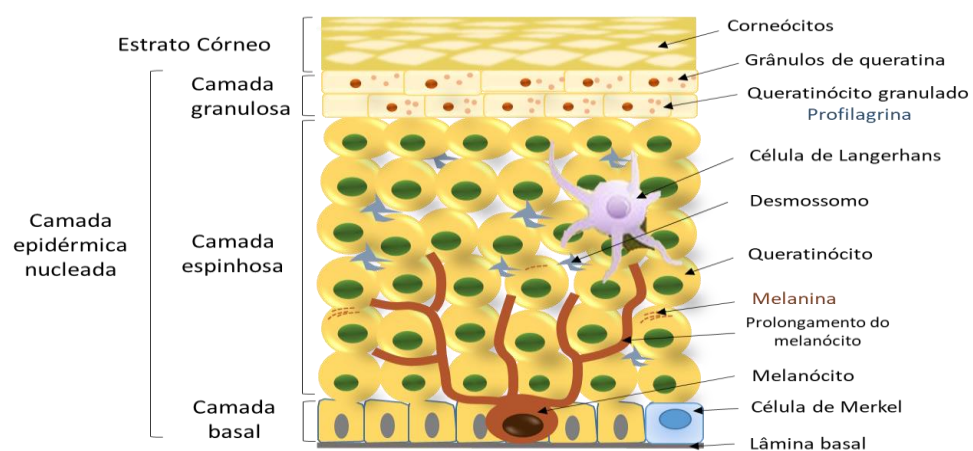


Figura 2 - Camadas da epiderme e seus constituintes celulares. A epiderme é dividida em estrato córneo (camada mais externa) composta de corneócitos e uma camada epidérmica nucleada subdividida em camada granulosa, espinhosa e basal. Seus principais constituintes celulares são os fibroblastos, queratinócitos,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

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

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

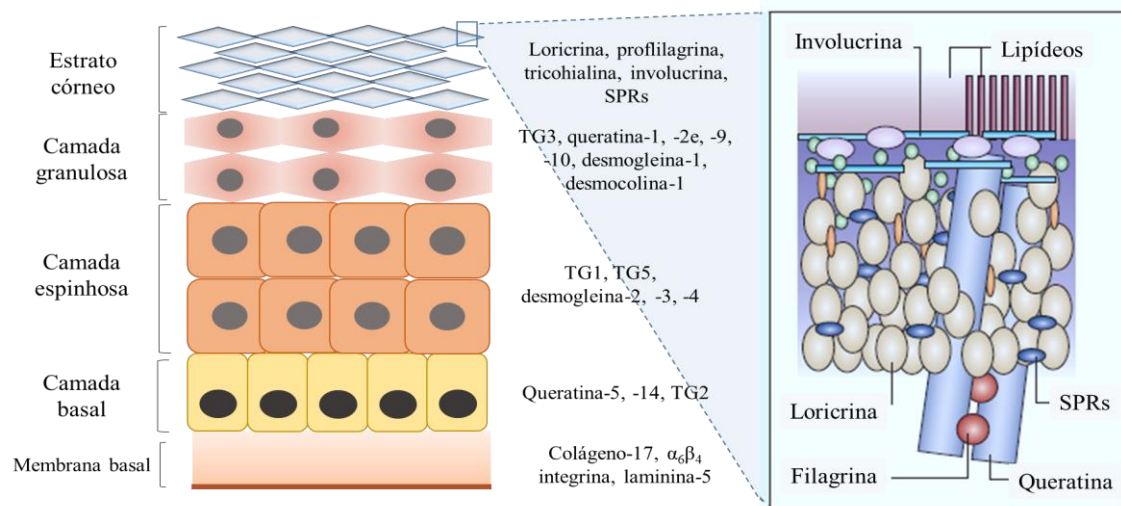


Figura 3 - Diferenciação dos queratinócitos e expressão de proteínas na epiderme. As proteínas que são expressadas em locais na epiderme durante a diferenciação estão envolvidas com o processo de cornificação. A nível molecular, a camada córnea é formada por proteínas que possuem alta afinidade por transglutaminases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

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

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

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

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

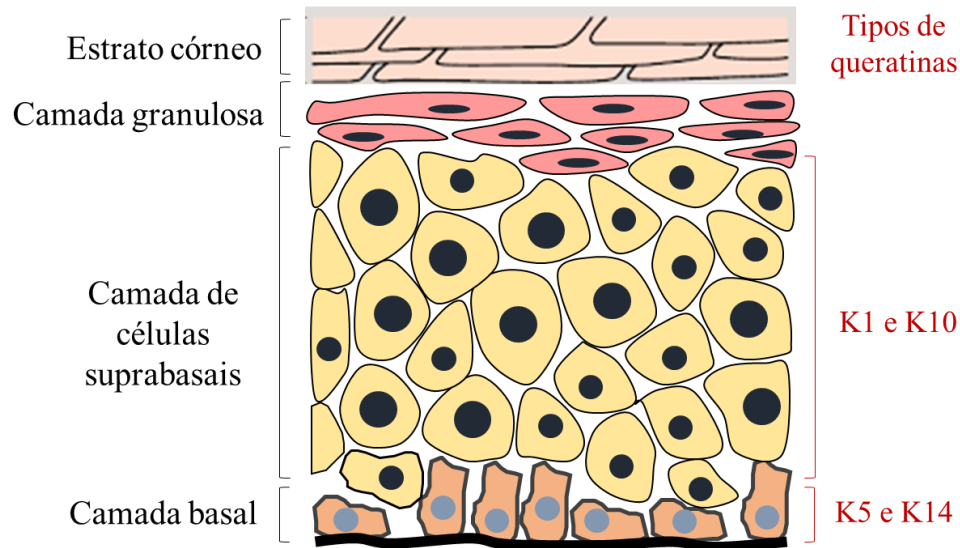


Figura 4 - Camadas da epiderme e os tipos de queratinas produzidas. Na camada epidérmica as queratinas 1 (K1) e 10 (K10), queratinas 5 (K5) e 14 (K14) são produzidas na camada suprabasal e basal, respectivamente. Fonte: a autora.

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

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

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

2.1.2 Membrana basal: junção dermo-epidérmica

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

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

2.1.3 Derme: componentes estruturais e células

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

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

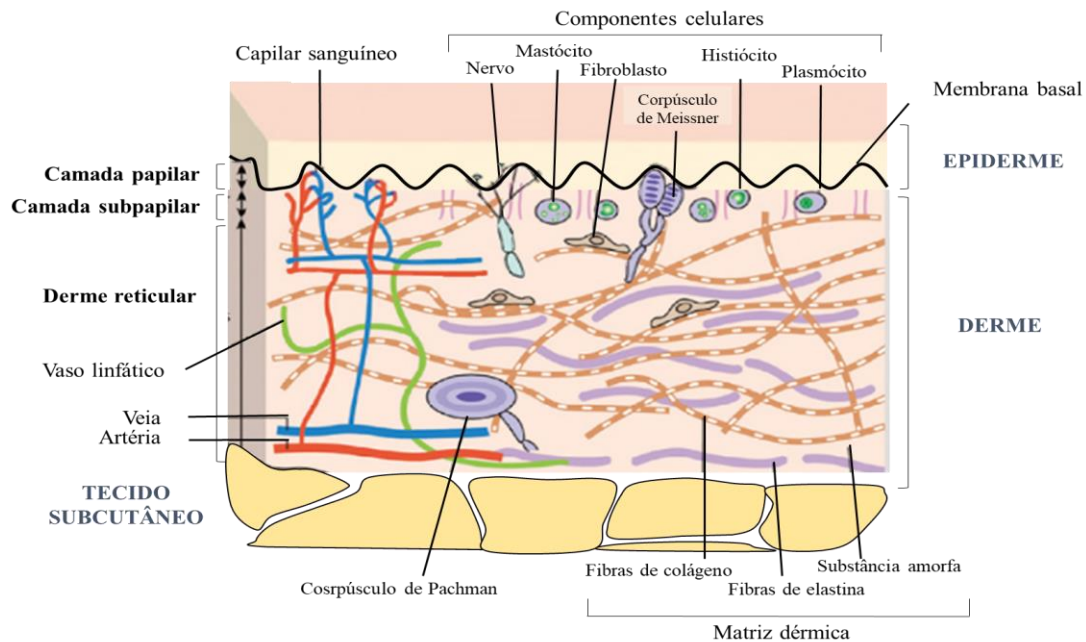


Figura 5 - Derme: componentes estruturais e celulares. A derme é formada basicamente por três camadas: papilar, subpapilar e reticular. Suas funções incluem o fornecimento de energia e nutrição para a epiderme, além de força considerável à pele em virtude do arranjo de sua matriz dérmica. Adaptado de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

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

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

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

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

2.1.4 Hipoderme: Tecido adiposo subcutâneo

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

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

2.2 Segurança de cosméticos e medicamentos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.2.1 Genotoxicidade e análises toxicológicas envolvendo alterações no DNA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.3 Métodos alternativos ao uso de animais em experimentação

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

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

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

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

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

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

2.4 Pele humana reconstruída

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

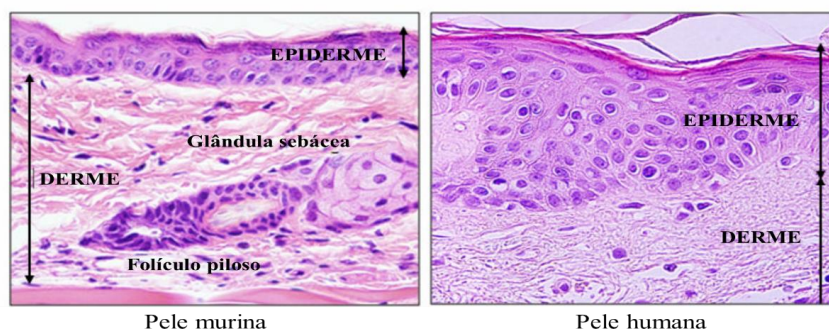


Figura 6 – Microscopia óptica evidenciando as diferenças entre a pele murina e a pele humana. Enquanto a derme murina é menos espessa e a derme é composta basicamente de três camadas, a pele humana é mais espessa e a derme é constituída de 6 a 10 camadas de espessura. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento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

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

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

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

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

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

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

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver um modelo de pele humana reconstruída *in vitro* utilizando linhagens celulares permanentes e testar suas aplicabilidades para ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade.

3.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver peles humanas *in vitro* constituídas de camadas epidérmica e dérmica utilizando linhagens celulares de fibroblastos e queratinócitos permanentes;
- Avaliar a qualidade morfológica e estrutural da pele humana reconstruída;
- Analisar a aplicabilidade da pele reconstruída para modelos de avaliação de citotoxicidade comparando com as peles comerciais atualmente disponíveis e validadas;
- Avaliar a aplicabilidade da pele reconstruída quanto a identificação do potencial genotóxico de substâncias comparando com as peles comerciais atualmente disponíveis e validadas.

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo

Estudo experimental *in vitro*.

4.2 Desenho experimental

Todas as atividades foram desenvolvidas conforme fluxograma abaixo e realizados no Laboratório de Cultura de Células do Laboratório de Atividade Biológica (BIOPHAR) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

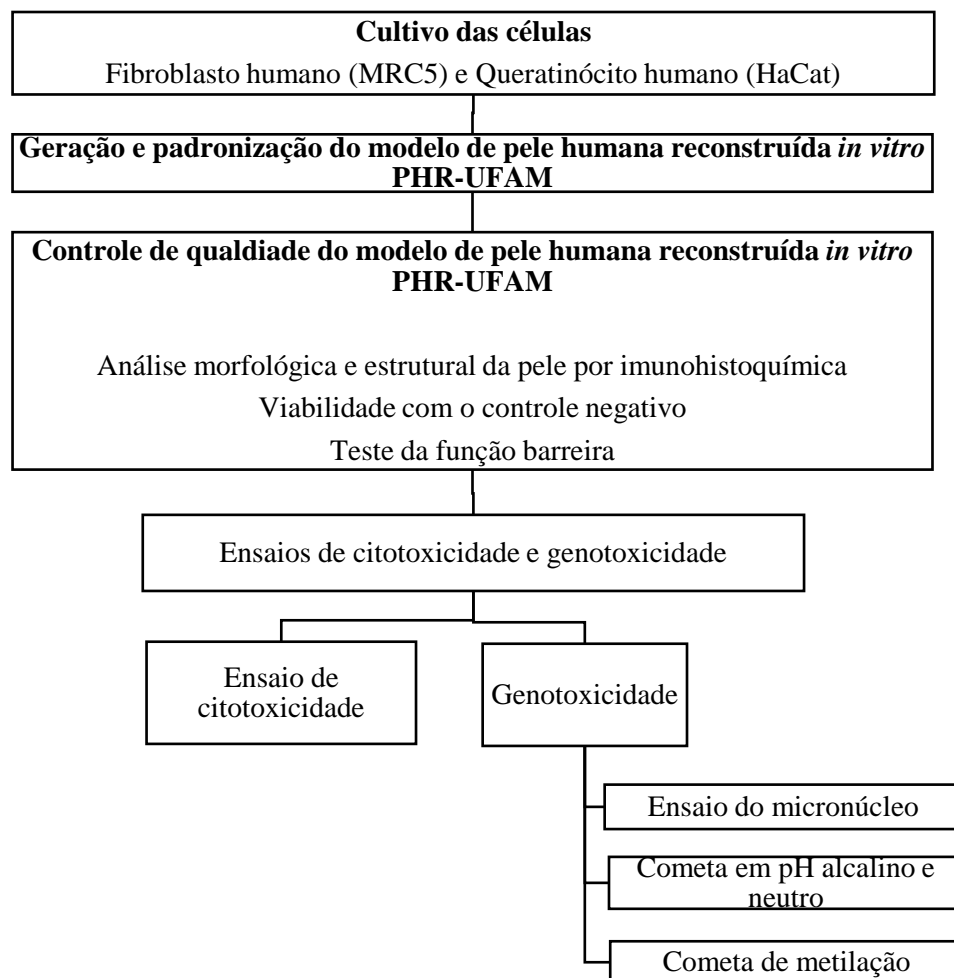


Figura 7 - Fluxograma de atividades desenvolvidas.

4.3 Cultura celular

Culturas celulares permanentes de fibroblasto humano (MRC5) e queratinócitos humanos (HaCat) foram cultivadas para compor a pele humana reconstruída aqui denominada PHR-UFAM. Todas as linhagens utilizadas foram obtidas do banco de células do Laboratório de Atividade Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Os fibroblastos foram cultivados em garrafas estéreis de cultura celular e os queratinócitos em placas de Petri estéreis para cultura celular revestidas com colágeno do tipo IV a fim de favorecer o crescimento e morfologia próprios dessas células.

O meio de cultura utilizado foi o *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de antibiótico Penicilina/Estreptomicina, e as células foram mantidas em incubadora com atmosfera umidificada a 37°C com injeção de 5% de CO₂. Utilizou-se para observação do crescimento celular a cada 24 horas um microscópio óptico invertido (Zeiss).

Para a manutenção da PHR-UFAM, o meio de cultivo da pele (MCPele) foi preparado de acordo com Brohem et al. (2011) e Maas-Szabowski, Starker & Fusenig (2003) com modificações, contendo o meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) e mistura comercial de nutrientes HAM-F12, acrescido de Toxina colérica (1 µM), Insulina (5 mg/mL), Apo-transferrina (5 mg/mL), Hidrocortisona-21 (0,1 mg/mL), Epidermal Growth Factor (2 µg/mL) e Transforming growth factor-α (TGF-α, 100 µg/mL).

