

PELE ARTIFICIAL COMO ALTERNATIVA PARA EXPERIMENTAÇÃO EM ANIMAIS

Silvy Stuchi MARIA-ENGLER¹, Carla Abdo BROHEM¹, Laura Beatriz Silva CARDEAL¹, Manoela Tiago dos SANTOS¹ e Silvia Berlanga de Moraes BARROS¹

A pele é o maior órgão do corpo humano e o mais susceptível a lesões, especialmente queimaduras promovidas por diversos agentes, como a radiação solar. A associação entre exposição crônica à radiação solar e desenvolvimento de câncer de pele é fato incontestável (QUINN, 1997; ARMSTRONG; KRICKER, 2001). Além disso, o número de vítimas de queimaduras causadas por fogo por ano é bastante expressivo com alta incidência de mortalidade (FRACASSO et al., 2009). A pele constitui uma importante barreira contra infecções, porém, uma vez lesada, torna outros tecidos expostos e mais vulneráveis a outras doenças (PONEC, 2002).

Buscando a proteção, resistência e rejuvenescimento da pele, as indústrias farmacêuticas e cosméticas investem na busca de novos compostos que eficientemente protejam a pele de lesões promovidas pelas radiações solares, prevenindo contra o fotoenvelhecimento e o câncer de pele (FARRIS, 2005; D'SOUZA; EVANS, 2007; SHIM et al., 2008; DOU, 2009; NDEJOUONG BLE et al., 2009; GOLDMAN; GOLD, 2010; KOWALCZYK et al., 2010; MORINAGA et al., 2010). A produção de medicamentos e cosméticos eficazes e seguros requer metodologia que possibilite, nas diferentes etapas do desenvolvimento, avaliar a toxicidade e a eficácia de novos princípios ativos e formulações para garantir a proteção aos usuários.

Até bem pouco tempo, apenas métodos *in vivo* empregando animais de laboratório eram utilizados para este fim. Atualmente, as indústrias farmacêuticas e cosméticas são forçadas a atingir objetivos sociopolíticos e humanitários de reduzir o número de animais utilizados na pesquisa, enquanto que, simultaneamente, necessita diminuir custos e gerar, de forma relevante, dados reprodutíveis espécie-específicos, eliminando a experimentação animal e atendendo definitivamente o conceito “3R”

¹ Laboratório de Patologia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo - Av. Lineu Prestes, 580 Bloco 17 CEP 05508-900, São Paulo, SP

(reduzir, reutilizar, reciclar). Os avanços da ciência possibilitaram o desenvolvimento de métodos *in vitro* que, ao mimetizarem sistemas biológicos complexos, possibilitam atingir a meta de redução de uso de animais (ESKES et al., 2007; SPIELMANN et al., 2007). Além de sistemas compostos por células isoladas, o sistema biomimético, apresentado neste projeto, permite recriar em laboratório peles com as características morfofuncionais da pele humana, com resultados reprodutíveis e que se aproximam daqueles que seriam realizados em animais. Além da vantagem de minimizar o uso de animais, a semelhança com a pele humana aproxima os resultados da situação real de exposição que nem sempre é a obtida com o uso de animais (EL GHALBZOURI et al., 2008; GRINDON et al., 2008; SCHÄFER-KORTING et al., 2008 a; SCHÄFER-KORTING et al., 2008 b; KANDÁROVÁ et al., 2009).

No mercado brasileiro inexistem empresas de biotecnologia que produzam peles artificiais humanas na forma de kits. Além disso, o país carece também de empresas que prestem serviços de avaliação toxicológica em sistemas biológicos, sejam eles baseados em cultura de células isoladas ou que recriem a arquitetura tecidual.

No mercado mundial existem possibilidades de aquisição destes kits de pele humana, embora não disponibilizado no mercado brasileiro, o que força às indústrias nacionais a desenvolverem uma organização logística de envio de amostras ao exterior, refletindo diretamente em alto custo e limitação de análise de compostos.

Neste contexto, o modelo de pele artificial humana elaborado e já produzido em nosso laboratório oferece ao Brasil uma alternativa aos produtos do exterior, de elevado custo e de grande dificuldade de aquisição, devido a serem rapidamente perecíveis. O desenvolvimento de novos insumos pela indústria farmacêutica e cosmética no Brasil passa, obrigatoriamente, pela possibilidade de realização de testes no país, visando não apenas agilizar etapas, mas também garantir nossa soberania neste campo. Entendemos que nosso produto atenderá o mercado interno e dinamizará dramaticamente a avaliação de novos compostos/ fármacos/ moléculas a serem selecionadas para composição de novos medicamentos ou cosméticos.

