

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta Tese será disponibilizado somente a partir de 02/02/2025.

unesp  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**DESENVOLVIMENTO DE EQUIVALENTES DE PELE 3D PARA APLICAÇÃO
EM ENSAIOS DE TERAPIA FOTODINAMICA DE BIOESTIMULAÇÃO
USANDO NANOCÁPSULAS DE CURCUMINA**

Camila Fernanda Amantino

Orientador: Prof. Dr. Fernando Lucas Primo

Araraquara- SP

2023

unesp  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**EQUIVALENTES DE PELE 3D PARA APLICAÇÃO EM ENSAIOS DE
FOTOBIOESTIMULAÇÃO USANDO NANOCÁPSULAS DE CURCUMINA E
PROCESSOS FOTODINÂMICOS**

Camila Fernanda Amantino

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Doutora em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Fernando Lucas Primo

Araraquara- SP

2023

A484d Amantino, Camila Fernanda.
Desenvolvimento de equivalentes de pele 3D para aplicação em ensaios de terapia fotodinâmica de bioestimulação usando nanocápsulas de Curcumina / Camila Fernanda Amantino. – Araraquara, 2022.
80 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Fernando Lucas Primo.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Bioestimulação. 3. Engenharia de tecidos. 4. Equivalentes de pele. 5. Nanotecnologia. 6. Nanocápsulas. 7. Curcumina.

I. Primo, Fernando Lucas, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas

UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030078P6

Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Desenvolvimento de equivalentes de pele 3D para aplicação em ensaios de terapia fotodinâmica de bioestimulação usando nanocápsulas de curcumina

AUTORA: CAMILA FERNANDA AMANTINO

ORIENTADOR: FERNANDO LUCAS PRIMO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciências, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FERNANDO LUCAS PRIMO (Participação Presencial)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. MARIGILSON PONTES DE SIQUEIRA MOURA (Participação Virtual)
Colegiado Acadêmico de Ciências Farmacêuticas / Universidade Federal do Vale do São Francisco (Univasf)

Profa. Dra. SONIA MARIA OLIANI (Participação Virtual)
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas do Campus de São José do Rio Preto da Unesp

Profa. Dra. ANDREZA RIBEIRO SIMIONI (Participação Virtual)
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - IP&D / Universidade do Vale do Paraíba - Univap

Profa. Dra. LEILA APARECIDA CHIAVACCI FAVORIN (Participação Presencial)
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 02 de fevereiro de 2023

Sumário

1. INTRODUÇÃO	78
2. REVISÃO DA LITERATURA	81
2.1. A PELE	81
2.2. CICATRIZAÇÃO	83
2.3. ENGENHARIA DE TECIDOS DE PELE	87
2.4. EQUIVALENTES DE PELE TRIDIMENSIONAIS	87
2.5. TERAPIA FOTODINÂMICA DE BIOESTIMULAÇÃO	89
2.6. FOTOSSENSIBILIZADORES.....	91
2.7. NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA.....	92
3. OBJETIVOS	94
3.1. OBJETIVOS GERAIS	94
3.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	94
4. METODOLOGIA	Erro! Indicador não definido.
4.1. SÍNTESE DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICA COM CURCUMINA... Erro! Indicador não definido.	
4.2. ESTABILIDADE ACELERADA	Erro! Indicador não definido.
4.3. ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA) Erro! Indicador não definido.	
4.4. ESPECTROS DE ABSORÇÃO E EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA NO UV/VIS	Erro! Indicador não definido.
4.5. CURVA ESPECTRO-ANALÍTICA: LINEARIDADE DA CURCUMINA Erro! Indicador não definido.	
4.6. QUANTIFICAÇÃO DE CURCUMINA EM NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS Erro! Indicador não definido.	
4.7. DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DA CURCUMINA EM NC	Erro! Indicador não definido.
4.8. ENSAIO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> USANDO MEBRANA DE DIÁLISE Erro! Indicador não definido.	
4.9. PROTOCOLO DE CULTIVO CELULAR	Erro! Indicador não definido.
4.10. CAPTAÇÃO CELULAR (<i>UPTAKE</i> CELULAR) Erro! Indicador não definido.	
4.11. CITOTOXIDADE EM MONOCAMADA: MÉTODO DA RESAZURINA Erro! Indicador não definido.	
4.12. FOTOBIOESTIMULAÇÃO EM MONOCAMADA MONITORAMENTO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR USANDO METODO COLORIMETRICO COM RESAZURINA APÓS IRRADIAÇÃO	Erro! Indicador não definido.