4.4 Geração da pele humana reconstruída (PHR-UFAM)

A montagem da PHR-UFAM foi realizada de acordo com Boelsma et al. (2000) e Maria & Wada (1997) com modificações. Para reconstrução da derme os fibroblastos MRC5 (15×10^4 células) foram ressuspensos em mistura de colágeno tipo I Corning® (650 μL), SFB (50 μL), tampão de reconstituição 10X (NaOH 0,05 M, NaHCO_3 2,2%, HEPES 200 mM – 100 μL) e mistura de nutrientes HAM-F12 10X (100 μL) por pele. Em seguida, essa mistura foi transferida para uma placa de 12 poços contendo insertos com membrana de poro 0,4 μm (Corning®).

Após o processo de gelificação do colágeno em estufa a 37°C com injeção de 5% de CO_2 durante 30 minutos e estabilização do pH, os queratinócitos (50×10^4 células) foram plaqueados em cima da derme para reconstrução da epiderme. As células foram mantidas por 24 horas submersas em meio de cultivo DMEM para adesão dos queratinócitos sobre a derme e na parte externa do inserto foi adicionado meio de cultivo MCPele. Em seguida, o meio de cultivo DMEM foi retirado do interior do inserto para permitir a interface ar-líquido e o meio de cultivo MCPele foi mantido na parte externa. A pele foi mantida por 15 dias em estufa a 37°C com injeção de 5% de CO_2 para diferenciação dos queratinócitos da epiderme e a troca de meio da parte externa ao inserto foi feita a cada dois dias.

4.5 Condições para padronização da PHR-UFAM

Durante o processo de padronização do modelo, a influência da adição de Soro Fetal Bovino e Keratinocyte Growth Factor (KGF) foram analisados no meio de cultivo MCPele para formação da epiderme e derme. Para isso as seguintes condições foram montadas:

- Condição 1: Pele com Soro Fetal Bovino e com KGF;
- Condição 2: Pele sem Soro Fetal Bovino e com KGF;
- Condição 3: Pele com Soro Fetal Bovino e sem KGF;
- Condição 4: Pele sem Soro Fetal Bovino e sem KGF.

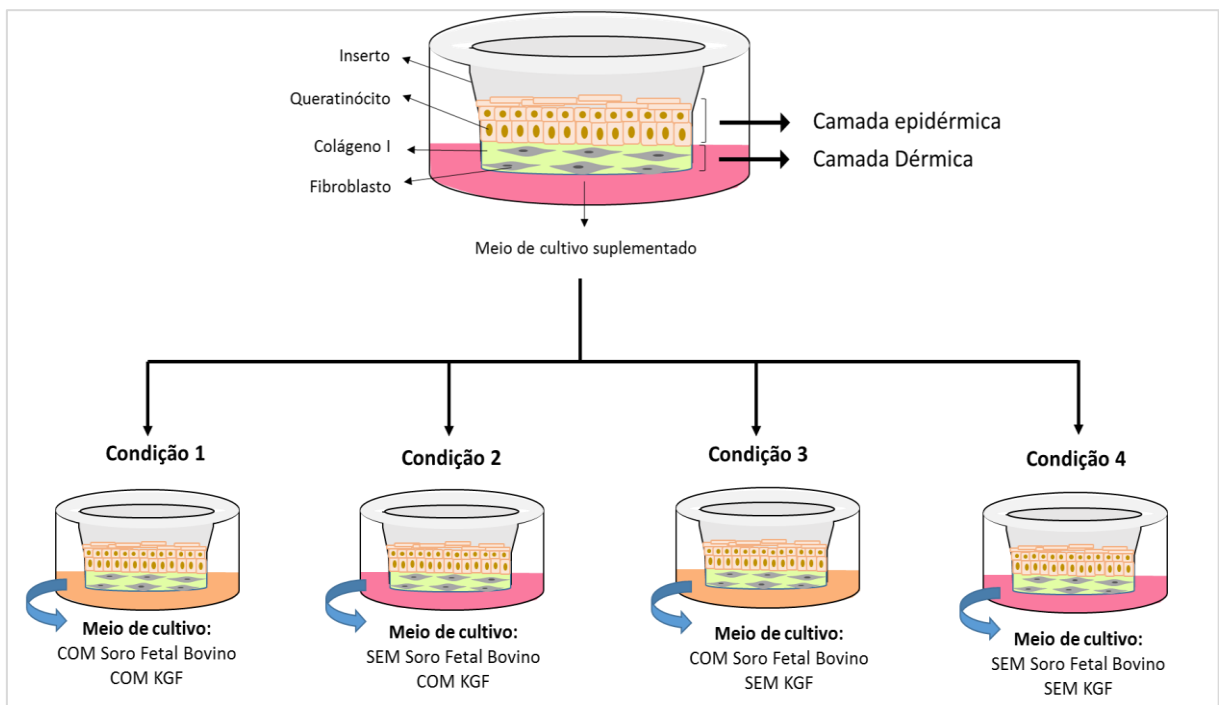


Figura 8 – Esquema representativo das condições de cultivo para padronização da pele humana reconstruída *in vitro* PHR-UFAM.

4.6 Controle de qualidade da PHR-UFAM

4.6.1 Morfologia e imunohistoquímica

As amostras das peles reconstruídas foram fixadas em formol a 10%, desidratadas e embebidas em parafina. As lâminas contendo cortes de 3 μm de espessura foram coradas com

hematoxilina-eosina e picrosirius para avaliação morfológica e estrutural da pele. As reações de imunohistoquímica foram realizadas em cortes histológicos de 3 µm de espessura, dispostos em lâminas microscópicas silanizadas, a partir de blocos parafinados, utilizando o sistema automatizado BENCHMARK XT IHC/ISH VENTANA (ROCHE).

A recuperação antigênica dos espécimes foi realizada com solução EZ prep.(ROCHE®) com tempo de incubação de 30 minutos. O complexo SABC (estreptoavidina/biotina/imunoperoxidase) indireta foi revelado através da técnica de detecção pelo sistema XT Ultraview DAB (cromógeno diaminobenzidina). Após a revelação, as lâminas foram contraincubadas com hematoxilina de Harris. Foram utilizados controles positivos externos da reação, porém, individuais em cada lâmina. Os anticorpos utilizados foram Anti-citoqueratinas CKpool (U16) para analisar a camada epidérmica e Anti-vimentina (U999) para analisar a derme.

As imagens foram obtidas por microscopia óptica e analisadas utilizando o Imaging Software NIS-Elements 4.30.01 (Nikon Instruments, Melville, NY) (PENNACCHI, ARAU & FAGUNDES, 2015).

Após análise dos resultados morfológicos e da imunohistoquímica, a pele reconstruída com melhor organização estrutural em termos da constituição e maior número de camadas de células da epiderme e estrutura dérmica confirmada pelos imunomarcadores foi selecionada para os ensaios posteriores.

4.6.2 Viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado de acordo com o guia OECD 439 utilizando o ensaio de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazoliobrometo). Para validação do modelo o teste foi realizado com tampão fosfato salina (PBS) como controle negativo. As peles

reconstruídas foram expostas e incubadas com 300 µl de MTT (1 mg/mL) a 37°C em estufa com CO₂ a 5%. Após 10 horas de incubação, o excesso de MTT foi removido e o tecido lavado com PBS. Os sais de formazan reduzidos foram diluídos em 500 µL de isopropanol *overnight*. Em seguida, 200 µL da solução de extração foram transferidos para uma placa de 96 poços e a densidade óptica do corante púrpura resultante foi medida em 570 nm utilizando um leitor de placas ELISA (DTX 800 - Beckman Coulter).

Segundo o guia da OECD, o intervalo de aceitabilidade (limites superior e inferior) para os valores das leituras do controle negativo é estabelecido pelo fornecedor/desenvolvedor do modelo de pele. Os resultados da PHR-UFAM foram comparados com os valores fornecidos das peles validadas e reconhecidas pela OECD TG 439 (2015).

4.6.3 Avaliação da função barreira da PHR-UFAM – Tempo de Exposição 50 (ET50) e Concentração de exposição 50 (EC50)

A avaliação da função barreira, bem como integridade dos tecidos, foi realizada avaliando-se o tempo de exposição necessário que uma substância química de referência citotóxica leva para reduzir a viabilidade celular em 50% (ET50) e a concentração capaz de reduzir a viabilidade celular em 50% (EC50), de acordo com o guia da OECD 439. As propriedades de contenção do modelo de pele devem evitar a passagem do material do estrato córneo para a camada de células viáveis, e para isso, o modelo deve apresentar uma boa modelagem de exposição da pele. Como substâncias de referência citotóxicas foram utilizadas o Triton X-100 1% por 0, 4, 8, 12 e 16 horas, e o Dodecil Sulfato de Sódio – SDS durante 18 horas nas concentrações 0; 0,625; 1,25; 2,5 e 5,0 mg/mL. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT como descrito no item 4.6.2.

Os resultados da PHR-UFAM foram comparados com os valores fornecidos das peles validadas e reconhecidas pela OECD TG 439 (2015).

4.7 Avaliação da genotoxicidade em modelo de pele reconstruída *in vitro* PHR-UFAM

4.7.1 Ensaio para detecção de micronúcleos

O ensaio para detecção de micronúcleos (MN) foi realizado como descrito por Curren et al. (2006), Dahl et al. (2011) e Mun et al. (2009) com modificações. Como controle negativo foi utilizado o meio de cultura contendo 3 µg/mL de citocalasina B (Cyto B) e o solvente utilizado (acetona). Para determinar se as condições utilizadas para a cultura do tecido PHR-UFAM foram suficientes para permitir a indução de MN, o agente indutor de micronúcleos Mitomicina C (1,5 e 3 µg/mL) foi testado no modelo como substância de referência conforme preconizado pela OECD, com volume de aplicação tópica de 10 µL/pele (OECD TG 487, 2016).

As amostras de peles PHR-UFAM foram tratadas com os controles negativo e positivo por 24 horas e incubadas em estufa a 37°C com injeção de 5% de CO₂. Ao término do tratamento, as amostras de pele foram equilibradas com meio de cultivo contendo Cyto B e uma segunda dosagem dos controles durante 24 horas em estufa. Em seguida, as peles foram transferidas para um tubo cônico de 15 mL e submetidas a digestão do colágeno com solução de collagenase (1 mg/mL) em PBS estéril durante 40 minutos em banho-maria a 37°C. Em seguida, alíquotas de 0,1 mL foram transferidas para 3 microtubos para realização da contagem das células viáveis pelo método de exclusão por azul de tripan. Todas as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 1500 rpm com posterior descarte do sobrenadante para

obtenção de um concentrado de células. Aos microtubos foram adicionados 10 μ L de uma solução de azul de Tripán e realizada a contagem das células viáveis em câmara de Neubauer.

Para preparação da suspensão de células, 1 mL de uma solução com KCl 0,075 M aquecido a 37 °C foi adicionado cuidadosamente a base do tubo contendo o concentrado de células sob agitação suave. Após alguns minutos, 3 mL da solução fixadora fria (metanol e ácido acético 3:1) armazenada a -15 a -25 °C foi adicionada lentamente ao tubo, seguido de centrifugação durante 5 minutos a 1500 rpm. Após retirada do sobrenadante, uma segunda fixação foi realizada com 4 mL de uma solução de metanol/ácido acético (99:1) para impedir a formação de cristais na lâmina, seguido de centrifugação e descarte do sobrenadante como o processo de fixação anterior.

Uma gota da suspensão de células concentrada, aproximadamente 50 μ L, foi depositada e espalhada sobre uma lâmina de microscopia. Duas lâminas foram preparadas de cada tecido. Após a secagem completa das lâminas, elas foram imersas em solução de Laranja de Acridina (40 μ g/mL em PBS) durante 2 a 3 minutos, imediatamente enxaguadas 3 vezes com PBS e, em seguida, colocadas para secagem novamente. As lâminas coradas foram armazenadas no escuro em 2-8 °C até a leitura dos micronúcleos em microscópio de fluorescência.

Para leitura das lâminas, uma gota de PBS foi colocada sobre a lâmina corada e coberta com lamínula. A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência com filtro de excitação de 470 nm e emissão de 515 nm (GFP-L da Nikon). Foram contadas 500 células binucleadas por lâmina para determinar a frequência de micronúcleos. Somente as amostras de PHR-UFAM que apresentaram porcentagem de viabilidade celular (determinada pela contagem em câmara de Neubauer com Azul de Tripán) maior ou igual a 40% foram incluídas para determinação da frequência de micronúcleos.

Os critérios de Fenech et al. (2003) foram utilizados para selecionar células binucleadas para a análise de micronúcleos. A figura 8 mostra uma típica célula binucleada corada com Laranja de Acridina que apresenta os critérios de inclusão para contagem do micronúcleo.

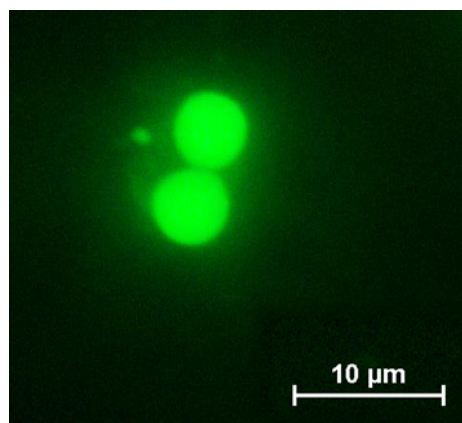


Figura 9 – Imagem de fluorescência de uma célula binucleada corada com Laranja de Acridina positiva para micronúcleo. O micronúcleo típico é redondo, encontrado perto dos núcleos principais, e corresponde à cor e intensidade dos núcleos principais. Os dois núcleos celulares com aproximadamente o mesmo tamanho e membrana citoplasmática da célula intacta. Aumento 1000X. Fonte: a autora.

4.7.2 Ensaio do cometa em pH alcalino e neutro

Os ensaios do teste do cometa de célula única em pH alcalino e pH neutro foram realizados conforme metodologia descrita por (OECD TG 489, 2014; SINGH et al., 1988; TICE et al., 2000) com modificações. As peles foram tratadas por 3 horas com o controle negativo (meio de cultura) e controle positivo (etilmetanosulfonato), conforme determinado pela diretriz número 489 da OECD.

O EMS foi selecionado nesse ensaio para avaliação da genotoxicidade, conforme preconizado no Guia da OECD 489, pelo fato de ser uma substância de referência como controle positivo capaz de induzir quebras de fitas de DNA em vários tecidos de interesse, principalmente a pele, objeto desse estudo. As concentrações teste do EMS foram estabelecidas após análise da viabilidade celular e ensaio do cometa em pH alcalino e neutro em cultura de

monocamada de fibroblastos e queratinócitos. O volume de aplicação tópica no modelo de pele foi 10 μL /pele.

Após a exposição aos controles, as amostras de pele reconstruída foram transferidas para um tubo cônico de 15 mL e submetidas a digestão do colágeno com uma solução de colagenase (1 mg/mL) em PBS estéril durante 30 minutos em banho-maria a 37°C.

Após centrifugação durante 5 minutos a 1500 rpm e descarte do sobrenadante, 50 μL do concentrado celular foi incorporado a uma solução de agarose de baixo ponto de fusão (LMP). Em seguida, o conteúdo foi transferido para lâminas de microscopia previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal (NMP). Após solidificação em temperatura ambiente, as lâminas ficaram em uma solução de lise por no mínimo 1 hora, para a desnaturação da parede celular e nuclear, restando o DNA da célula. As lâminas foram então removidas da solução de lise e dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese preenchida com solução de eletroforese por 20 minutos para permitir o desempacotamento do DNA.

A eletroforese foi conduzida na ausência de luz por 20 minutos, a 20 Volts e com corrente de 300 mA. Posteriormente, as lâminas foram dispostas em recipientes contendo solução de neutralização por 5 minutos, para neutralização. Por fim, as lâminas secas, foram fixadas em etanol absoluto e armazenadas para posterior leitura. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência, utilizando 40 μL da solução de Syber Green (1:10000).