A demanda desta tecnologia já é reconhecida nas diferentes áreas das indústrias farmacêuticas e cosméticas. Este setor necessita de adaptação às diretivas europeias

que definiram que a partir de 2009 nenhum produto cosmético poderá ser avaliado quanto à segurança e eficácia em animais de laboratório (DE SILVA; EFCI, 2002). Para substituição dos animais, alternativamente, todos os testes deverão ser realizados em modelos *in vitro*, com células isoladas ou preferencialmente em modelos biomiméticos, entre eles o que simule a pele humana, garantindo a saúde da população.

Na indústria farmacêutica, o uso de sistemas biomiméticos de pele contribuirá para a triagem de fármacos potenciais para tratamento de diferentes doenças da pele, entre elas a avaliação de eficácia de quimioterápicos para o tratamento tópico de carcinomas de pele do tipo não-melanoma e melanoma, citando apenas duas. O potencial de descoberta de novos fármacos potencialmente antineoplásicos ou aplicáveis a outras patologias da pele a partir das pesquisas de plantas da flora brasileira é sem dúvida um vasto campo de aplicação desta tecnologia.

Reiterando, o Brasil não tem até o momento nenhuma empresa dedicada à produção padronizada do sistema proposto neste plano, além da total impossibilidade de aquisição de sistemas importados do mercado internacional, em grande parte devido às dificuldades alfandegárias. Este tema tem sido recorrente em encontros técnico-científicos em nosso país, reforçando a necessidade do desenvolvimento de tecnologia brasileira. Não é de nosso conhecimento que existam no Brasil grupos que desenvolvam sistemas semelhantes de pele artificial com componentes celulares humanos, com a proposta de kit para avaliação de toxicidade e eficácia de insumos farmacêuticos e cosméticos.

A proposta de produzir kits de pele artificial possibilita a exploração de uma variedade de testes, incluindo avaliação de novos fármacos ou ativos biológicos, testes de irritação e inflamação cutânea, morte ou proliferação celular. Assim, podemos dizer que se aplica à avaliação de segurança e eficácia de substâncias empregadas como fármacos e produtos de uso cosmético (de SILVA; EFCI, 2002; EI GHALBZOURI et al., 2008; GRINDON et al., 2008; HORNING et al., 2008; SCHÄFER-KORTING et al., 2008 a; SCHÄFER-KORTING et al., 2008 b; KANDÁROVÁ et al., 2009).

A tecnologia consiste em reproduzir em laboratório (*in vitro*) o tecido da pele, constituído por queratinócitos derivados da epiderme humana que se estratificam

formando as múltiplas camadas da epiderme (BALASUBRAMANIAM et al., 2001; AJANI et al., 2007; GODIN; TOUITOU, 2007). Os melanócitos humanos, que são as células que produzem a pigmentação da pele, são cultivados em meio ao queratinócitos na proporção equivalente ao observado no tecido humano (*in vivo*) e se depositam na camada basal, que é a que suporta a estrutura do epitélio e delimita as camadas da epiderme e derme (BOYCE; WARDEN, 2002).

Desta forma, temos, *in vitro*, todos os estratos da pele: camada córnea, granular, espinhosa e basal, suportada pela estrutura dérmica. A derme é reconstituída por fibroblastos humanos cultivados em gel de colágeno tipo I (WONG et al., 2007). Estas estruturas exibem características de crescimento e morfologia muito similares à pele humana e assim aumenta a uniformidade e reprodutibilidade dos testes. A presença dos melanócitos, células produtoras de melanina, restaura a pigmentação da pele artificial, contemplando também modelos que requeiram biomimetizar tonalidades de pele, como a pele pigmentada de indivíduos afro-descendentes, cuja indústria cosmética e farmacêutica dedica segmentos de desenvolvimento de produtos especiais. Em suma, o modelo mimetiza a pele humana em toda a sua estrutura, ao reconstruir a pele em todas as camadas (derme e epiderme) (Figura 1 e glossário de termos técnicos).

A geração desta tecnologia agregaria valores como: possibilitar a triagem em larga escala da eficácia de moléculas candidatas a tratamento de doenças de pele; avaliar *in vitro*, sem o uso de animais de laboratório, a segurança de formulação de uso tópico, quer sejam de uso farmacêutico, quer cosméticos. A tecnologia permite a independência e a dinamização da avaliação preliminar no país de produtos de uso tópico com atividade medicinal ou cosmética.