4.13. FOTOBIOESTIMULAÇÃO EM MONOCAMADA. MONITORAMENTO E AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR APÓS INDUÇÃO DE LESÃO CICATRICIAL <i>IN VITRO</i>	Erro! Indicador não definido.
4.14. PREPARO DOS EQUIVALENTES DÉRMICOS (ED)	Erro! Indicador não definido.
4.15. PREPARO DOS EQUIVALENTES DE PELE TRIDIMENSIONAIS (EPT) <i>IN VITRO</i>	Erro! Indicador não definido.
4.16. IMUNO-HISTOQUÍMICA	Erro! Indicador não definido.
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	Erro! Indicador não definido.
5.1. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS: DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA....	Erro! Indicador não definido.
5.2. ESTABILIDADE ACELERADA	Erro! Indicador não definido.
5.3. ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA)	Erro! Indicador não definido.
5.4. ESPECTROS DE ABSORÇÃO E EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA NO UV/VIS	Erro! Indicador não definido.
5.5. CURVA ANALÍTICA: LINEARIDADE DA CURCUMINA.	Erro! Indicador não definido.
5.6. DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DA CURCUMINA EM NC	Erro! Indicador não definido.
5.7. ENSAIO DE LIBERAÇÃO <i>In VITRO</i> USANDO MEBRANA DE DIALISE	Erro! Indicador não definido.
5.8. PROTOCOLO DE CULTIVO CELULAR	Erro! Indicador não definido.
5.9. ESTUDOS DE CITOTOXIDADE EM MONOCAMADA: MÉTODO DA RESAZURINA.....	Erro! Indicador não definido.
5.10. ESTUDO DE TERAPIA FOTODINAMICA DE BIOESTIMULAÇÃO EM MONOCAMADA: MONITORAMENTO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR USANDO METODO COLORIMETRICO DE RESAZURINA APÓS IRRADIAÇÃO	Erro! Indicador não definido.
5.11. PREPARO DOS EQUIVALENTE DÉRMICOS (ED).....	Erro! Indicador não definido.
5.12. PREPARO DOS EQUIVALENTES DE PELE TRIDIMENSIONAIS (EPT) <i>IN VITRO</i>	Erro! Indicador não definido.
5.13. IMUNO-HISTOQUÍMICA	Erro! Indicador não definido.
6. CONCLUSÕES	95
REFERÊNCIAS	96

Resumo

A preocupação ética e científica sobre ensaios utilizando animais, os quais apresentam apenas 20% do potencial terapêutico reproduzidos em ensaios clínicos, faz com que a busca por alternativas seja cada vez maior. Desta forma, a Engenharia de Tecidos se apresenta como alternativa promissora para tratamento de diversas doenças, por meio do desenvolvimento de modelos tridimensionais para utilização em teste *in vitro* substituindo modelos animais *in vivo* e na elaboração de reparos ou substituições de tecidos específicos. Neste estudo foram produzidos equivalentes de pele 3D (EPT) para utilização como modelo em ensaios *in vitro* de fotobioestimulação utilizando nanocápsulas com curcumina. A terapia fotodinâmica de bioestimulação utiliza dos processos fotodinâmicos para gerar pequenas quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO), que podem resultar na diferenciação celular, modulação de processos inflamatórios e contribuição na regeneração e proliferação celular. As nanocápsulas (NC) apresentaram tamanho de partícula < 200nm, potencial Zeta >|30|, e índice de polidispersividade entre 0,5 e 0,3. A microscopia de força atômica também apresentou tamanho de partícula < 200 nm, morfologia esférica e superfície uniforme predominantemente lisa. O ensaio de biocompatibilidade das NC mostrou ausência citotoxicidade para as concentrações testadas (2,5 - 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). O ensaio de liberação *in vitro* mostrou uma liberação lenta e sustentada o que é característico das NC, os ensaios de captação celular mostraram um aumento significativo da internalização celular da curcumina quando em nanoestrutura. Estudos de fotobioestimulação em monocamada, mostraram um aumento da viabilidade celular da linhagem fibroblastos dérmicos neonatal de humanos (HDFn) (viabilidade > 134%) para todas as fluências de LED empregadas a $\lambda = 450 \text{ nm}$ (150, 300 e 450 $\text{mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$). O ensaio de monitoramento da lesão cicatricial *in vitro* apresentou efeitos mais efetivos de proliferação celular com a fluência de 300 $\text{mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$. A marcação do EPT com e hematoxilina e eosina, mostrou a presença de células com morfologias distintas, o que comprova a presença dos fibroblastos e queratinócitos nos EPT. A imuno-histoquímica utilizando KI-67 mostrou a presença de células em proliferação nos EPT após a irradiação com LED $\lambda = 450 \text{ nm}$ (150, 300 e 450 $\text{mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$).