Foram contados 50 cometas por lâmina ($n=2$ por exposição em triplicata), sendo classificados de acordo com a quantidade de DNA fragmentado na cauda do cometa, indicando o grau de quebra do DNA (0 – sem dano, 1 – cauda menor que o diâmetro do nucleóide, 2 – cauda do mesmo tamanho que o diâmetro do nucleóide, 3 – cauda maior que o diâmetro do nucleóide, e 4 – cauda 2 ou mais vezes maior que o diâmetro do nucleóide) como mostrado na

figura 9. Os resultados foram expressos como índice de dano e frequência de dano usando os seguintes cálculos:

$$\text{Índice de Dano Total} = 0 \times (\text{n}^\circ \text{ de cometas grau 0}) + 1 \times (\text{n}^\circ \text{ de cometas grau 1}) + 2 \times (\text{n}^\circ \text{ de cometas grau 2}) + 3 \times (\text{n}^\circ \text{ de cometas grau 3}) + 4 \times (\text{n}^\circ \text{ de cometas grau 4})$$

$$\text{Frequência de dano} = 100 - (50 - \text{n}^\circ \text{ de cometas do grau}) * 100/50$$

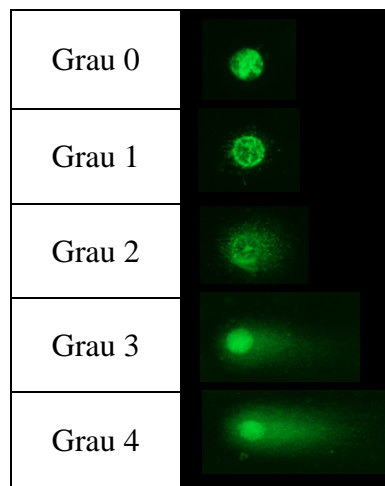


Figura 10 – Classificação dos cometas segundo o tipo de dano ao DNA (grau 0 a grau 4) conforme tamanho da fragmentação do DNA (cauda do cometa). Onde grau 0 representa sem dano ao DNA e grau 4 maior dano ao DNA. Coloração Syber Green. Fonte: a autora.

Os procedimentos para o ensaio do cometa em pH neutro foram iguais aos realizados para o cometa alcalino, com exceção da solução de eletroforese, a qual foi preparada com Acetado de sódio e Tris-HCl, pH 8,5 e a corrida conduzida na ausência de luz por 20 min, a 25 Volts ou corrente de 300 mA (OECD TG 489, 2014; WOJEWÓDZKA; BURACZEWSKA; KRUSZEWSKI, 2002).

4.7.3 Ensaio do cometa modificado para detecção de sítios de metilação no DNA

A diferença de sensibilidade à metilação do DNA da endonuclease de restrição HpaII foi usada no ensaio do cometa modificado considerando-se que alto nível de metilação dos dinucleotídeos CpG resultam em aumento na quantidade de DNA na calda do cometa nos nucleóides digeridos com HpaII. Teoricamente a porcentagem de cauda do DNA no caso do tratamento com HpaII representa todos os sítios de CCGG metilados no DNA das células. O dano ao DNA prioritário ao tratamento enzimático representa a quantidade de DNA metilado na amostra digerida (LEWIES et al., 2014; POGRIBNY; YI; JAMES, 1999; TRYNDYAK; KOVALCHUK; POGRIBNY, 2006; WENTZEL et al., 2010).

O ensaio do cometa modificado foi realizado sob condições alcalinas conforme descrito por Wentzel et al (2010). As peles foram expostas ao controle negativo (meio de cultivo) e ao controle positivo 5-azacitidina em diferentes concentrações determinadas pelo ensaio de viabilidade por 24 horas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Em seguida, as amostras de pele reconstruída foram transferidas para um tubo cônico de 15 mL e submetidas a digestão do colágeno com uma solução de colagenase (1 mg/mL) em PBS estéril durante 30 minutos em banho-maria a 37°C. Após centrifugação durante 5 minutos a 1500 rpm e descarte do sobrenadante, 50 µL do concentrado celular foi incorporado a uma solução de agarose de baixo ponto de fusão (LMP). As lâminas ficaram em repouso para gelificação da agarose e, então, foram submergidas em solução de lise contendo 5 M de NaCl, 0,4 M de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 10% de dimetil sulfoxido e 1% de Triton X-100 a 4° C por 16 horas para preparação os nucleóides.

Para assegurar as condições favoráveis à digestão enzimática as lâminas foram colocadas em contato com tampão 10 mM Tris-HCl, 10 mM de NaCl, 1 mM de mercaptoetanol e 2 mM de EDTA por 10 minutos. A cada lâmina foram adicionados 100 µL da enzima HpaII

a 1,5 U/100 μ L e coberta com lamínula, seguido de incubação em câmara úmida a 37° C por uma hora. Após a incubação e remoção das lamínulas, as lâminas foram colocadas na cuba de eletroforese e cobertas com a solução de eletroforese (5 M NaOH e 0,4 M EDTA).

A corrida eletroforética ocorreu a 30 Volts e 300 mA por 45 minutos a 4° C, após o qual as lâminas foram colocadas em solução de neutralização (0,4 M Tris-HCl) com pH 7,5 por 15 minutos. Finalmente, os nucleóides foram corados com Syber Green (1:10000) e lidos em microscópio de fluorescência.

Foram contados 50 cometas por lâmina (n=2 por exposição em triplicata), sendo classificados de acordo com o padrão de escores previamente definidos pelo tamanho e intensidade da cauda. Os resultados foram expressos como frequência e índice de dano.

4.8 Análise estatística dos resultados

Os resultados de todos os ensaios foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes e analisados estatisticamente, usando o software GraphPad Prism 6. Os valores da EC50 e ET50 foram obtidos por regressão não-linear. Para o índice de dano foi utilizado ANOVA *oneway* seguido do teste de Tukey (*Multiple Comparison Test*) e para a frequência de dano ANOVA *2way* seguido de Bonferroni *posttest*. Foram considerados estatisticamente significativos os resultados com $*p < 0,05$, frente aos controles.

5 RESULTADOS

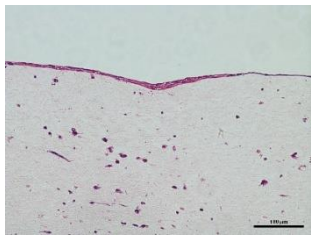
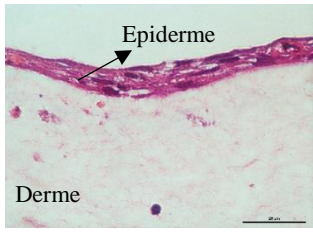
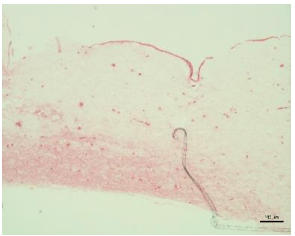

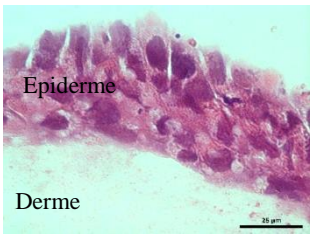
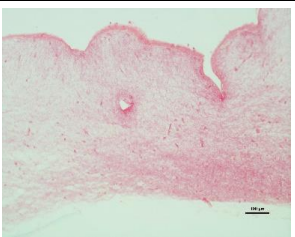
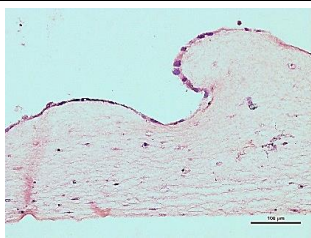
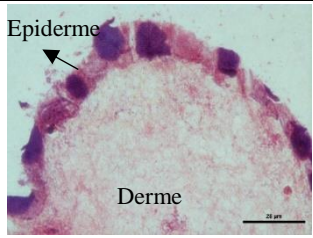

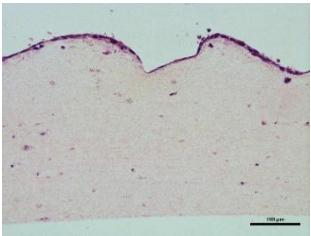
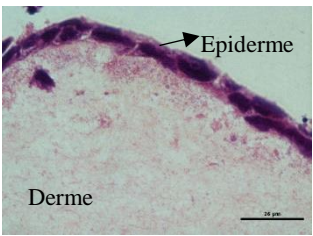
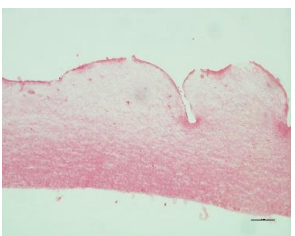
5.1 Geração da pele humana reconstruída PHR-UFAM

Para geração da pele humana reconstruída, os queratinócitos de cultura permanente foram plaqueados sobre colágeno tipo IV depositado sob uma matriz dérmica, composta de fibroblastos de cultura permanente embebidos em colágeno tipo I. A pele foi mantida sobre membrana *transwell* em interface ar-líquido por 15 dias com meio de cultivo MCPele suplementado com diversos fatores de crescimento como Fator de Crescimento Epidérmico (EGF), insulina, hidrocortisona, apo-transferrina e toxina colérica.

A influência do cálcio e fator de crescimento epidérmico também foram estudados, e não foram representados aqui em virtude da não obtenção de resultados satisfatórios e melhorias significativas no desenvolvimento epidérmico. A quantidade de queratinócitos plaqueados sobre a matriz dérmica foi analisada e 50×10^4 células/pele foram selecionadas para realização dos estudos posteriores.

Dentre todas as condições testadas, a condição que somava a retirada do Soro Fetal Bovino (SFB) do meio de cultivo MCPele e do Fator de Crescimento de Queratinócitos (KGF) foi a que apresentou melhor estrutura morfológica apresentando camada epidérmica com maior quantidade e camadas de células à coloração por hematoxilina e eosina, como mostrado na Tabela 3. Sendo assim, esta condição foi selecionada para a realização dos ensaios de controle de qualidade, citotoxicidade e genotoxicidade. A coloração por picrossirius foi utilizada com objetivo de detectar o colágeno presente nas peles reconstruídas e todos os cortes histológicos das condições testadas foram marcados com este corante, evidenciando a presença de colágeno.

Tabela 3 - Coloração diferencial por Hematoxilina/Eosina e Picrocirius entre as condições testadas da PHR-UFAM na ausência (-) ou presença (+) de Soro Fetal Bovino (SFB) e Fator de Crescimento de Queratinócitos (KGF).

Condição		Hematoxilina/Eosina		Picrocirius
SFB	KGF	200X	1000X	100X
-	+			
-	-			
+	+			
+	-			

5.2 Controle de qualidade da PHR-UFAM

5.2.1 Morfologia e imunohistoquímica

Segundo o Guia da OECD 439, a morfologia é um dos principais parâmetros de controle de qualidade das peles reconstruídas. Os cortes histológicos da PHR-UFAM corados com Hematoxilina e eosina evidenciam duas camadas principais, uma superior constituída de células

dispostas em camadas com núcleos e citoplasmas bem definidos (queratinócitos da camada epidérmica) apresentando discreta desorganização, e uma camada inferior constituída de células com núcleo bem corado (fibroblastos da matriz dérmica) embebidas em matriz de colágeno (Figura 11). Essa estrutura morfológica da PHR-UFAM assemelha-se à estrutura da pele humana, bem como, às peles humanas reconstruídas *in vitro* disponíveis comercialmente e validadas pela OECD, como representado na Figura 11.

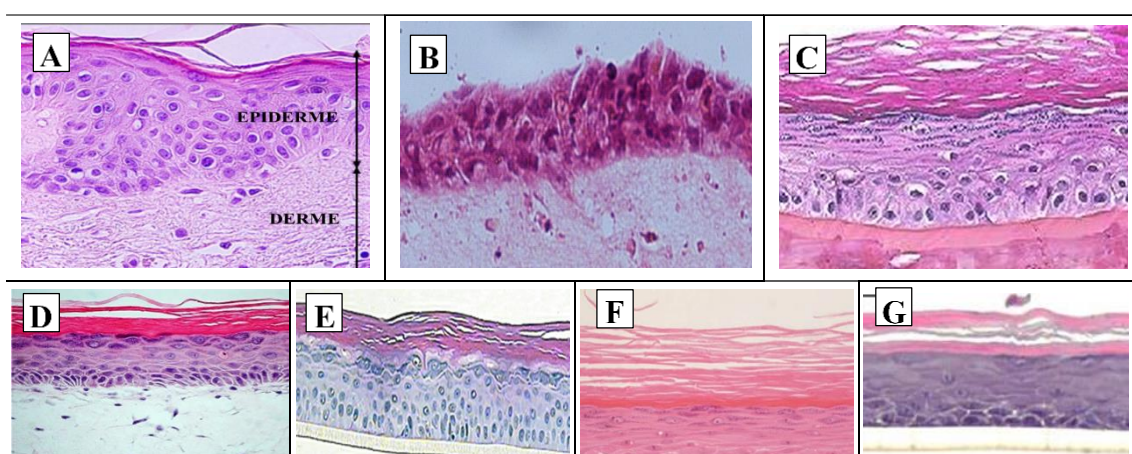


Figura 11 - Comparativo entre os cortes histológicos da (A) epiderme e derme humana, (B) PHR-UFAM e os modelos validados pelo Guia OECD 439 como métodos alternativos à pele humana (C) EpiSkin (D) EpiDerm™ Tissue Model, (E) SkinEthic™ RHE, (F) LabCyte EPI-MODEL e o modelo de epiderme desenvolvido pela Universidade de São Paulo - USP (G) Epiderme-USP. Fontes: a. Brohem et al. (2011); b. A autora; c. <http://iivs.org/testing-services/assays/dermal/irritation-screening/>; d, e, f. <http://iivs.org/testing-services/assays/dermal/irritation-screening/>; g. Pedrosa (2016).

A fim de avaliar a expressão de proteínas associadas à composição da pele humana reconstruída PHR-UFAM, foi realizado o ensaio de imunohistoquímica com o modelo de pele selecionado no ensaio morfológico por HE, a PHR-UFAM desenvolvida sem SFB e sem KGF. Foram utilizados dois imunomarcadores: coquetel de anti-citoqueratinas (CKpool U16) e anticorpos anti-vimentina (Vimentina U999).

O coquetel de anticorpos anti-citoqueratinas foi selecionado para marcar as citoqueratinas presentes na camada epidérmica e que estão associadas à diferenciação dos

queratinócitos e os anticorpos anti-vimentina para marcar a proteína vimentina que auxilia na identificação dos fibroblastos de origem mesenquimal, principal tipo celular encontrado na derme.

Observa-se na Figura 12, a expressão de citoqueratina de forma contínua e bem marcada principalmente na parte superficial da PHR-UFAM na condição selecionada sem SBF e KGF, bem como, vimentina marcada fortemente na matriz dérmica. Sendo assim, a PHR-UFAM apresentou positividade nos imunomarcadores de diferenciação de queratinócitos (citoqueratinas) na camada superior do tecido e fibroblastos (vimentina) na matriz. A marcação das citoqueratinas indica uma possível capacidade de diferenciação dos queratinócitos neste modelo, mas são necessárias outras marcações mais específicas dos estratos epiteliais que evidenciem com clareza sua diferenciação.

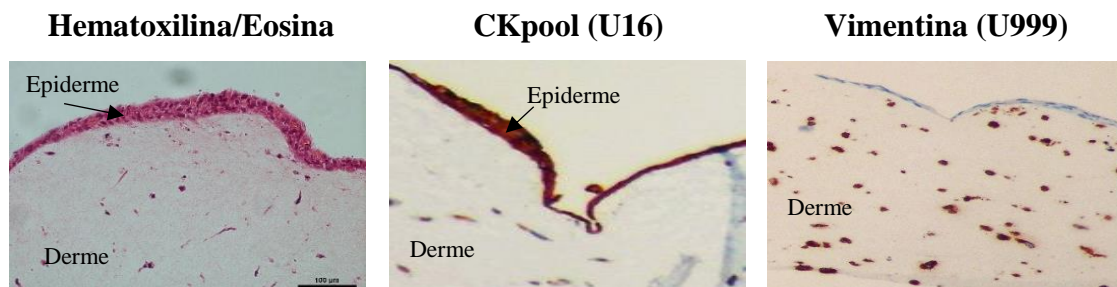


Figura 12- Coloração diferencial por Hematoxilina/Eosina e imunomarcção para coquetel de citoqueratinas (CKpool U16) e vimentina (U999) da PHR-UFAM na ausência de Soro Fetal Bovino (SFB) e Fator de Crescimento de Queratinócitos (KGF). Aumento 20X.