Os modelos comercializados nos Estados Unidos e Europa utilizam células que são conhecidas como linhagens estabelecidas e que não apresentam o poder de estratificar-se semelhantemente a pele *in vivo* (BOELSMA et al., 1998; SCHOOP et al., 1999; PONEC, 2002). O diferencial de nosso modelo é o de empregar somente células humanas provenientes de culturas primárias, com poder total de reorganização da epiderme *in vitro*, tornando com isto o produto inovador. Ainda, os kits poderão ser

produzidos sob encomenda, dirigindo assim a finalidade do cliente. Exemplificando, se for necessário avaliar quimioterápicos anti-melanoma, é possível produzir a pele com o melanoma no processo de invasão tumoral. Se o objetivo for avaliar efeitos de novas moléculas/fármacos, destinados à pele de indivíduos afro-descendentes, poderemos incorporar à estrutura da pele artificial, os melanócitos originários destes doadores, gerando assim, a pele artificial pigmentada. Finalmente, como já enfatizado anteriormente, os kits comerciais vendidos no mercado internacional não são comercializados no Brasil, além de não apresentarem a possibilidade de adaptação às necessidades dos clientes.

A longo prazo, outras aplicações poderão ser possíveis, como exemplo em cirurgias reparativas para pacientes queimados ou cirurgias estéticas com produção de “*peles customizadas*”, geradas com grau de pigmentação semelhante ao do paciente. Recentemente esta finalidade foi aprovada pelo FDA-USA, e é considerada tendência de aplicação em outros países que dispuserem de tal tecnologia (CHHATRE et al., 2007).

Ainda entendemos que outros desdobramentos de aplicação podem ser feitos a partir da mesma base tecnológica, como se segue nos itens:

1. Pele customizada para cirurgias reparativas em pacientes queimados ou submetidos à cirurgia estética;
2. Testes de citotoxicidade em culturas de monocamada, quer da epiderme, quer da derme, utilizadas para avaliação de compostos, novos fármacos, ativos biológicos, substâncias químicas;
3. Testes de novos fármacos que atuem na prevenção de invasão de melanoma, uma vez que é possível utilizar a plataforma de pele artificial, cultivando agora os melanócitos oncogenicamente transformados e simular o processo de invasão.
4. Testes para moléculas aplicadas ao tratamento de outras patologias e doenças da pele.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA:

AJANI, G.; SATO, N.; MACK, J.A.; MAYTIN, E.V. Cellular responses to disruption of the permeability barrier in a three-dimensional organotypic epidermal model. **Exp Cell Res.** v. 313, n.14, p. 3005-15, 2007.

ARMSTRONG, B.K.; KRICKER, A. The epidemiology of UV induced skin cancer. **J Photochem Photobiol B.** v. 63, n.1-3, p.8-18, 2001.

BALASUBRAMANI, M.; KUMAR, T.R.; BABU, M. Skin substitutes: a review. **Burns.** v. 27, n. 5, p.534-44, 2001.

BOELSMA, E.; VERHOEVEN, M.C., PONEC, M. Reconstruction of a human skin equivalent using a spontaneously transformed keratinocyte cell line (HaCaT). **J Invest Dermatol.** v. 112,n. 4, p. 489-98, 1999.

BOYCE, S.T.; WARDEN, G.D. Principles and practices for treatment of cutaneous wounds with cultured skin substitutes. **Am J Surg.** v. 183, n. 4, p. 445-56, 2002.

CHHATRE, S.; FRANCIS, R.; O'DONOVAN, K.; TITCHENER-HOOKER, N.J.; NEWCOMBE, A.R.; KESHAVARZ-MOORE, E. A decision-support model for evaluating changes in biopharmaceutical manufacturing processes. **Bioprocess Biosyst Eng.** v. 30, n. 1, p. 1-11, 2007.

COOPER, M.L.; HANSBROUGH, J.F.; SPIELVOGEL, R.L. et al. In vivo optimization of a living dermal substitute employing cultured human fibroblasts on a biodegradable polyglycolic acid or polyglactin mesh. **Biomaterials,** v. 12, p. 243-248, 1991.

DE SILVA O. European Federation of the Cosmetics Industry. Steering Committee on Alternatives to Animal Testing. The contributions of the European cosmetics industry to the development of alternatives to animal testing: dialogue with ECVAM and future challenges. **Altern Lab Anim.** v. 30, Suppl 2, p. 189-93, 2002.

DOU, Q.P. Molecular mechanisms of green tea polyphenols. **Nutr Cancer,** v. 61, n. 6, p. 827-35, 2009.

D'SOUZA, G.; EVANS, G.R. Plastic Surgery Educational Foundation Technology Assessment Committee. Mexoryl: a review of an ultraviolet a filter. **Plast Reconstr Surg.** v. 120, n. 4, p. 1071-5, 2007.