Palavras-chave: terapia fotodinâmica, bioestimulação, engenharia de tecidos, equivalentes de pele, nanotecnologia, nanocápsulas, curcumina.

Abstract

The ethical and scientific concern about tests using animals, which have only 20% of the therapeutic potential reproduced in clinical trials, makes the search for alternatives even greater. In this way, Tissue Engineering presents itself as a promising alternative for the treatment of several diseases, through the development of three-dimensional models for use in *in vitro* tests replacing animal models *in vivo* and in the elaboration of repairs or replacements of specific tissues. In this study, 3D skin equivalents (EPT) were produced to be used as a model in *in vitro* tests of photobiostimulation using nanocapsules with curcumin. Photobiostimulation uses photodynamic processes to generate small amounts of reactive oxygen species (ROS), which can result in cell differentiation, modulation of inflammatory processes and contribution to cell preference and expectation. The nanocapsules (NC) showed particle size $< 200\text{nm}$, Zeta potential $>|30|$, and polydispersity index between 0.5 and 0.3. Atomic force microscopy also showed particle size $< 200\text{ nm}$, spherical morphology and predominantly smooth uniform surface. The NC biocompatibility assay showed no cytotoxicity for the concentrations ($2.5 - 25\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). The *in vitro* release assay showed a slow and sustained release which is characteristic of NC, the cell uptake assays experienced a significant increase in cellular internalization of curcumin when in nanostructure. Monolayer biostimulation photodynamic therapy studies, I experienced an increase in cell viability of the HDFn strain (viability $> 134\%$) for all LED fluences employed at $\lambda = 450\text{ nm}$ ($150, 300$ and $450\ \text{mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$). The *in vitro* wound healing monitoring assay showed more effective effects from cellular perspectives with the influence of $300\ \text{mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$. EPT staining with hematoxylin and eosin showed the presence of cells with distinct morphologies, which proves the presence of fibroblasts and keratinocytes in EPT. Immunohistochemistry using KI-67 showed the presence of waiting cells in EPT after LED irradiation at $\lambda = 450\text{ nm}$ ($150, 300$ and $450\ \text{mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$).

Keywords: biostimulation, photodynamic therapy, tissue engineering, skin equivalents, nanotechnology, nanocapsules, curcumin.