5.2.2 Viabilidade celular do controle negativo

Para definição da densidade óptica (DO) para o controle negativo avaliou-se o resultado obtido no MTT para a pele onde aplicou-se PBS topicamente. Os tecidos PHR-UFAM tratados com PBS como controle negativo demonstraram estabilidade em cultura, uma vez que a

viabilidade medida pelo ensaio de MTT foi constante ao longo dos ensaios realizados sem muita variação entre as leituras. Tais resultados encontram-se em conformidade com o guia OECD TG 439 como evidenciado na Tabela 4. O solvente de extração utilizado (isopropanol), apresentou DO suficientemente baixa ($< 0,05$) em todos os testes realizados, enquanto que os tecidos referentes ao controle negativo apresentaram valores de DO dentro da variabilidade inferior e superior aceitável para os modelos de referência validados descritos no guia da OECD.

Tabela 4 – Valores de densidade óptica (DO) para o controle negativo em ensaio de MTT para o modelo de pele humana reconstruída da UFAM (PHR-UFAM) e os modelos validados e descritos no Guia OECD 439, bem como o modelo de epiderme desenvolvido pela USP.

Modelo	Menor limite aceitável	Maior limite aceitável
PHR-UFAM	$\geq 0,6$	$\leq 0,8$
EpiSkin™	$\geq 0,6$	$\leq 1,5$
EpiDerm™ Tissue Model	$\geq 0,6$	$\leq 1,5$
SkinEthic™ RHE	$\geq 0,8$	$\leq 3,0$
LabCyte EPI-MODEL	$\geq 0,7$	$\leq 2,5$
Epiderme-USP	$\geq 0,6$	$\leq 1,7$

5.2.3 Avaliação da função barreira da PHR-UFAM – Tempo de Exposição 50 (ET50) e Concentração de exposição 50 (EC50)

A integridade e função barreira da PHR-UFAM foi analisada com o intuito de avaliar a viabilidade do tecido como preconizado pela OECD. A viabilidade do tecido foi medida pelo ensaio do MTT empregando-se o tempo de Exposição 50 (ET50) e concentração de exposição 50 (EC50). A EC50 é definida como a concentração necessária para que o SDS reduza a viabilidade celular em 50%, enquanto que o ET50 é definido como o tempo necessário para que o Triton X- 100 a 1% reduza a viabilidade celular em 50%. Na Figura 13 estão representados

os valores de EC₅₀ do SDS e ET₅₀ do Triton X- 100 a 1% no modelo de pele reconstruída PHR-UFAM.

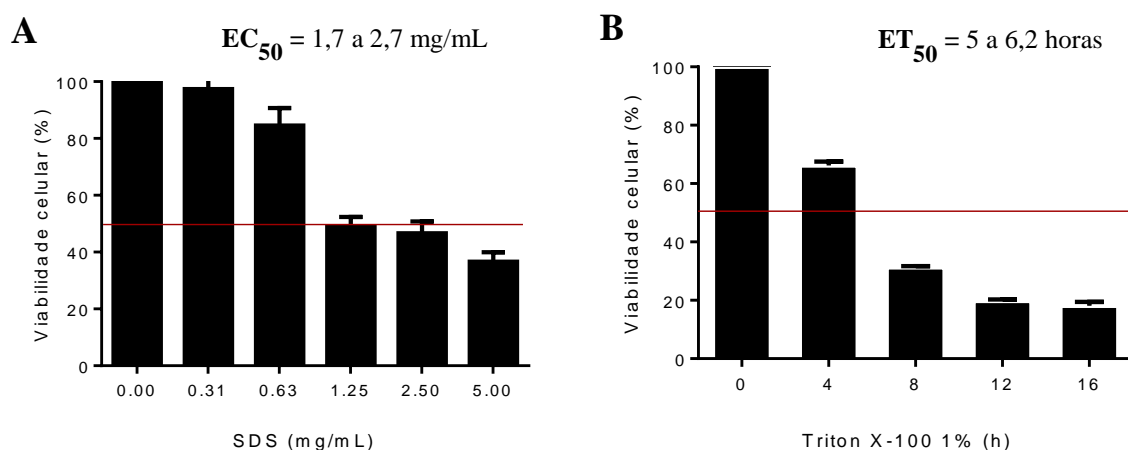


Figura 13 – Avaliação da função barreira do modelo de pele humana reconstruída da UFAM (PHR-UFAM). (A). Curva de viabilidade da PHR-UFAM após exposição a diferentes concentrações de SDS (0; 0,31; 0,63; 1,25, 2,5 e 5 mg/mL) por 18 h. (B). Viabilidade da PHR-UFAM após exposição a Triton X-100 1 % por diferentes períodos (0; 4; 8; 12 e 16 h). Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

Quando o intervalo obtido para a PHR-UFAM e o apresentado pelos modelos validados pela OECD são comparados observa-se que o mesmo apresenta uma função barreira comparável aos modelos comerciais validados (Tabela 5). A EC₅₀ obtida variou entre 1,7 a 2,7 mg/mL estando dentro do intervalo apresentado pelos modelos de referência validados que vão de 1 a 4 mg/mL. Para a ET₅₀ a variação obtida para a PHR-UFAM foi de 5 a 6,2 h, enquanto que para os modelos de referência esse período variou de 4 a 10 h.

Tabela 5 – Comparação entre a função barreira obtida para o modelo de equivalente de pele humana reconstruída da UFAM (PHR-UFAM) e os modelos de pele validados segundo o guia OECD 439

Modelo	EC ₅₀ SDS (18 h de tratamento)	ET ₅₀ Triton X-100 1%
PHR-UFAM	1,7 – 2,7 mg/mL	5 – 6,2 h
EpiSkin™	1 – 3 mg/mL	-
EpiDerm™ Tissue Model	-	4 – 8,7 h
SkinEthic™ RHE	-	4 – 10 h
LabCyte EPI-MODEL	1,4 – 4 mg/mL	-
Epiderme-USP	2,1 – 3,4 mg/mL	7,7 – 8,9 h

5.3 Avaliação da genotoxicidade em modelo de pele reconstruída *in vitro* PHR-UFAM

5.3.1 Ensaio para detecção de micronúcleos

A última atualização das diretrizes da OCDE para testes de genotoxicidade é de julho de 2016 para o teste de detecção de micronúcleo *in vitro*. Segundo a OECD TG 487 (2016), o teste do micronúcleo *in vitro* é capaz de fornecer uma base compreensiva para investigação de potencial danos cromossômicos durante a divisão celular após exposição à substâncias química. Nesse intuito, a PHR-UFAM foi testada como plataforma potencial para estudos *in vitro* de detecção de substâncias com atividade clastogênica sem ativação metabólica em células que sofreram divisão celular após a exposição à Mitomicina C, substância de referência como controle positivo segundo o Guia da OECD TG 487 (2016).

O procedimento de dissociação enzimática utilizando colagenase (1 mg/mL) foi escolhido porque forneceu uma velocidade de dissociação tecidual razoável (~ 40 min), ao mesmo tempo em que forneceu o alto nível de integridade celular necessário para determinação microscópica efetiva de micronúcleos, o qual preconiza que somente devem ser incluídos na contagem os espécimes que obtiverem viabilidade celular acima de 40%.

O tratamento dos fibroblastos e queratinócitos em cultura de monocamada com meio de cultura, acetona (veículo) e Mitomicina C (1,5 e 3 µg/mL) não foi capaz de provocar acentuada morte celular tanto em monocamada quanto no modelo de pele, as quais apresentaram viabilidade celular superior a 80%, como evidenciado na Figura 14. A fim de assegurar a viabilidade celular, as duas concentrações da Mitomicina C (1,5 e 3 µg/mL) foram utilizadas no tratamento da PHR-UFAM para contagem dos micronúcleos.

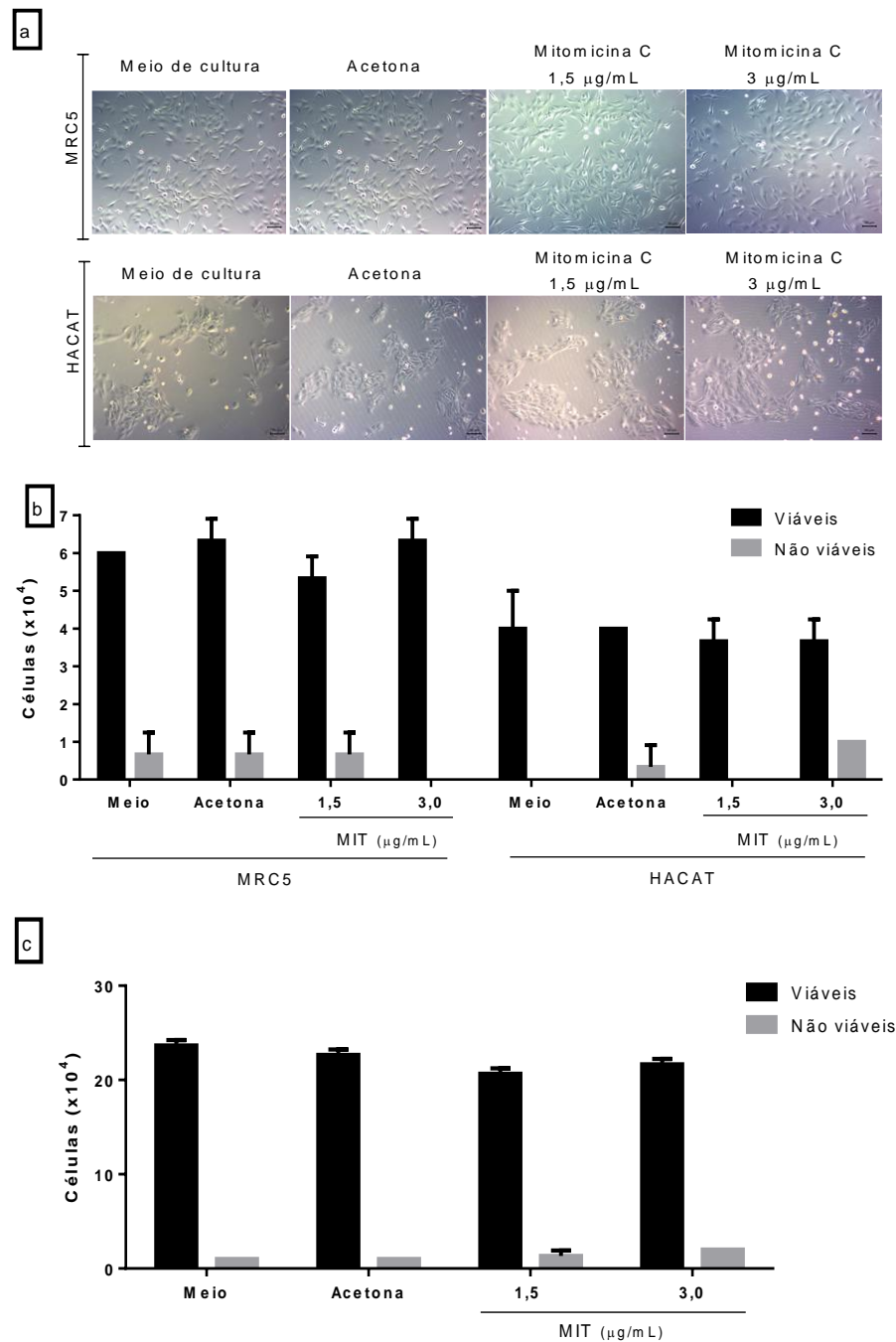


Figura 14 – Viabilidade celular de fibroblastos, queratinócitos e pele humana reconstruída PHR-UFAM sem tratamento (meio) e tratados com acetona e Mitomicina C (MIT) pelo método de exclusão por Azul de Tripan. (a). Fotomicrografias de fibroblastos (MRC5) e queratinócitos (HACAT) sem tratamento (meio) e após tratamento com acetona e Mitomicina-C (1,5 e 3 µg/mL); (b). Gráfico representativo da viabilidade celular após tratamento de fibroblastos e queratinócitos sem tratamento (meio) e após tratamento com acetona e Mitomicina C (1,5 e 3 µg/mL); (c). Gráfico representativo da viabilidade celular sem tratamento (meio) e após tratamento com acetona e Mitomicina C (1,5 e 3 µg/mL) da PHR-UFAM com aplicação tópica de 10 µL/pele. Os tratamentos foram realizados em regime de duas dosagens a cada 24 h, sendo a segunda com adição de citocalasina B. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

O tratamento com citocalasina-B com medição das frequências relativas de células mononucleadas e binucleadas é considerado um método preciso para quantificar o efeito sobre a proliferação celular e a atividade citotóxica ou citostática de um tratamento e garante que apenas as células que se dividiram durante ou após o tratamento são pontuadas microscopicamente. A PHR-UFAM foi exposta ao veículo (acetona) e Mitomicina C por aplicação direta e a exposição à Mitomicina C, nas duas concentrações 1,5 e 3 $\mu\text{g/mL}$ não induziram toxicidade como evidenciado pela falta de redução significativa no percentual de células binucleadas que variou de 29,40 a 39,47 em todas as condições de tratamento (Tabela 6 e Figura 15).

Tabela 6– Percentual de células mono/binucleadas e presença de micronúcleos após tratamento de 24 horas com Mitomicina C em fibroblasto humano (MRC5), queratinócito humano (Hacat) e PHR-UFAM. O percentual de cada tratamento foi calculado a partir da contagem de 500 células em triplicata.

	Tratamento	Células binucleadas (%)	Frequência de micronúcleos (%)
MRC5	Meio	33,13	0,84
	Acetona	29,40	1,83
	Mitomicina C 1,5 $\mu\text{g/mL}$	37,87	3,86
	Mitomicina C 3 $\mu\text{g/mL}$	39,47	4,56
HACAT	Meio	34,47	0,96
	Acetona	36,00	0,55
	Mitomicina C 1,5 $\mu\text{g/mL}$	30,00	5,13
	Mitomicina C 3 $\mu\text{g/mL}$	29,47	6,16
PHR-UFAM	Meio	36,87	0,56
	Acetona	34,33	0,37
	Mitomicina C 1,5 $\mu\text{g/mL}$	37,53	3,03
	Mitomicina C 3 $\mu\text{g/mL}$	34,33	3,51

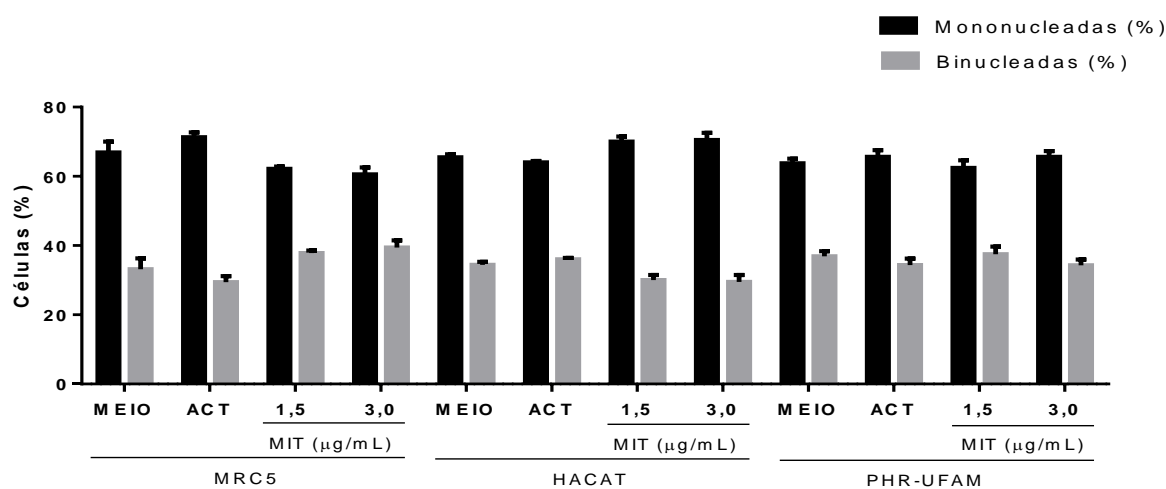


Figura 15 – Representação gráfica do percentual de células mono e binucleadas após tratamento de 24 horas com Mitomicina C em fibroblastos humanos (MRC5), queratinócitos humanos (HACAT) e PHR-UFAM nas concentrações de 1,5 e 3 µg/ml. Meio representa o controle não tratado, ACT o veículo acetona e MIT a mitomicina C. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

A Mitomicina C foi capaz de aumentar a frequência de micronúcleos comparado ao controle não tratado após tratamento de 24 h em cultura de fibroblastos com 3,86% e 4,56% de células micronucleadas, nas concentrações de 1,5 µg/mL e 3 µg/mL, respectivamente. O aumento significativo também foi observado no tratamento com Mitomicina C em queratinócitos com 5,13% e 6,16% de células micronucleadas, nas concentrações de 1,5 µg/mL e 3 µg/mL, respectivamente (Figura 16).