EL GHALBZOURI A, SIAMARI R, WILLEMZE R, PONEC M. Leiden reconstructed human epidermal model as a tool for the evaluation of the skin corrosion and irritation potential according to the ECVAM guidelines. **Toxicol In Vitro**. v. 22, n. 5, p. 1311-20, 2008.

ESKES, C.; COLRE, T.; HOFFMANN, S. et al. The ECVAM international validation study on in vitro tests for acute skin irritation: selection of test chemicals. **Altern Lab Anim**. v. 35, n.6, p. 603-19, 2007.

FARRIS, P.K. Topical vitamin C: a useful agent for treating photoaging and other dermatologic conditions. **Dermatol Surg**. v. 31, n. 7, Pt 2, p.814-7, 2005.

FRACASSO, T.; PFEIFFER, H.; PELLERIN, P. KARGER, B. The morphology of cutaneous burn injuries and the type of heat application. **Forensic Sci Int**. v. 187, n.1-3, p. 81-6, 2009.

GODIN, B.; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. **Adv Drug Deliv Rev**. v. 59, n. 11, p. 1152-6, 2007.

GOLDMAN, M.P.; GOLD, M.H. A controlled multi-center study evaluating the efficacy of Vivité skin care in the treatment of photoaging of the face, eye and mouth. **J Drugs Dermatol**. v. 9, n. 1, p. :22-6, 2010.

GRINDON, C.; COMBES, R.; CRONIN, M.T. et al. An integrated decision-tree testing strategy for skin sensitisation with respect to the requirements of the EU REACH legislation. **Altern Lab Anim**. v. 36, Suppl 1, p.75-89, 2008.

HORNING, J.L.; SAHOO S.K.; VIJAYARAGHAVALU, S. et al. 3-D tumor model for in vitro evaluation of anticancer drugs. **Mol Pharm**. v. 5, n. 5, p. 849-62, 2008.

KANDÁROVÁ, H.; HAYDEN, P.; KLAUSNER, M. et al. In vitro skin irritation testing: Improving the sensitivity of the EpiDerm skin irritation test protocol. **Altern Lab Anim**. v. 37, n. 6, p. 671-89, 2009.

KOWALCZYK, M.C.; KOWALCZYK, P.; TOLSTYKH, O. et al. Synergistic effects of combined phytochemicals and skin cancer prevention in SENCAR mice. **Cancer Prev Res**, Phila Pa, v. 3, n. 2, p. 170-8, 2010.

MORINAGA, N.; YAHIRO, K.; NODA, M. Resveratrol, a natural polyphenolic compound, inhibits cholera toxin-induced cyclic AMP accumulation in Vero cells. **Toxicon**. v. 56, n. 1, p. 29-35, 2010.

NDEJOUONG, B.L.E.S.; SATTTLER, I.; DAHSE, H.M. et al. Isoflavones with unusually modified B-rings and their evaluation as antiproliferative agents. **Bioorg Med Chem Lett**. v. 19, n. 22, p. 6473-6, 2009.

PONEC, M. Skin constructs for replacement of skin tissues for in vitro testing. **Adv Drug Deliv Rev**. v. 54, Suppl 1, p. S19-30, 2002.

QUINN, A.G. Ultraviolet radiation and skin carcinogenesis. **Br J Hosp Med**. v. 58, n. 6, p. 261-4, 1997.

SCHÄFER-KORTING, M.; BOCK, U.; DIEMBECK, W. et al. The use of reconstructed human epidermis for skin absorption testing: Results of the validation study. **Altern Lab Anim**. v. 36, n. 2, p. 161-87, 2008.

SCHÄFER-KORTING, M.; MAHMOUD, A.; LOMBARDI, B.S. et al. Reconstructed epidermis and full-thickness skin for absorption testing: influence of the vehicles used on steroid permeation. **Altern Lab Anim**. v. 36, n. 4, p. 441-52, 2008.

SCHOOP, V.M.; MIRANCEA, N.; FUSENIG, N.E. Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. **J Invest Dermatol**. v. 112, n. 3, p. 343-53, 1999.

SHIM, J.S.; KWON, Y.Y.; HAN, Y.S.; HWANG, J.K. Inhibitory effect of panduratin A on UV-induced activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in dermal fibroblast cells. **Planta Med**. v. 74, n. 12, p.1446-50, 2008.

SPIELMANN, H.; HOFFMANN, S.; LIEBSCH, M. et al. The ECVAM international validation study on in vitro tests for acute skin irritation: report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the Skin Integrity Function Test. **Altern Lab Anim**. v. 35, n. 6, p. 559-601, 2007.

WONG, T.; MCGRATH, J.A.; NAVSARIA, H. The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. **Br J Dermatol**. v. 156, n. 6, p.1149-55, 2007.