Lista de Figuras

- FIGURA 1-** REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL (3D) DA PELE HUMANA INDICANDO AS PRINCIPAIS CAMADAS DA PELE E DA JUNÇÃO Dermo –EPIDÉRMICA..... 83
- FIGURA 2-** FASES DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS. LINHA DO TEMPO QUE DESCREVE AS FASES SEQUENCIAIS, EMBORA SOBREPOSTAS, DA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS, HEMOSTASIA (VERMELHO), INFLAMAÇÃO (AMARELO), PROLIFERAÇÃO DE QUERATINÓCITO, ANGIOGÊNESE (VERDE) E REMODELAÇÃO DO TECIDO (MARROM)..... 84
- FIGURA 3-** CONTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS HEMATOPOIÉTICAS PARA A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS. AS FASES DA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS SÃO DESCRITAS DE FORMA ILUSTRATIVA ABAIXO. 84
- FIGURA 4 -** FÓRMULA QUÍMICA ESTRUTURAL DA CURCUMINA. 91
- FIGURA 5 -** PRINCIPAIS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS POLIMÉRICOS UTILIZADOS PARA APLICAÇÕES BIOLÓGICAS COMO NANOCARREADORES DE ATIVOS 93
- FIGURA 6 -** PERFIL DA DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DE INTENSIDADE DE LUZ ESPALHADA PARA DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO HIDRODINÂMICO DA AMOSTRA DE NC/VAZIA EM FUNÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA, UTILIZANDO O MÉTODO DE ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ MONITORADO DO DIA 1º AO 97º DIA APÓS O PREPARO..... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 7-** PERFIL DA DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DE INTENSIDADE DE LUZ ESPALHADA PARA DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO HIDRODINÂMICO DA AMOSTRA DE NC/CURC EM FUNÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA, UTILIZANDO O MÉTODO DE ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ DO DIA 1º AO 97º DIA APÓS O PREPARO. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 8 -** PERFIS DE TRANSMISSÃO OBTIDOS COM NC/CURC (A) E AMOSTRAS NC/VAZIA (SEM ATIVO) (B) POR ANÁLISE DE ESTABILIDADE FORÇADA DURANTE CENTRIFUGAÇÃO ANALÍTICA. O PRIMEIRO E O ÚLTIMO PERFIL CADASTRADO SÃO MOSTRADOS EM VERMELHO E VERDE, RESPECTIVAMENTE. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 9 -** FOTOMICROGRAFIAS TRIDIMENSIONAIS E BIDIMENSIONAIS OBTIDAS DAS FORMULAÇÕES NC/CURC POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 10 -** FOTOMICROGRAFIAS TRIDIMENSIONAIS E BIDIMENSIONAIS OBTIDAS DAS FORMULAÇÕES NC/VAZIA POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 11 -** FOTOMICROGRAFIA BIDIMENSIONAL E PERFIL TOPOGRÁFICO DADA PELA ANÁLISE DO SOFTWARE MOSTRANDO MEDIÇÕES DO DIÂMETRO E ALTURA DAS NC/CURC. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 12-** FOTOMICROGRAFIA BIDIMENSIONAL E PERFIL TOPOGRÁFICO DADA PELA ANÁLISE DO SOFTWARE MOSTRANDO MEDIÇÕES DO DIÂMETRO E ALTURA DAS NC/VAZIA. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 13 -** FOTOMICROGRAFIA BIDIMENSIONAL E HISTOGRAMA MOSTRANDO A DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE AMOSTRAS PARA NC/CURC (A) E NC/VAZIA (B) **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 14-** ESPECTROS DE ABSORÇÃO (A) E EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA (B) NO UV/VIS DA CURC/LIVRE (PRETO) E NC/CURC (CINZA) EM ETANOL. ABSORÇÃO MÁXIMA EM 426 NM E 421 NM E EMISSÃO MÁXIMA EM 535 E 533 NM PARA CURC LIVRE E NC/CURC RESPECTIVAMENTE (FENDAS DE RESOLUÇÃO ESPECIAL 5/5 NM; EXCITAÇÃO FIXA EM 415 NM). **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 15-** CURVA DE CORRELAÇÃO ENTRE A ABSORÇÃO MÁXIMA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CURCUMINA NA FAIXA DE 0,2 A 3,5 MG.ML-1. $Y = 0,1553 x - 0,0036$ $R^2 = 0,9999$, $n = 3$ **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 16 -** CURVA DE LIBERAÇÃO IN VITRO DA NC/CURC E CURC LIVRE EM PBS 1X COMO MEIO RECEPTOR À 36,5°C. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 17-** IMAGENS DE MICROSCOPIA EM CAMPO CLARO E CONTRASTE DE FASE DAS LINHAGENS CELULARES UTILIZADAS NESTE ESTUDO E QUE FAZEM PARTE DO BANCO DE CÉLULAS DO LABORATÓRIO DE ENGENHARIA CELULAR E TECIDUAL DO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA..... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