Após verificação da efetividade da Mitomicina C em aumentar a frequência de micronúcleos em cultura de monocamada de fibroblastos e queratinócitos, utilizados na montagem da pele humana reconstruída, a mesma foi utilizada no tratamento da PHR-UFAM. Os resultados do tratamento no modelo de pele deste estudo evidenciaram que a Mitomicina C foi capaz de aumentar significativamente a frequência de micronúcleos em 3,03% e 3,51% quando testada nas concentrações 1,5 e 3 µg/mL, respectivamente, comparado ao controle não tratado (0,56% de células micronucleadas) como representado na Figura 16.

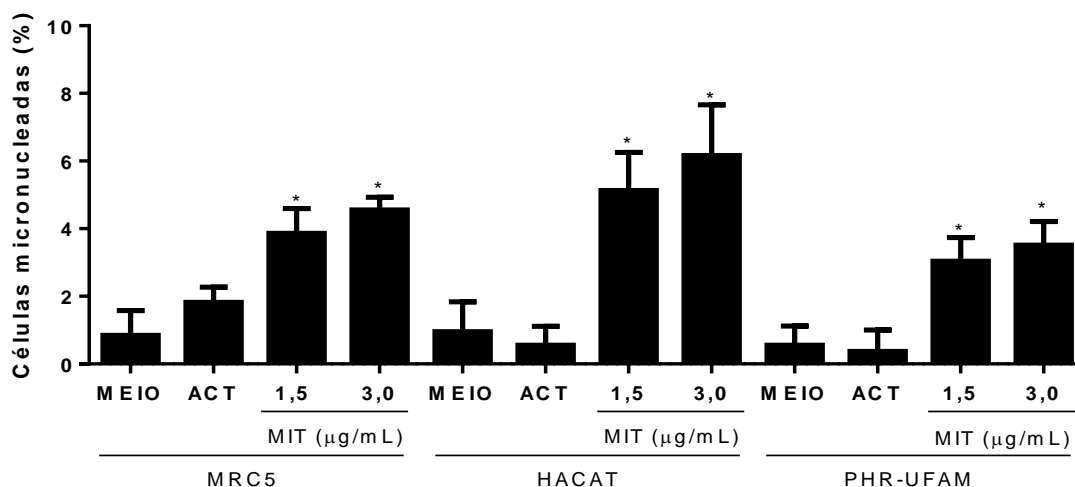


Figura 16 – Frequência de células micronucleadas após tratamento de 24 horas com Mitomicina C em fibroblastos humanos (MRC5), queratinócitos humanos (HACAT) e PHR-UFAM nas concentrações de 1,5 e 3 µg/mL. Meio representa o controle não tratado, ACT o veículo acetona e MIT a Mitomicina C. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com *** $p < 0,001$, sendo comparados com o controle sem tratamento (meio).

5.3.2 Ensaio do cometa em pH alcalino e neutro

O procedimento de dissociação das células enzimáticas baseou-se no método como descrito previamente para o ensaio de micronúcleo com colagenase 1 mg/mL para o teste do cometa em pH alcalino e neutro a fim de obter número suficiente de células únicas com valores aceitáveis de nucleoides em controles não tratados e após exposição de 3 horas com etilmetanossulfonato (EMS).

No ensaio de citotoxicidade em monocamada, o EMS não foi capaz de provocar a morte das células após 24 h de tratamento em fibroblastos e queratinócitos quando testado nas concentrações de 5 e 10 µM (porcentagem de viabilidade celular acima de 70% em fibroblastos e queratinócitos).

A atividade genotóxica do EMS foi confirmada no ensaio do cometa alcalino após tratamento de fibroblastos em cultura de monocamada, com índices de dano iguais a 82 e 112,3

quando testado nas concentrações de 5 e 10 μM , respectivamente, bem como em queratinócitos, com índices de dano iguais a 123,3 e 130 quando testado nas concentrações de 5 e 10 μM , respectivamente. Adicionalmente, no cometa neutro o EMS apresentou índice de dano médio de 71 e 129,3 em fibroblastos nas concentrações de 5 e 10 μM , respectivamente, bem como, 72,7 e 123,3 em queratinócitos nas concentrações de 5 e 10 μM , respectivamente. Esses dados foram significativamente maiores que o controle não tratado (meio de cultura).

As fotomicrografias e os gráficos do efeito do tratamento com Etilmetanossulfonato (EMS) em fibroblastos, queratinócitos e PHR-UFAM na fragmentação do DNA pelo ensaio do cometa estão representados nas Figuras 17 (pH alcalino) e 18 (pH neutro).

O tratamento com EMS no modelo de pele humana reconstruída PHR-UFAM foi capaz de desencadear genotoxicidade quando testado nas concentrações de 5 e 10 μM tanto no ensaio do cometa em pH alcalino (índices de dano iguais a 59,3 e 103,7, respectivamente) quanto no ensaio em pH neutro (índices de dano iguais a 40,7 e 125, respectivamente). Os índices de dano do tratamento com EMS na PHR-UFAM foram significativamente inferiores ao tratamento em cultura de monocamada frente às linhagens de fibroblastos na concentração de 5 μM nas duas versões do cometa, bem como frente à queratinócitos humanos nas duas concentrações testadas de 5 e 10 μM no ensaio do cometa em pH alcalino e na concentração de 5 μM na versão do cometa em pH neutro.

No modelo PHR-UFAM, o EMS na concentração de 10 μM foi capaz de desencadear mais danos ao DNA comparado a concentração de 5 μM nas duas versões do cometa alcalino e neutro, evidenciando que a concentração influencia na efetividade genotóxica do EMS no modelo de pele.

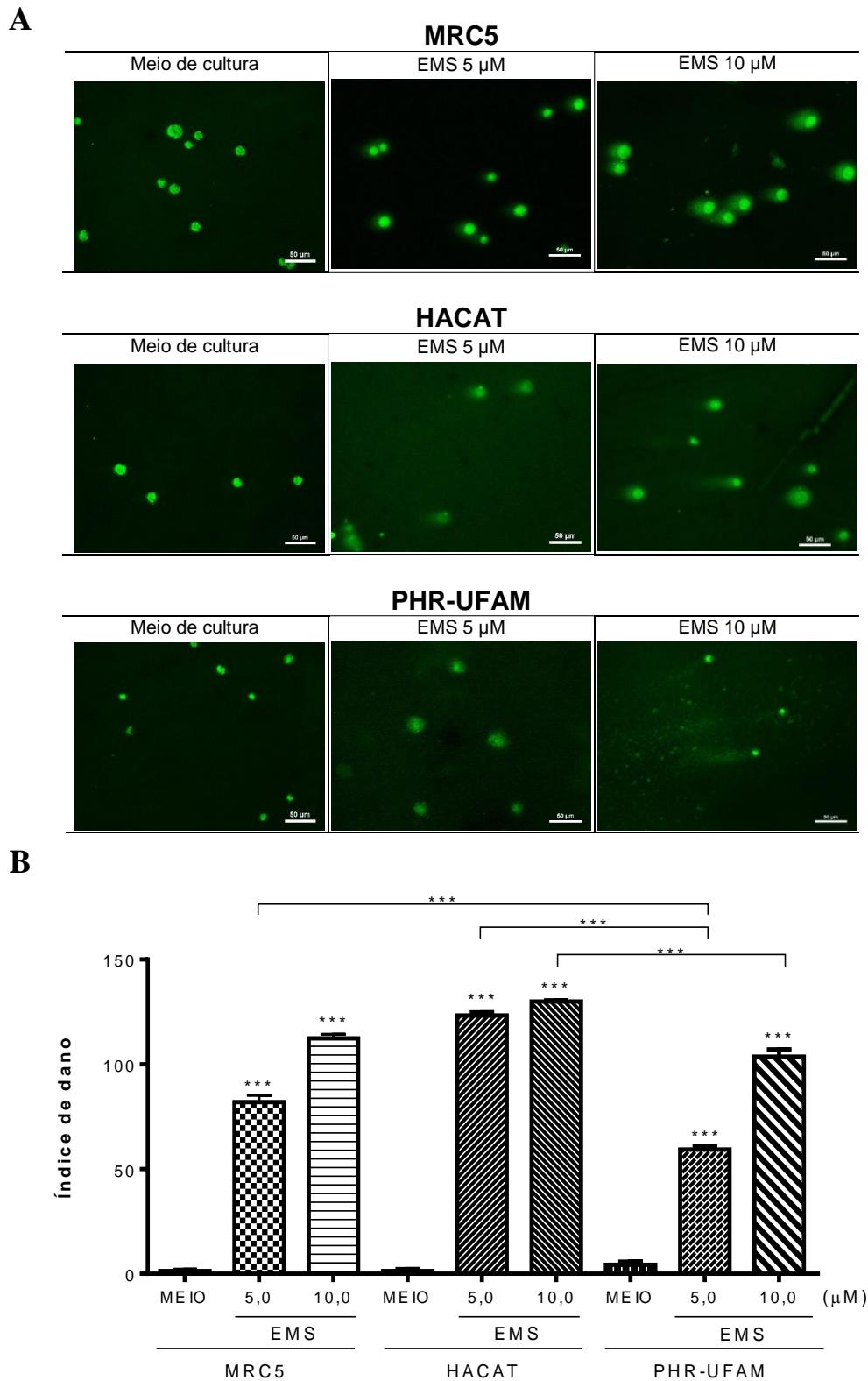


Figura 17 – Efeito do tratamento do Etilmetanossulfonato (EMS) em fibroblastos, queratinócitos e PHR-UFAM na fragmentação do DNA pelo ensaio do cometa em pH alcalino. (A). Fotomicrografias do efeito do tratamento do Etilmetanossulfonato (EMS) em pH alcalino. (B). Índice de dano do tratamento do Etilmetanossulfonato (EMS) em fibroblastos, queratinócitos e PHR-UFAM na fragmentação do DNA pelo ensaio do cometa em pH alcalino. Para leitura das lâminas, foram contados 50 cometas por lâmina em triplicata. Escala 100 μ m. Meio: Sem tratamento. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com *** $p < 0,001$.

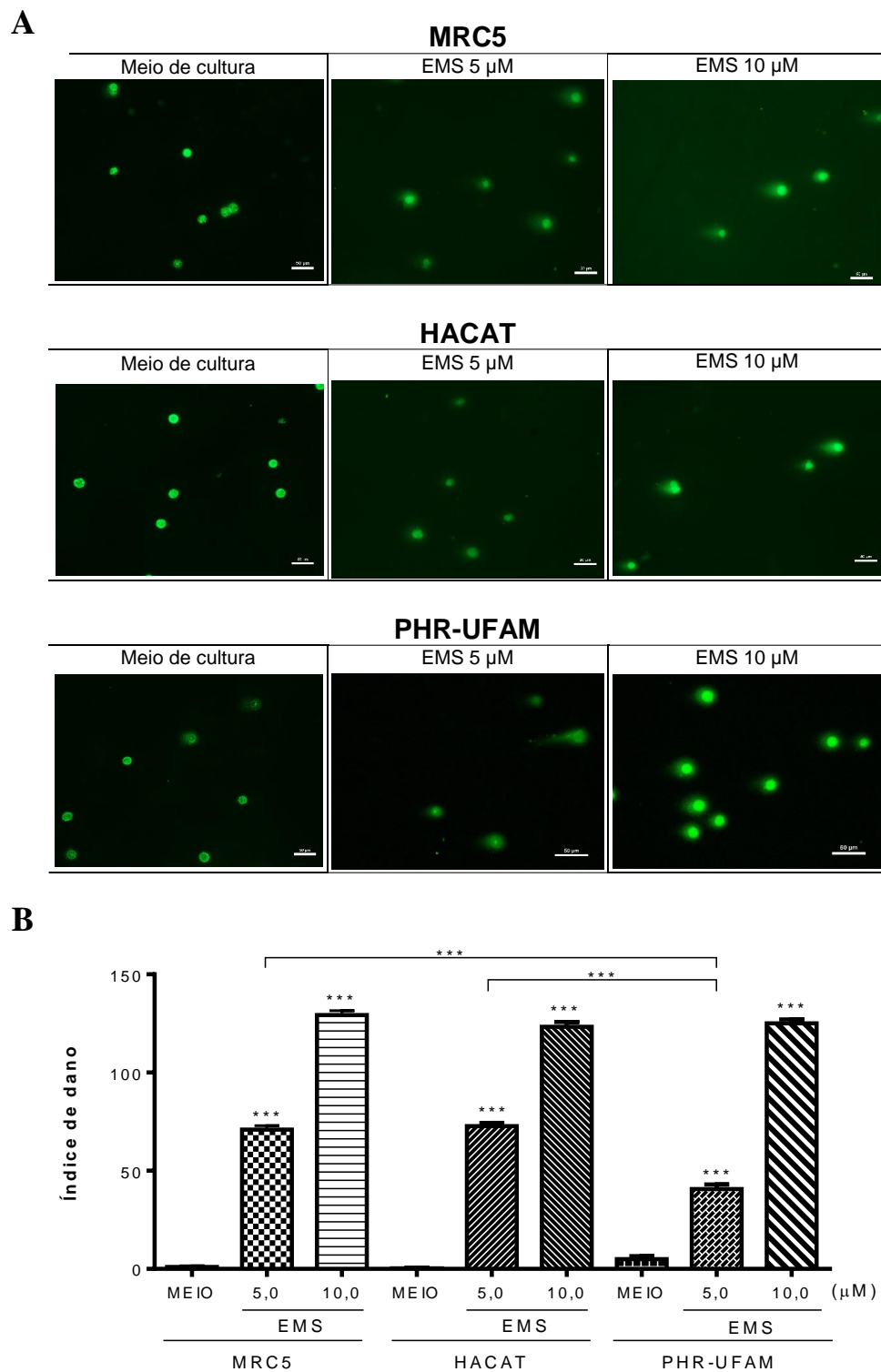


Figura 18 – Efeito do tratamento do Etilmetanossulfonato (EMS) em fibroblastos, queratinócitos e PHR-UFAM na fragmentação do DNA pelo ensaio do cometa em pH neutro. A: Fotomicrografias do efeito do tratamento do Etilmetanossulfonato (EMS) em pH neutro. B: Índice de dano do tratamento do Etilmetanossulfonato (EMS) em fibroblastos, queratinócitos e PHR-UFAM na fragmentação do DNA pelo ensaio do cometa em pH neutro. Escala 100 μM . Meio: Sem tratamento. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com *** $p < 0,001$.

5.3.3 Ensaio do cometa modificado para detecção de sítios de metilação no DNA

Com o intuito de verificar a capacidade da PHR-UFAM em detectar alterações epigenéticas na metilação do DNA, muitas vezes indetectáveis por um longo período de tempo *in vivo*, utilizou-se neste trabalho o ensaio do cometa modificado para detectar o nível global de DNA metilado em células únicas expostas a 5-azacitidina (agente desmetilante -inibidor da enzima de metilação- utilizada em ensaios clínicos) e, posteriormente, tratadas com a enzima de restrição HpaII com sítio alvo na metilação dos nucleotídeos CpG.

O procedimento de dissociação das células enzimáticas baseou-se no método como descrito previamente para o ensaio de micronúcleo e cometa em pH alcalino e neutro, com colagenase 1 mg/mL, para o teste do cometa modificado, a fim de obter números suficientes de células únicas com valores aceitáveis de nucleoides, em controles não tratados e após exposição de 24 h com 5-azacitidina (5-AZA).

A fim de garantir a utilização de concentrações não tóxicas de 5-azacitidina nos ensaios do cometa modificado para metilação, realizou-se o ensaio de viabilidade por exclusão de azul de tripan frente as linhagens de fibroblastos e queratinócitos cultivados em monocamada com tratamento de 24 h com 5-azacitidina, em quatro diferentes concentrações, que variaram de 1,25 μM e 10 μM . Somente a concentração de 1,25 μM apresentou viabilidade celular superior a 80%. Sendo assim, três concentrações próximas de 1,25 μM foram utilizadas no modelo de pele reconstruída PHR-UFAM para análise da metilação do DNA, as concentrações utilizadas foram 0,5, 1 e 1,5 μM (Figura 19).

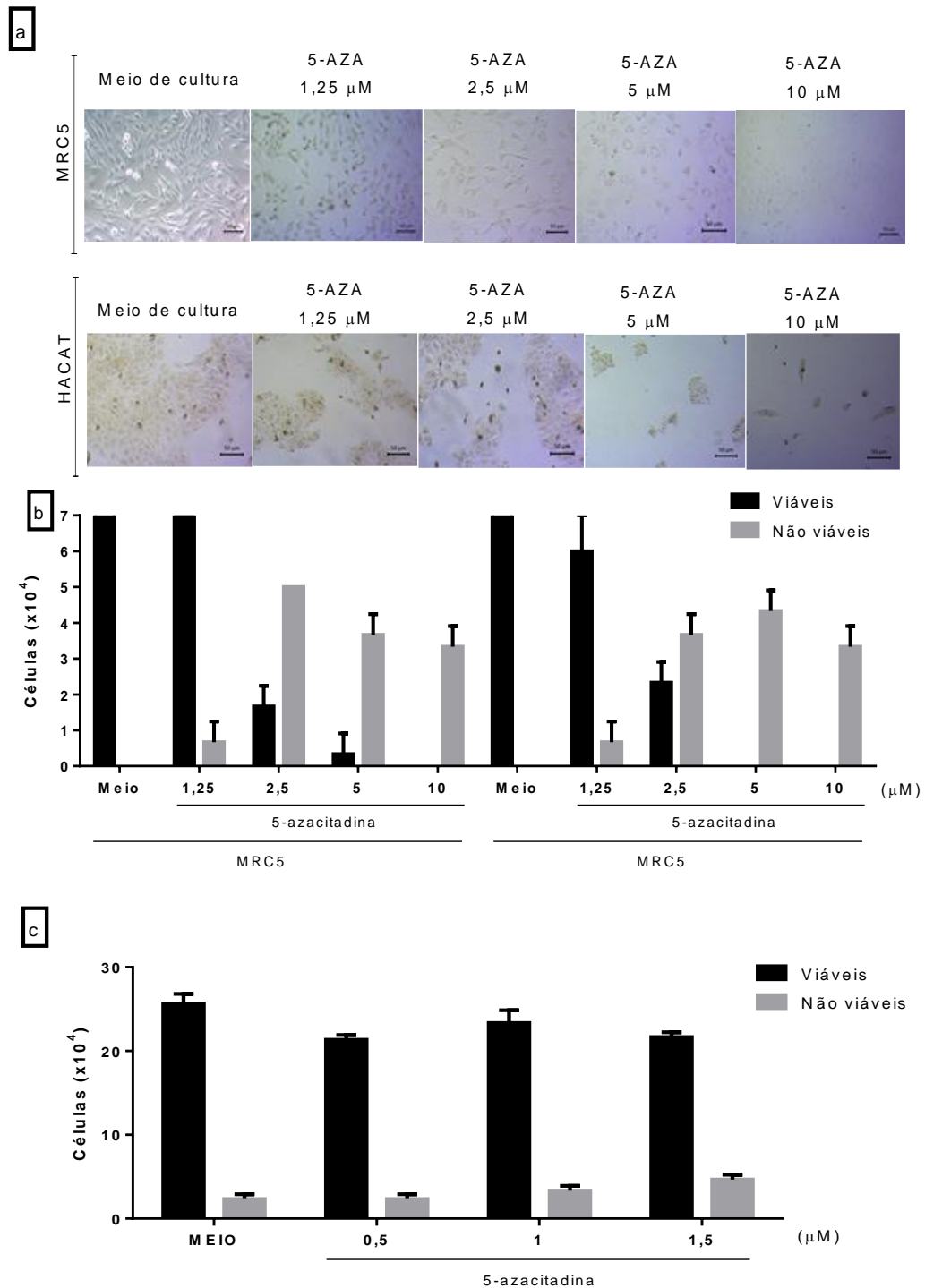


Figura 19 – Viabilidade celular de fibroblastos, queratinócitos e pele humana reconstruída PHR-UFAM submetidos ao tratamento com 5-azacitidina (5-AZA) pelo método de exclusão por Azul de Tripan. A. Fotomicrografias de fibroblastos (MRC5) e queratinócitos (HACAT) após tratamento com 5-azacitidina (1,25 a 10 μ M); B. Gráfico representativo da viabilidade celular após tratamento de fibroblastos e queratinócitos com 5-azacitidina (1,25 a 10 μ M); C. Gráfico representativo da viabilidade celular após tratamento com 5-azacitidina (0,5, 1 e 1,5 μ M) da PHR-UFAM. O tratamento da pele foi realizado com regime de uma dosagem de 10 μ L com tratamento de 24h. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

O ensaio do cometa modificado para identificação de sítios de metilação do DNA evidenciou a alta efetividade da enzima de restrição HpaII em todos as condições não tratadas com 5-azacitidina, em fibroblastos e queratinócitos com índices de dano iguais a 161,3 e 179,5, respectivamente, bem como no modelo PHR-UFAM não tratado (índice de dano igual a 129 (Figura 20).

A 5-azacitidina apresentou índices de dano inferiores ao controle não tratado (meio de cultura) quando testada nas concentrações de 1,25 e 2,5 μM frente às duas linhagens celulares de fibroblastos (107,3 e 77, respectivamente) e queratinócitos (115,3 e 81,3, respectivamente) em cultura de monocamada como mostrado na Figura 19. Resultado semelhante quando testada no modelo PHR-UFAM nas concentrações 0,5, 1,0 e 1,5 μM com índices de dano iguais a 107,5, 83,1 e 89,3, respectivamente.

A efetividade da 5-azacitidina no modelo PHR-UFAM apresentou-se inferior comparada ao modelo em monocamada ao analisar a redução do potencial de metilação ao controle não tratado (meio de cultura) em cada um dos modelos, evidenciando a influência da cultura tridimensional das células na atividade da 5-azacitidina. Além disso, o tratamento com 5-azacitina no modelo de pele não apresentou diferença na metilação do DNA entre as duas maiores concentrações testadas 1 e 1,5 μM , entretanto essas apresentaram menor índice de metilação que a concentrações de 0,5 μM .

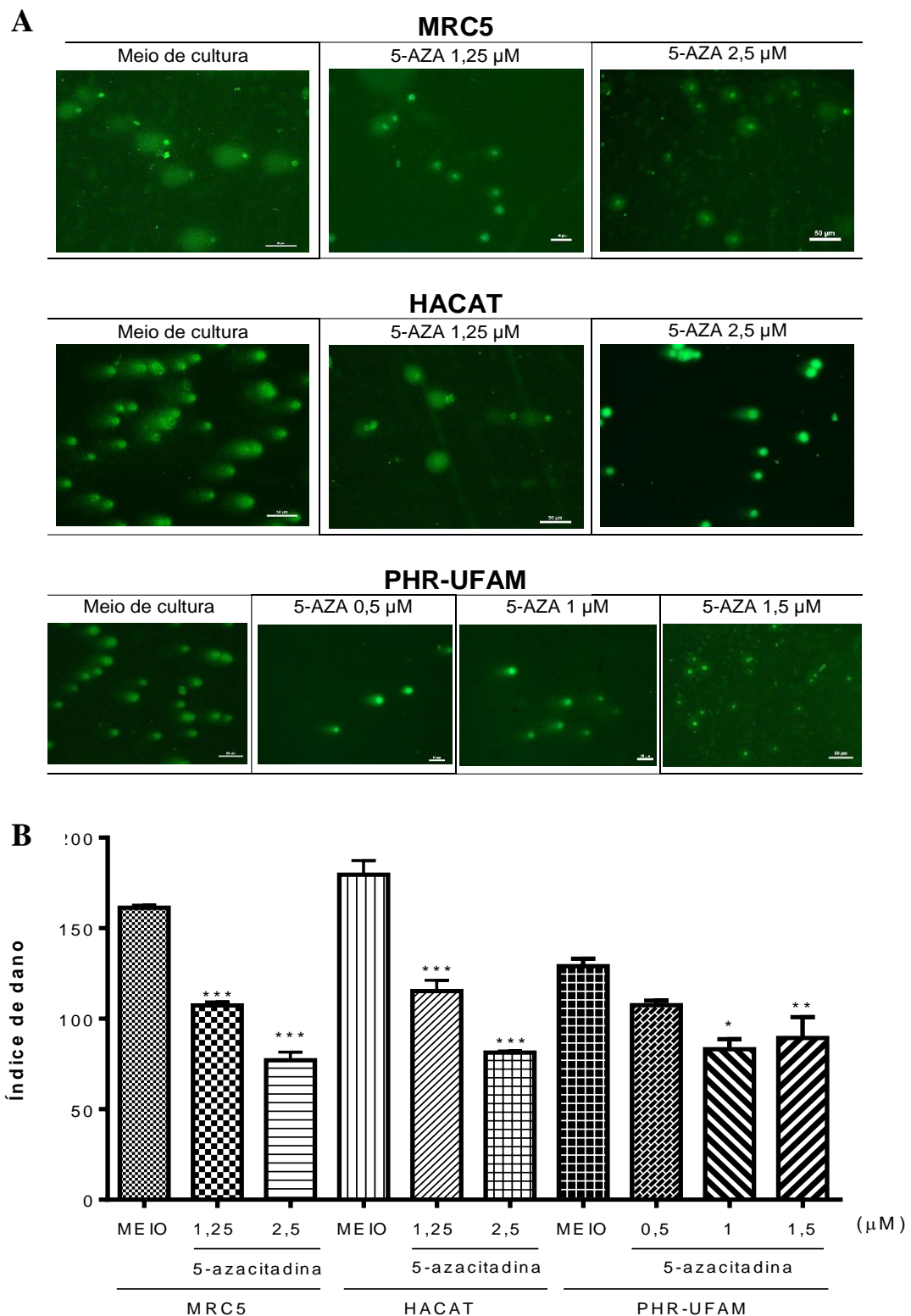


Figura 20 - Efeito do tratamento com 5-azacitidina (5-AZA) em fibroblastos, queratinócitos e PHR-UFAM na fragmentação do DNA pelo ensaio do cometa modificado para detecção de sítios de metilação do DNA. A: Fotomicrografias do efeito com 5-azacitidina (5-AZA) em fibroblastos, queratinócitos e PHR-UFAM após 24 horas de tratamento. B: Índice de dano do tratamento com 5-azacitidina (5-AZA) em fibroblastos, queratinócitos e PHR-UFAM após 24 horas de tratamento. Escala 100 μ M. Para o índice de dano usou-se ANOVA two way seguido do teste de Bonferroni. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com $p < 0,05$, sendo comparados com o controle sem tratamento (meio).

6 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de peles humanas reconstruídas *in vitro* dos últimos anos têm sido utilizando células de culturas primárias. Essas células são cultivadas a partir de um tecido vivo e assemelham-se muito com a pele nativa do ser humano. Contudo, possuem algumas limitações como: custo elevado, necessitam da aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, possuem tempo de vida útil curto e necessitam de laboratório autorizado e especializado para realizar o procedimento de retirada do tecido do organismo vivo para cultivo *in vitro* (REIJNDERS et al., 2015).

A pele obtida neste trabalho utilizando células de cultura permanente, mais facilmente acessíveis pelos laboratórios de pesquisa, mostrou-se semelhante aos modelos de pele humana *in vivo*, bem como aos modelos de pele humana reconstruída disponíveis comercialmente e validados de acordo com o Guia OECD 439, quanto a presença de uma epiderme constituída de várias camadas de queratinócitos, entretanto sem camada córnea visível histologicamente e uma matriz dérmica composta de fibroblastos embebidos em colágeno como representado na Figura 11 (BROHEM et al., 2011; PEDROSA, 2016).

O tempo de cultivo de 15 dias da PHR-UFAM é semelhante aos utilizados pelas peles reconhecidas e validadas pela OECD SkinEthic (17 dias), EpiSkin da L'oreal (13 dias), EPIDERM TM (21 dias) (BROHEM et al., 2011; NETZLAFF et al., 2005; PONEC, 2002). Segundo PONEC (2002), após o tempo prolongado em cultura acima de duas semanas, a pele humana reconstruída *in vitro* permanece viável e exibe todos os sinais de um programa de diferenciação normal, a espessura do estrato córneo aumenta gradualmente com o tempo podendo levar a uma maior resistência aos estímulos ambientais que não caracterizam uma condição normal.

Estudos realizados por Seo et al. (2012) evidenciaram que a linhagem de queratinócitos permanente e não transformada HACAT apresenta limitações quanto ao perfil transcricional de proteínas associadas ao envelope cornificado, como filagrina, loricrina, involucrina e citoqueratina-10, proteínas importantes na constituição da função barreira da pele, comparada às células primárias de queratinócitos (NHKs). Estes resultados corroboram com os achados da PHR-UFAM, onde não foi possível visualizar na análise morfológica no epitélio cornificado. Entretanto, análises moleculares e histológicas confirmatórias como a imunohistoquímica para proteínas específicas do estrato córneo da pele são necessários para confirmar a não diferenciação.

Segundo Reijnders et al., (2015), a interação entre os fibroblastos dérmicos e os queratinócitos epidérmicos que secretarem um coquetel de fatores de crescimento (EGF, KGF), citoqueratinas (10, 14, dentre outras), componentes na matriz extracelular (elastina, fibronectina, colágeno) é o que permite a manutenção e restauração da homeostase da pele humana. Por isso, são componentes celulares essenciais para a composição e estruturação da pele humana reconstruída *in vivo*.

O efeito positivo dos fibroblastos e queratinócitos na geração de peles artificiais pode ocorrer pela interação direta entre estas células e sinalização através de fatores solúveis. Alguns estudos demonstram que os fibroblastos secretam importantes fatores solúveis envolvidos na diferenciação dos queratinócitos, como fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), fator de transformação do crescimento (TGF), bem como fator de crescimento epidérmico (KGF) (EL GHALBZOURI; PONEC, 2004; NG; IKEDA, 2011). A ausência de KGF no cultivo da PHR-UFAM foi capaz de promover um melhor desenvolvimento da camada epidérmica com um número maior de camadas celulares. Contudo,

essa condição não retira a possibilidade de haver produção de KGF pelos fibroblastos da matriz e, assim, auxiliar na formação epidérmica.