- FIGURA 18** - ESTUDO DE CAPTAÇÃO INTRACELULAR DE CURC LIVRE E NC/CURC NAS LINHAGENS CELULARES NIH-3T3 (A), HdFN (B) E HAcAT (C); NOS TEMPOS DE 3H, 6H E 24H DE INCUBAÇÃO A 5,0 E 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DE ATIVO. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 19**- ESQUEMA DO MECANISMO DE CAPTAÇÃO CELULAR POR PINOCITOSE. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 20** - ESTUDO DE CITOTOXICIDADE COM DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DA NC/CURC EM LINHAGEM NIH/3T3 FIBROBLASTOS DE MURINO USANDO TESTE DE RESAZURINA, ONDE CT= CONTROLE SOMENTE COM DMEM, E NC/VAZIA = 50% EM VOLUME DA FORMULAÇÃO SEM ATIVO. A SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA FOI DETERMINADA PELO TESTE DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA ONE-WAY ANOVA SEGUIDO DO PÓS-TESTE TUKEY T-TEST PARA MÚLTIPLAS COMPARAÇÕES (*P< 0,05). CADA SEM REPRESENTA O DESVIO PADRÃO (\pm SD) PARA N = 3. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

Lista de Tabelas

- TABELA 1** - RESULTADOS DE TAMANHO MÉDIO DE PARTÍCULA, ÍNDICE DE POLIDISPERSIVIDADE (IPD) E POTENCIAL ZETA (ζ) PARA NC/VAZIA. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- TABELA 2** - RESULTADOS DO TAMANHO MÉDIO DE PARTÍCULA, ÍNDICE DE POLIDISPERSIVIDADE (IPD) E POTENCIAL ZETA (ζ) PARA NC/CURC. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- TABELA 3** - ÍNDICE DE INSTABILIDADE DE NC/CURC E NC/VAZIA, MEDIDO APÓS PRODUÇÃO ARMAZENADA A 25°C. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

Lista de abreviaturas

ET	Engenharia de Tecidos
EPT	Equivalente de pele tridimensional
TFD	Terapia Fotodinâmica
TFDB	Terapia Fotodinâmica de Bioestimulação
FS	Fotossensibilizador
LASER	Do inglês "Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation"
LED	Do inglês "Light Emitter Diode"
ERO	Espécies reativas de Oxigênio
TFB	Terapia Fotobioestimulação
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
PDGF	Fator derivado das plaquetas
TGF- β	Fator de crescimento de transformação beta
ED	Equivalentes dérmicos
GAGs	Glicosaminoglicanos
MEC	Matriz extracelular
PFD	Processos Fotodinâmicos
NF	Nanotecnologia farmacêutica
NC	Nanocápsulas
NC/Curc	Nanocápsulas com curcumina
PLGA	Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)
IPd	Índice de polidispersividade
ζ	Potencial Zeta
NC/Vazia	Nanocápsulas sem curcumina

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Lucas Primo, por todos os anos de ensinamentos, amizade, por sua humanidade e compreensão e pela confiança para desenvolver esta pesquisa.

Ao Meu pai José, minha Mãe Rita, meus irmãos Karina e Diego pelo amor incondicional e sem limites, apoio e incentivo, esses anos foram muito difíceis, mas graças a vocês conseguimos superar com muita luta todos os obstáculos.

Ao meu melhor amigo, companheiro e amor da minha vida, Thiago, por me apoiar desde o dia que eu resolvi iniciar na área científica até hoje, por me ajudar a superar os desafios, que mesmo com nos seus piores dias esteve ao meu lado com muita paciência e amor, tornando os meus dias mais felizes e leves e por ser meu alicerce sempre, e à sua família especial a minha sogra ou melhor segunda mãe Marta e em memória ao meu sogro Alberto por todo amor, incentivo e apoio incondicional.

Aos amigos Daniela, Denise, Letícia, Bruna, Cassamo, Daniele, Bruno, Renata, e Ariela pela amizade sincera, pelos conselhos e pelos ótimos momentos de convivência durante estes anos de companheirismo. A Stephanie e Mariza pela amizade e pelo companheirismo e apoio tanto pessoal quando profissional, vocês fizeram meu final de doutorado mais leve e divertido. Aos técnicos Adriana, Ana, Flavio e Matheus pelo profissionalismo, pela amizade e pela disposição em ajudar. A todos os amigos do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UNESP.