Segundo Abdel-Naser et al. (2005) e Pedrosa (2016), a incorporação de suplementos ao meio de cultura de células que compõem os tecidos reconstruídos de pele humana, tais como agentes mitógenos de queratinócitos como o fator de crescimento epidérmico (EGF), TGF- α , toxina colérica, hidrocortisona, aumenta o rendimento celular e permite um maior desenvolvimento do tecido epitelial. Tais agentes encontram-se no meio de cultura MCPele utilizado durante o cultivo da PHR-UFAM e auxiliaram na reconstrução da pele.

Diversos trabalhos têm descrito a obtenção de uma pele humana reconstruída *in vitro* na ausência de SFB, seja no desenvolvimento ou cultivo de queratinócitos. Entretanto, a maioria deles utiliza células de cultura primária e poucos utilizam células permanente como este trabalho (LAMB; AMBLER, 2013; MUJAJ et al., 2010; NG; IKEDA, 2011; PEDROSA, 2016). Elson, Frazier & Glaser (2012) observaram que concentrações elevadas de soro inibem a fixação das células epidérmicas ao colágeno IV (componente da membrana basal da epiderme), mas que ainda são necessárias concentrações mínimas de SFB para sua fixação, tal fato, pode sugerir um dos motivos pelo qual a PHR-UFAM obteve melhor desenvolvimento após a diminuição do SFB de seu meio de cultivo MCPele. Vale ressaltar a presença de concentração mínima de SFB durante a montagem do tecido oriunda do cultivo dos fibroblastos e queratinócitos com meio de cultura acrescido de 10% de SFB, contudo, o meio de cultivo da pele MCPele não foi acrescido de SFB durante os 15 dias de cultivo.

O SBF é uma mistura complexa de proteínas que quando adicionada ao meio de cultura introduz elementos não definidos ao mesmo e isso pode levar a uma não uniformidade dos resultados que dificilmente pode ser rastreada. Além disso, a variabilidade geográfica dos lotes de SFB, escassez imprevisível no fornecimento global, seus constituintes não bem definidos

podem interagir de forma não intencional com substâncias de teste; presença de endotoxinas, micoplasmas e contaminantes virais ou proteínas priônicas estão entre as desvantagens relacionadas ao uso de SFB no cultivo de células (VAN DER VALK, 2017).

Catarino (2015) e NG & Ikeda (2011), demonstraram ser possível gerar uma epiderme equivalente à humana sobre um equivalente dérmico usando meio de cultura livre de soro sem nenhum prejuízo ao correto desenvolvimento do modelo. Seus modelos também não são acrescidos de KGF, contudo, suas células são de origem primária, diferenciando-os da PHR-UFAM. A não suplementação de KGF não extingue a possibilidade da sua presença durante o cultivo da pele, visto que vários estudos evidenciam que este é um dos fatores solúveis secretados por fibroblastos envolvido na diferenciação dos queratinócitos (CATARINO, 2015; EL GHALBZOURI; PONEC, 2004; NG; IKEDA, 2011).

A PHR-UFAM obtida possui semelhança histológica, parâmetros de viabilidade, integridade de função barreira exigidos pela OECD, com os modelos de peles artificiais disponíveis comercialmente e a pele humana nativa, mesmo não apresentando estrato córneo visível histologicamente. De acordo com Hoffmann et al. (2005) apresentar tolerância contra detergentes é um dos principais indicadores de uma pele humana reconstruída com função barreira intacta. A PHR-UFAM apresentou tolerância adequada ao Triton X-100 e ao SDS, semelhante aos modelos de referência validados, sugerindo que este modelo tem uma camada epidérmica suficientemente robusta para resistir à penetração rápida dos produtos químicos.

Estudos vem sendo realizados com os alguns modelos de pele reconhecidos pela OECD para avaliar suas aplicações para detecção de micronúcleos, como é o caso da EPIDERM TM. Segundo Curren et al. (2006), em um dos ensaios de validação para detecção de micronúcleos no modelo EPIDERM TM, o tratamento tópico com 10 µL de Mitomicina C (3 µg/mL diluída em acetona) foi capaz de induzir aproximadamente 2% de células micronucleadas após 24 h de

tratamento em regime de duas dosagens a cada 24h. Resultado este semelhante ao encontrado com a PHR-UFAM, na qual a Mitomicina C foi capaz de induzir 3,03% de células micronucleadas nas mesmas condições, mesmo não possuindo extrato córneo evidente.

Com base nos resultados obtidos no ensaio do cometa em pH alcalino e neutro, o modelo PHR-UFAM foi capaz de identificar o potencial genotóxico do EMS causando quebras de fitas simples, duplas, sítios álcali-labeis de DNA. Os índices de dano quando utilizado o modelo PHR-UFAM foram menores que o modelo em monocamada, indicando que a estrutura tridimensional das células no modelo de pele humana reconstruída altera a atividade genotóxica do EMS. Esse efeito era esperado em virtude das alterações de permeabilidade e quantidade de células na pele reconstruída.

Segundo Reus et al. (2013), em estudo de validação da aplicação do ensaio do cometa em pH alcalino utilizando o modelo de epiderme humana reconstruída *in vitro* EPIDERM TM, o metilmetanossulfonato (MMS), testado na concentração de 45 μ M, foi capaz de promover 25 a 50% de fragmentação de DNA após tratamento de 3 h. Um estudo semelhante de validação utilizando o MMS, entretanto utilizando o modelo de pele humana reconstruída *in vitro* constituída de epiderme e derme EPIDERM TM FT, evidenciou que o MMS foi capaz de promover 40 a 60% de fragmentação de DNA após 48 h de tratamento (REISINGER et al., 2018). Estes resultados, bem como, os obtidos neste trabalho, reforçam a aplicabilidade do modelo de pele humana tridimensional *in vitro* para avaliar a genotoxicidade de substâncias pelo ensaio do cometa.

A organização estrutural da pele humana *in vivo*, bem como a reconstruída *in vitro*, dividida em subcamadas da epiderme e derme, atua eficientemente como uma função barreira tridimensional contra agentes externos (físicos, químicos e biológicos), o que difere dos modelos em monocamada de cultura celular, cuja interação do agente externo (substância

química teste, por exemplo) ocorre de forma direta com a célula. Com isso, a atividade do agente testado em cultura tridimensional aproxima-se mais do que poderia ocorrer *in vivo*, garantindo resultados mais fidedignos comparados ao modelo bidimensional de cultura celular (BROHEM et al., 2011; PROKSCH; BRANDNER; JENSEN, 2008; WEVER et al., 2015).

Segundo Oliveira (2012), estudos que avaliam os efeitos epigenéticos de substâncias potenciais a serem utilizadas por seres humanos, complementares aos modelos genéticos, constituem uma poderosa ferramenta para melhor entendimento dos mecanismos de ação dessas substâncias. Estudos envolvendo a metilação do DNA, como o cometa modificado para sítios de metilação no DNA, utilizado nesta pesquisa, surgem como um importante campo de pesquisa em muitas doenças, uma vez que a transcrição gênica pode ser modificada em virtude da alteração do padrão de metilação do DNA e levar a perda de função de um gene, por exemplo (OLIVEIRA et al., 2010).

Segundo Wentzel et al. (2010), ao utilizar a enzima de restrição HpaII no ensaio do cometa modificado obtém-se um aumento da fragmentação do DNA em virtude da mesma atuar em sítios de dinucleotídeos CpG metilados digerindo-os. Com isso, é possível analisar a atuação de substâncias na metilação do DNA pela alteração no padrão da fragmentação do DNA.

O tratamento da PHR-UFAM com 5-azacitidina nas três concentrações testadas 0,5; 1 e 1,5 μM foi capaz de reduzir a metilação do DNA comparado ao controle sem tratamento e de forma geral ao modelo em monocamada. Esses resultados reforçam a influência da matriz tridimensional na atividade da 5-azacitidina, que apresenta-se menos efetiva muitas vezes por necessitar de outros fatores necessários para a mesma exercer sua atividade, como penetração no tecido para atingir as células e conseqüentemente seu material genético, presença da matriz extracelular, receptores, que estão presentes na cultura tridimensional.

PAN et al. (2017) evidenciaram em seus estudos utilizando células de carcinoma de fígado e mama em modelo de cultura tridimensional utilizando Matrigel que o tratamento com 5-azacitidina (5 μ M), durante 72 h, diminuiu a metilação global do DNA ao comparar com o modelo de cultura bidimensional. Outro estudo que avaliou a metilação do DNA, envolvendo a geração de um EPIcomet-chip, revelou que a 5-azacitidina (5 μ M) foi capaz de reduzir em 0,5% o percentual de metilação global do DNA neste modelo comparado ao controle sem tratamento com exposição de 48h (TOWNSEND et al., 2017).

O desenvolvimento de culturas celulares tridimensionais utilizadas para a geração de pele humana reconstruída *in vitro* é atualmente uma área de pesquisa ativa, não só para estudar a segurança de substâncias com potencial terapêutico ou cosmético, mas também para desenvolver novos produtos para cobrir feridas, reduzir deformidades, e fornecer melhores resultados estéticos em menos tempo e com menores custos (FERREIRA et al., 2011; OH et al., 2013; REIJNDERS et al., 2015; SAKOLISH et al., 2016).

O desenvolvimento de novos modelos de pele humana reconstruída *in vitro* significa autonomia para muitos países e empresas. Além disso, grandes empresas e laboratórios de pesquisa no Brasil podem se beneficiar com modelos mais diversificados, com menor custo e maior disponibilidade que os modelos produzidos no exterior. Diante disso, para uma nova proposta de modelo que requeira validação, independentemente da finalidade ou tipo de estudo o estabelecimento de prioridades deve ser dado aos aspectos científicos desse processo (VINARDELL; MITJANS, 2008).

7 CONCLUSÃO

Com este trabalho foi possível desenvolver um modelo de pele humana reconstruída PHR-UFAM, constituída de fibroblastos e queratinócitos imortalizados, cultivada em meio de manutenção sem adição Soro Fetal Bovino e sem fator de crescimento de queratinócitos (KGF).

A PHR-UFAM apresentou semelhança morfológica e estrutural à pele humana *in vivo* e aos modelos de pele humana reconstruída validados pela OECD e disponíveis comercialmente, sem apresentar estrato córneo evidente histologicamente.

Mesmo sem apresentar estrato córneo evidente histologicamente, a qualidade do modelo desenvolvido está em concordância com os parâmetros de integridade, viabilidade e função barreira estipulados pela Organização de Desenvolvimento e Cooperação Econômica (OECD), evidenciando o potencial deste modelo na avaliação de ensaios de viabilidade celular e função barreira.

Nos ensaios de genotoxicidade, a PHR-UFAM obteve resultados semelhantes aos modelos de pele humana reconstruída validados pela OECD e disponíveis comercialmente para os ensaios de detecção de micronúcleos. Bem como, testes para avaliação do dano ao DNA pelos métodos do cometa alcalino e neutro e cometa modificado para detecção de sítios de metilação no DNA.

Para experimentos futuros são necessários ensaios de validação para confirmar as aplicações propostas, além de ensaios para avaliação de irritabilidade, corrosão e absorção de substâncias com potencial terapêutico/cosmético como preconizado pela OECD.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARDEMA, M. J. et al. International prevalidation studies of the EpiDerm™ 3D human reconstructed skin micronucleus (RSMN) assay: Transferability and reproducibility. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 701, n. 2, p. 123–131, 2010.

ABDEL-NASER, M. B. et al. Human Skin Cell Culture and its Impact on Dermatology. **Egyptian Dermatology Online Journal**, v. 1, n. 2, p. 1–25, 2005.

ANDERSON, B. E. **Sistema Tegumentar**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

ANVISA. **Theme Series - Cosmetic Products Stability Guide** (National Health Surveillance Agency, Ed.) Brasília, 2004. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=108225&_101_type=document>. Acesso em: 15 out. 2017

ANVISA. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Versão 2**. Brasília, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, , 2013.

ANWAY, M. D. et al. Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors and Male Fertility. **Science**, v. 308, n. June, p. 1466–1469, 2005.

AUXENFANS, C. et al. Evolution of three dimensional skin equivalent models reconstructed in vitro by tissue engineering. **Eur J Dermatol**, v. 19, n. 2, p. 107–113, 2009.

BAE, I.; PARK, J. W.; KIM, D. Enhanced regenerative healing efficacy of a highly skin-permeable growth factor nanocomplex in a full-thickness excisional mouse wound model. **International Journal of Nanomedicine**, v. 4, n. 9, p. 4551–4567, 2014.

BALASUBRAMANI, M.; KUMAR, T. R.; BABU, M. Skin substitutes: a review. **Burns**, v. 27, p. 534–544, 2001.

BARBOSA, F. DE S. **Modelo de impedância de ordem fracional para a resposta inflamatória cutânea**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.

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.

BIRGERSDOTTER, A.; SANDBERG, R.; ERNBERG, I. Gene expression perturbation in vitro — A growing case for three-dimensional (3D) culture systems. **Seminars in Cancer Biology**, v. 15, p. 405–412, 2005.

BOEHNKE, K. et al. Effects of fibroblasts and microenvironment on epidermal regeneration and tissue function in long-term skin equivalents. **European Journal of Cell Biology**, v. 86, p. 731–746, 2007.

BOELSMA, E. et al. Characterization and Comparison of Reconstructed Skin Models : Morphological and Immunohistochemical Evaluation. **Acta Derm Venereol**, v. 80, n. July, p. 82–88, 2000.

BOUWSTRA, J. A. et al. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. **Progress in Lipid Research**, v. 42, p. 1–36, 2003.

BOUWSTRA, J. A. et al. Water Distribution and Natural Moisturizer Factor Content in Human Skin Equivalents Are Regulated by Environmental Relative Humidity. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, n. 2, p. 378–388, 2008.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/106351/107910/Guia+para+Avaliação+de+Segurança+de+Produtos+Cosméticos/ab0c660d-3a8c-4698-853a-096501c1dc7c>>. Acesso em: 15 dez. 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Dispõe sobre os requisitos técnicos para a regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e dá outras providências. Resolução - RDC Nº 07, de 10 de fevereiro de 2015. Diário Oficial da União, 2015a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC Nº 09, de 20 de fevereiro de 2015, 2015b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC Nº 83, de 17 de junho de 2016, 2016.

BROHEM, C. A. et al. Artificial Skin in Perspective: Concepts and Applications. **Pigment Cell Melanoma Res.**, v. 24, n. 1, p. 35–50, 2011.

CANDI, E.; SCHMIDT, R.; MELINO, G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. **Nature Publishing Group**, v. 6, n. April, p. 328–340, 2005.

CATARINO, C. M. **Desenvolvimento de epiderme equivalente sobre membrana do tipo transwell e membrana biopolimérica.** [s.l.] Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2015.

CHIARI, B. G. et al. Estudo da segurança de cosméticos: presente e futuro. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 3, p. 323–330, 2012.

CHORILLI, M. et al. Avaliação Histológica da Pele Após Exposição à Gel Acrescido de Hialuronidase Associado ou Não a Ultra-Som. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 1, p. 26–30, 2007.

CHORILLI, M.; SCARPA, M. V. Toxicologia dos Cosméticos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 1, p. 144–54, 2007.

CHUANG, J. C. et al. Comparison of biological effects of non-nucleoside DNA methylation inhibitors versus 5-aza-2 V -deoxycytidine. **MolCancer Ther**, v. 4, n. October, p. 1515–1520, 2005.

COELHO, M.; OLIVEIRA, T.; FERNANDES, R. State of the art paper Biochemistry of adipose tissue : an endocrine organ. **Archives of Medical Science**, v. 2, n. Figure 1, p. 191–200, 2013.

CONCEA. **Normativas do CONCEA para produção, manutenção ou utilização de animais em atividade de ensino ou pesquisa científica.** 2. ed. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), 2015.