Ao Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco e colegas do Centro de Nanotecnologia e Engenharia de Tecidos por manter seu laboratório sempre de portas abertas disponibilizando toda sua estrutura laboratorial para realização de alguns dos experimentos cruciais para conclusão desse trabalho.

A Profa. Dra. Valéria C. Santos-Ebinuma pela disponibilização do leitor de placas e espectrofluorímetro que foram de grande importância para conclusão desse trabalho.

A Profa. Dra Carla pela disponibilização das fontes de led utilizadas nos ensaios de fotobioestimulação

Ao Prof. Dr. Marlus Chorilli por disponibilizar o Zetasizer, o qual é de grande importância para caracterização das nanoestruturas desse e de muitos trabalhos do nosso grupo.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – Araraquara

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

1. INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano, dividida em três camadas sobrepostas as quais são denominadas, derme, epiderme e hipoderme, e também, por anexos tais como, pelos, glândulas sebáceas e sudoríparas (KHOSHNOOD & ZAMANIAN, 2020). A pele também é um dos mais complexos órgãos do corpo humano, possui uma multiplicidade de funções, como barreira imunológica e física, as quais protegem os sistemas e órgãos internos contra patógenos e microrganismos além de ser responsável pela regulação térmica (KNOX & O'BOYLE, 2021). Além de ser o maior o órgão também se encontra em ,constante exposição ao ambiente externo em nosso corpo, por consequência ela encontra-se em constante exposição aos microrganismos, alterações térmicas, químicas, choques mecânicos, que podem levar a danos severos a pele, tais como queimaduras, processos inflamatórios, traumatismos de tecidos moles, câncer, dentre outras doenças que levam à necrose da pele, o que pode levar a remoção e a necessidade de substituição do tecido (TARASSOLI *et al.*, 2018). Com isso a busca por tratamentos direcionados a lesões da pele ainda é um objetivo atual na área médica. Os enxertos de pele são uma das principais formas de tratamento para regeneração e substituição do tecido lesionado, no entanto quando se trata de uma lesão que necessita regeneração total do tecido, os tratamentos convencionais ainda são ineficientes, deixando grandes cicatrizes. Além disso um outro agravante está relacionado a falta de pele suficiente de doadores, pela ausência de resposta imunológica, além de riscos relacionados à uma abordagem cirúrgica (RAHMANI DEL BAKHSHAYESH *et al.*, 2018).

A Engenharia de Tecidos (ET) uma das mais importantes áreas de pesquisa na atualidade, une os princípios das ciências da vida e engenharia para o desenvolvimento agressivo de biomateriais como alternativa a sistemas e substitutos biológicos, que podem melhorar e restaurar as funções teciduais (GHAFARI *et al.*, 2019). O princípio da ET é a incorporação de células em um

suporte com intuito de reproduzir a estrutura tridimensional dos tecidos, os quais podem também repor propriedades físicas, mecânicas e biológicas dos tecidos (HUANG *et al.*, 2018). No campo da ET da pele, tem sido possível o desenvolvimento de substitutos de pele que reproduzem a humana, eles são chamados de equivalentes ou modelos de pele tridimensional, e são utilizados como implantes e reparo de lesões (ZENG *et al.*, 2017). Os Equivalentes de pele tridimensionais (EPT) são matrizes de cultura de células, que podem reproduzir as funções e morfologia da pele *in vivo*. Além da sua utilização como substitutos aos enxertos convencionais, os EPT são utilizados em teste de novas drogas, triagem de compostos afim de diminuir a utilização de animais na pesquisa (DOKE & DHAWALE, 2015; JENSEN *et al.*, 2018). A proposta de desenvolvimento de um EPT surgiu da possibilidade de cultivo de fibroblastos e queratinócitos *in vitro*, junto com matrizes que compõe a pele. Os primeiros protocolos datam dos anos 70, e utilizavam monoculturas de queratinócitos ou fibroblastos com colágeno do tipo como matriz (BELL *et al.*, 1979; RHEINWALD & GREEN, 1974). Atualmente, tem sido estudado a semeadura de co-cultura celular com intuito de produzir uma epiderme completa (KIM *et al.*, 2018). EPT podem ser utilizados como modelos de pele humana em diferentes áreas científicas tecnológicas, além do seu papel como substituto no tratamento de lesões, esses modelos são importantes ferramentas no estudo das doenças e lesões relacionadas a pele (YAN *et al.*, 2018; ZHANG & MICHNIAK-KOHN, 2012).

A Terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica menos invasiva quando comparada as terapias convencionais, com isso possui grande aceitação entre os pacientes, sendo bastante eficiente por sua seletividade, versatilidade e simplicidade terapêutica (LI *et al.*, 2017; WEI *et al.*, 2017). A TFD tem sido amplamente estudada com aplicação no tratamento de diversas doenças em destaque para alguns tipos de câncer. Seu mecanismo consiste na utilização de três componentes essenciais, uma molécula capaz de absorver luz/energia monocromática em um comprimento de onda específico denominada fotossensibilizador (FS), uma fonte de energia luminosa (LASER ou LED) e oxigênio molecular (O₂) presente em nosso organismo (BENOV,

2015). A junção desses componentes leva a uma série de reações fotoquímicas e acarretam na produção de oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) altamente reativo e outras espécies reativas de oxigênio (ERO) que, quando em contato com a célula patogênica, induzem uma sucessão de eventos biológicos, incluindo fototoxicidade, dano vascular e resposta do sistema imunológico ou fotobioestimulação quando modulados com o emprego de fontes de excitação (LASER/LED) de baixa potência (LI *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2018).

A terapia de fotobioestimulação (TFB) utiliza o LASER ou LED de baixa potência para estimulação de tecidos alvos, a qual ativa a diferenciação celular, podendo modular o processo inflamatório, induzir efeitos biológicos específicos, prevenir a fibrose tecidual e contribuir diretamente na regeneração tecidual (SILVA *et al.*, 2016). A eficácia da TFB depende de fatores específicos, entre eles destaca-se a concentração de ERO produzidas pelos cromóforos endógenos, a qual necessariamente deve estar em níveis subletais. Com isso pode-se ativar principalmente as enzimas benéficas antioxidantes ao invés de se iniciar a cascata apoptótica. De forma complementar pode-se atingir a capacidade de estimulação e sinalização biológica, incluindo os efeitos de controle e indução do crescimento celular e também a aplicação na diferenciação de células-tronco pluripotentes (HOCHMAN, 2018; SILVA *et al.*, 2018). Acredita-se que os processos fotodinâmicos, quando estimulados de forma controlada, podem gerar uma resposta de fotobioestimulação específica (TEDESCO & JESUS, 2017).

No entanto a maior desvantagem dessa terapia é a baixa solubilidade dos ativos FS, o que atualmente tem sido contornada com a utilização da nanotecnologia farmacêutica para o desenvolvimento de variados tipos de nanocarreadores. Esta estratégia tem o intuito de promover melhor interação em meio biológico a partir da melhor dissolução do ativo em ambientes químicos favoráveis, além do tamanho de partícula reduzido em escala sub-micrônica (nanométrico) que pode melhorar e ampliar esta interação biológica, promovendo acumulação em tecidos alvos, e assim reduzir a dose de FS necessária para garantir o efeito terapêutico (MARASSI *et al.*, 2015) Além

disso, sistemas nanocarreadores possuem um transporte muito eficiente de fármacos, seu tamanho nanométrico promove um efeito de acumulação passiva nos tecidos patogênicos, possui biocompatibilidade, promove uma liberação controlada e sustentada, redução de efeitos adversos inerentes ao fármaco e ampliação das formas de administração (BIRHANU *et al.*, 2017).

Neste contexto, as nanoemulsões com recobrimento polimérico ou nanocápsulas poliméricas (NC) destacam-se entre os tipos de nanocarreadores coloidais, com vantagens que vão desde sua estabilidade prolongada, baixo custo de obtenção, promoção de liberação controlada, além da capacidade de encapsulação de ativos com solubilidade distinta, biocompatibilidade e biodegradabilidade (ZANCANELA *et al.*, 2011).

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e caracterização de um modelo biológico avançado denominado pele tridimensionais a partir do desenvolvimento de múltiplas camadas, compostas por co-cultura de células com queratinócitos e fibroblastos, para utilização como modelo de teste de fotobioestimulação empregando-se nanocápsulas poliméricas contendo o fotossensibilizador curcumina, com intuito de avaliar seu efeito na proliferação celular frente a fotobioestimulação.