CONCEA. **Concelho Nacional de Experimentação Anímal - CONCEA. Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica - DBCA.** Disponível em: <http://nharvey.icb.usp.br/corpoeditorial/ARQUIVOS/etica-animal/RESOLUCAO_NORMATIVA_N_30_DE_02_02_2016.pdf>. Acesso em: 18 jan. 2017.

CURREN, R. D. et al. Development of a method for assessing micronucleus induction in a 3D human skin model (EpiDerm). **Mutation research**, v. 607, n. 2, p. 192–204, 2006.

DAHL, E. L. et al. The reconstructed skin micronucleus assay (RSMN) in EpiDerm™: Detailed protocol and harmonized scoring atlas. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 720, n. 1–2, p. 42–52, 2011.

DESHMUKH, G. R. et al. Toxicology in Vitro In vitro skin corrosion : Human skin model test – A validation study. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 6, p. 1072–1074, 2012.

DOLINOY, D. C.; JIRTLE, R. L.; CAROLINA, N. Review Article Environmental Epigenomics in Human Health and Disease. **Environmental andMolecularMutagenesis**, v. 8, n. January, p. 4–8, 2008.

EFSA. Minimum Criteria for the acceptance of in vivo alkaline Comet Assay Reports 1. **European Food Safety Authority Journal**, v. 10, n. 11, p. 1–12, 2012.

EL GHALBZOURI, A.; PONEC, M. Diffusible factors released by fibroblasts support epidermal morphogenesis and deposition of basement membrane components. **Wound Repair and Regeneration**, v. 12, n. 3, p. 359–367, 2004.

ELSON, E.; FRAZIER, W.; GLASER, L. (ED. . **Cell membranes: methods and reviews**. Volume 3 ed. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2012.

FDA. **Guidance for Industry and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use Guidance for Industry and Data Interpretation for Human Use**. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm074931.pdf>>. Acesso em: 21 jan. 2017.

FENECH, M. et al. Detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 534, n. 1–2, p. 65–75, 2003.

FERREIRA, M. C. et al. Skin substitutes: current concepts and a new classification system. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 26, n. 4, p. 696–702, 2011.

FRANKART, A. et al. Epidermal morphogenesis during progressive in vitro 3D reconstruction at the air – liquid interface. **Experimental Dermatology**, v. 21, p. 871–875, 2012.

FRÖTSCHL, R. Experiences with the in vivo and in vitro comet assay in regulatory testing. **Mutagenesis**, v. 30, p. 51–57, 2015.

GIBBS, S. et al. An epidermal equivalent assay for identification and ranking potency of contact sensitizers. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 272, n. 2, p. 529–541, 2013.

GODIN, B.; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 1152–1161, 2007.

GREEN, J. A.; YAMADA, K. M. Three-dimensional microenvironments modulate fibroblast signaling responses ☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 1293–1298, 2007.

GRINNELL, F. Fibroblast – collagen- matrix contraction : signalling and mechanical loading. **Cell Biology**, v. 10, n. September, p. 377–380, 2000.

HASSKARL, J. Increased In Vitro Lifespan of Primary Human Keratinocytes Correlates with Decreased Migration. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, p. 1179–1181, 2006.

HOFFMANN, J. et al. Epidermal-skin-test 1000 (EST-1000) - A new reconstructed epidermis for in vitro skin corrosivity testing. **Toxicology in Vitro**, v. 19, n. 7, p. 925–929, 2005.

HOLBROOK, K. A.; HENNINGS, H. Phenotypic expression of epidermal cells in vitro a review. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 81, p. 11–24, 1983.

HOLÍKOVÁ, Z. et al. Dendritic cells and their role in skin-induced immune responses. **European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 15, p. 116–120, 2001.

IBRAHIM, M. M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. **Obesity reviews: an official Journal of International Association for the Study of Obesity**, p. 11–18, 2009.

IOZZO, R. V. Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling. **Nature Publishing Group**, v. 6, n. August, p. 646–656, 2005.

KEENAN, J.; PEARSON, D.; CLYNES, M. The role of recombinant proteins in the development of serum-free media. **Cytotechnology**, v. 50, p. 49–56, 2006.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. January, p. 2548–2556, 2004.

KOJIMA, H. et al. A catch-up validation study of an in vitro skin irritation test method using reconstructed human epidermis LabCyte EPI-MODEL24. **Journal Applied Toxicology**, v. 34, p. 766–774, 2014.

KORIA, P.; ANDREADIS, S. T. KGF promotes integrin $\alpha 5$ expression through CCAAT / enhancer-binding protein-B. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 293, p. 1020–31, 2007.

LAMB, R.; AMBLER, C. A. Keratinocytes Propagated in Serum-Free , Feeder-Free Culture Conditions Fail to Form Stratified Epidermis in a Reconstituted Skin Model. **Plos One**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2013.

LEWIES, A. et al. Using a medium-throughput comet assay to evaluate the global DNA methylation status of single cells. **Frontiers in genetics - Methods Article**, v. 5, n. July, p. 1–6, 2014.

LYKO, F.; BROWN, R. DNA Methyltransferase Inhibitors and the Development of Epigenetic Cancer Therapies. **JNCI J Natl Cancer Inst**, v. 97, n. 20, p. 1498–1506, 2005.

MAAS-SZABOWSKI, N.; STÄRKER, A.; FUSENIG, N. E. Epidermal tissue regeneration and stromal interaction in HaCaT cells is initiated by TGF- α . **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 14, p. 2937–48, 2003.

MACNEIL, S. Progress and opportunities for tissue-engineered skin. **Nature**, v. 445, n. February, 2007.

MARIA, S. S.; WADA, M. L. F. Cytochemical Analysis of Vero Cell on Type I Collagen Gels in Long-term Culture. **In vitro Cellular & Developmental Biology Animal**, v. 33, n. 10, p. 748–750, 1997.

MARTIN, M. T.; VULIN, A.; HENDRY, J. H. Human epidermal stem cells: Role in adverse skin reactions and carcinogenesis from radiation. **Mutation Research**, v. 770, p. 349–368, 2016.

MCTI. **Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI. Portaria Nº 491, de 3 de julho de 2012**. Diário Oficial da União de 05/07/2012 (nº 129, Seção 1, pág. 19), , 2012.

MEJOS, K. K. et al. Effects of parental folate deficiency on the folate content , global DNA methylation , and expressions of FR α , IGF-2 and IGF-1R in the postnatal rat liver. **Nutrition Research and Practice**, v. 7, n. 4, p. 281–286, 2013.

MENON, G. K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. S3–S17, 2002.

MORGAN, H. D. et al. Activation-induced Cytidine Deaminase Deaminates 5-Methylcytosine in DNA and Is Expressed in Pluripotent Tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 50, p. 52353–52360, 2004.

MUELLER, M. M.; FUSENIG, N. E. Friends or foes - Bipolar effects of the tumour stroma in cancer. **Nature Publishing Group**, v. 4, n. November, 2004.

MUJAJ, S. et al. Serum-Free Primary Human Fibroblast and Keratinocyte Coculture. **Tissue Engineering Part A**, v. 16, n. 4, p. 1407–1420, 2010.

MUN, G. C. et al. Further development of the EpiDerm™ 3D reconstructed human skin micronucleus (RSMN) assay. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 673, n. 2, p. 92–99, 2009.

NETZLAFF, F. et al. The human epidermis models EpiSkin®, SkinEthic® and EpiDerm®: An evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 60, n. 2, p. 167–178, 2005.

NG, W.; IKEDA, S. Standardized, defined serum-free culture of a human skin equivalent on fibroblast-populated collagen scaffold. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 91, n. 4, p. 387–391, 2011.

OECD. **Notes od guidance for testing of cosmetic ingredients for their safety evaluation**. Paris, Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico, 2000. Disponível em: <http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/sccp/documents/out130_en.pdf>. Acesso em: 18 jan. 2017

OECD. **Guidelines for the Testing of Chemicals**. Paris, Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico, 2015. Disponível em: <<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforhetestingofchemicals.htm>>. Acesso em: 17 jan. 2017

OECD TG 439. **Guidelines for the testing of chemicals - In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method TG 439**. Paris, Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico, 2015.

OECD TG 487. **Guideline for the testing of chemicals - In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test TG 487**. Paris, Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico, 2016. Disponível em: <<http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9716421e.pdf?expires=1475265996&id=id&accname=guest&checksum=BBA225FB23B00D31799E88A28BA811E0>>

OECD TG 489. **Guideline for the testing of chemicals - In vivo mammalian alkaline comet assay TG 489**. Paris, Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico, 2014.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. DE A.; BATISTUZZO, J. A. DE O. **Fundamentos de toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

OH, J. W. et al. Organotypic skin culture. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 11, p. 1–4, 2013.

OLIVEIRA, J. C. DE. Epigenética e doenças humanas. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 33, n. 1, p. 21–34, 2012.

OLIVEIRA, N. F. P. DE et al. Metilação de DNA e Câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 56, n. 4, p. 493–499, 2010.

PADRÓN, J. M. et al. The multilayered postconfluent cell culture as a model for drug screening. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 36, p. 141–157, 2000.

PAN, D. et al. Methylation of promoter of RBL1 enhances the radioresistance of three dimensional cultured carcinoma cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 3, p. 4422–4435, 2017.

PASONEN-SEPPÄNEN, S. et al. Vitamin C enhances differentiation of a continuous keratinocyte cell line (REK) into epidermis with normal stratum corneum ultrastructure and functional permeability barrier. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 116, n. 4, p. 287–297, 2001.

PEDROSA, T. DO N. **Desenvolvimento de epiderme humana reconstruída (RHE) como plataforma de testes in vitro para irritação, sensibilização, dermatite atópica e fotoimunização**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2016.

PENNACCHI, P. C.; ARAU, M. C. DE; FAGUNDES, M. 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, 2015.

- PFUHLER, S. et al. A tiered approach to the use of alternatives to animal testing for the safety assessment of cosmetics : Genotoxicity . A COLIPA analysis. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 57, n. 2–3, p. 315–324, 2010.
- POGRIBNY, I.; YI, P.; JAMES, S. J. A Sensitive New Method for Rapid Detection of Abnormal Methylation Patterns in Global DNA and within CpG Islands. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 262, p. 624–628, 1999.
- 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.
- PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M.; JENSEN, J. The skin : an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v. 17, p. 1063–1072, 2008.
- REIJNDERS, C. M. A. et al. Development of a Full-Thickness Human Skin Equivalent In Vitro Model Derived from. **Tissue Engineering: Part A**, v. 21, n. 17 e 18, p. 2448–2460, 2015.
- REISINGER, K. et al. Validation of the 3D Skin Comet assay using full thickness skin models: Transferability and reproducibility. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 827, n. July 2017, p. 27–41, 2018.
- REUS, A. A. et al. Comet assay in reconstructed 3D human epidermal skin models- investigation of intra- And inter-laboratory reproducibility with coded chemicals. **Mutagenesis**, v. 28, n. 6, p. 709–720, 2013.
- RIVERA, E. A. B. Ética na experimentação animal. **Revista de Patologia Tropical**, v. 30, n. 1, p. 9–14, 2001.
- ROGUETE, R. et al. Use of a standardized reconstructed epidermis kit to assess in vitro the tolerance and the efficacy of cosmetics. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 22, p. 409–419, 2000.
- ROMANOWSKI, P.; SCHUELLER, R. Fundamentals of cosmetic product safety testing : A discussion of commonly employed test methods. **Cosmetics and toiletries**, v. 111, n. 10, p. 79–86, 1996.
- RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The Principles of Humane Experimental Technique**. Special Ed ed. Potters Bar, England: Universities Federation for Animal Welfare, 1959.
- SAKOLISH, C. M. et al. Modeling Barrier Tissues In Vitro: Methods, Achievements, and Challenges. **EBioMedicine**, v. 5, p. 30–39, 2016.

SCCS, S. C. ON C. S. **9th revision of the Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation.** Disponível em:

<http://ec.europa.eu/health/sites/health/files/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_190.pdf>. Acesso em: 17 jan. 2017.

SEO, M.-D. et al. HaCaT Keratinocytes and Primary Epidermal Keratinocytes Have Different Transcriptional Profiles of Cornified Envelope-Associated Genes to T Helper Cell Cytokines. **Biomolecules & therapeutics**, v. 20, n. 2, p. 171–6, 2012.

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

SINGH, N. P. et al. Technique for Quantitation Damage in Individual of Low Levels of DNA Cells '. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184–191, 1988.

SOUBRY, A. et al. Paternal obesity is associated with IGF2 hypomethylation in newborns : results from a Newborn Epigenetics Study (NEST) cohort. **BMC Medicine**, v. 11, n. 1, p. 29, 2013.

SOUBRY, A. et al. Newborns of obese parents have altered DNA methylation patterns at imprinted genes. **International Journal of Obesity**, v. 39, n. 4, p. 650–657, 2015.

STEFANSKA, B.; VINKEN, M.; SZYF, M. Epigenetics in Toxicology : The Implications of Epigenetic Alterations Driven by External Exposures for Human Health. **ALTEX Proceedings**, p. 173–185, 2012.

STEINERT, P. M.; MAREKOV, L. N. The proteins elafin, filaggrin, filamentos intermediários de queratina, loricrina e pequenas prolinas ricas em proteínas 1 e 2 são isopeptídeos componentes reticulados do envelope celular cornificado da epiderme. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 30, p. 17702–17711, 1995.

SZYF, M. The Dynamic Epigenome and its Implications in Toxicology. **Toxicological Sciences**, v. 100, n. 1, p. 7–23, 2007.

TAKAGI, R. et al. Preparation of keratinocyte culture medium for the clinical applications of regenerative medicine. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 5, p. 1063–73, 2011.

TICE, R. R. et al. Single Cell Gel / Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 221, n. 35, p. 206–221, 2000.

TOWNSEND, T. A. et al. The Development and Validation of EpiComet-Chip, a Modified High-Throughput Comet Assay for the Assessment of DNA Methylation Status. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 58, p. 508–521, 2017.

TRYNDYAK, V.; KOVALCHUK, O.; POGRIBNY, I. P. Identification of differentially methylated sites within unmethylated DNA domains in normal and cancer cells. **Analytical Biochemistry**, v. 356, p. 202–207, 2006.

VAN DER VALK, J. Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. **Altex**, p. 1–20, 2017.

VASQUEZ, M. Z. Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis Recommendations for safety testing with the in vivo comet assay. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 747, n. 1, p. 142–156, 2012.

VINARDELL, M. P.; MITJANS, M. Alternative Methods for Eye and Skin Irritation Tests: An Overview. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 1, 2008.

WENTZEL, J. F. et al. Assessing the DNA methylation status of single cells with the comet assay. **Analytical Biochemistry**, v. 400, n. 2, p. 190–194, 2010.

WEVER, B. DE et al. “Open Source”-Based Engineered Human Tissue Models: A New Gold Standard for Nonanimal Testing Through. **Applied in vitro toxicology**, v. 1, n. 1, p. 5–9, 2015.

WICKETT, R. R.; VISSCHER, M. O. Structure and function of the epidermal barrier. **Am J Infect Control**, v. 34, n. 10, p. 98–110, 2006.

WITTE, R. P.; JOHN, W. Keratinocyte-fibroblast paracrine interaction : the effects of substrate and culture condition. **Biomaterials**, v. 26, p. 3673–3682, 2005.

WOJEWÓDZKA, M.; BURACZEWSKA, I.; KRUSZEWSKI, M. A modified neutral comet assay : elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-single-stranded DNA antibody. **Mutation Research**, v. 518, p. 9–20, 2002.

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

WOODLEY, D. T.; WYNN, K. C.; KEEFE, E. J. O. Type IV Collagen and Fibronectin Enhance Human Keratinocyte Thymidine Incorporation and Spreading in the Absence of Soluble Growth Factors. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 94, n. 1, p. 139–143, 1990.