Este trabalho foi de grande relevância acadêmico científico, além disso, tem um papel muito importante para com a sociedade, auxiliado nos estudos de tratamentos para diversas doenças e servindo como suporte para estudos e como terapia para diversas doenças e lesões relacionadas a pele.

2. REVISÃO DA LITERATURA

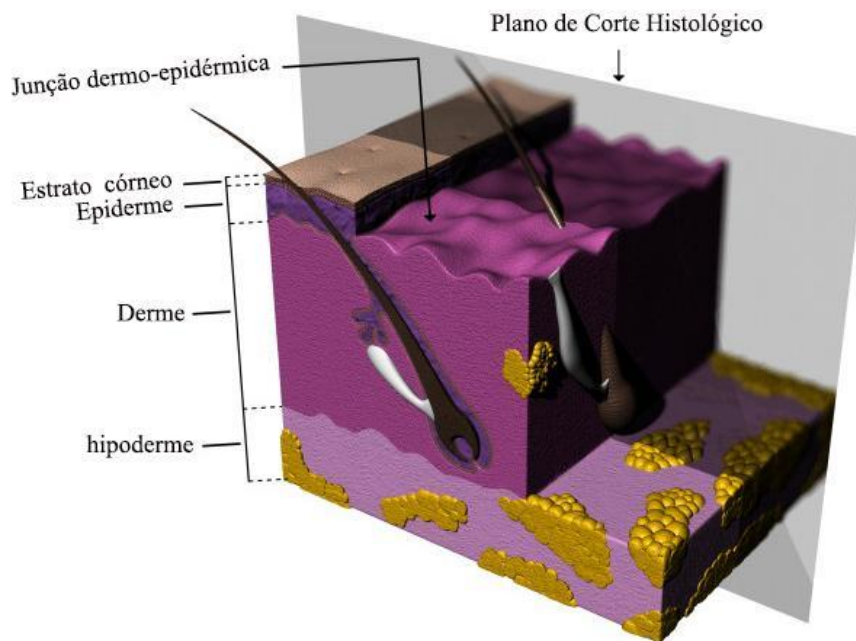
2.1. A PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano a qual possui uma área de aproximadamente 6,0 m² e cerca de 15% da massa corporal total de um adulto. É um órgão altamente adaptável, com várias espessuras, além disso, é um dos mais complexos órgãos e possui múltiplas funções especializadas em todo

corpo humano (MOHAMED & HARGEST, 2022). A pele possui seis principais funções. **Proteção**, agindo como barreira física e imunológica, protegendo contra produtos químicos, patógenos nocivos, efeitos da radiação ultravioleta (UV) e na atenuação do impacto de lesões mecânicas, térmicas ou físicas. **Termostato**, adaptando-se às mudanças na temperatura do corpo, utilizando mecanismos para preservar ou disseminar o calor corporal. **Armazenamento de água**, a pele atua como reservatório de água sendo responsável por 18 a 20% do volume total de água corporal. **Síntese de vitamina D**, principal responsável pela produção de vitamina D, porém depende da exposição à luz ultravioleta. **Rede de retransmissão neural**, receptores das células nervosas presentes na pele detectam estímulos de várias sensações, como toque, dor e temperatura. **Expressão e comunicação**, capacidade da pele de permitir que os indivíduos exibam emoções configura-se como uma função social do órgão, atuando como um indicador do estado físico do indivíduo. (KNOX & O'BOYLE, 2021; MOHAMED & HARGEST, 2022).

A pele humana é anatomicamente dividida em três camadas: epiderme, derme e hipoderme (Figura 1), que são constituídas por um conjunto de tipos celulares diferentes, tais como, queratinócitos, melanócitos, fibroblastos e células endoteliais, que são responsáveis por garantir as funções do órgão (BÖTTCHER-HABERZETH *et al.*, 2010; LIMBERT *et al.*, 2019).

Figura 1- Representação esquemática da estrutura tridimensional (3D) da pele humana indicando as principais camadas da pele e da junção dermo – epidérmica.



Fonte: Traduzido de Limbert *et al.*, 2019.

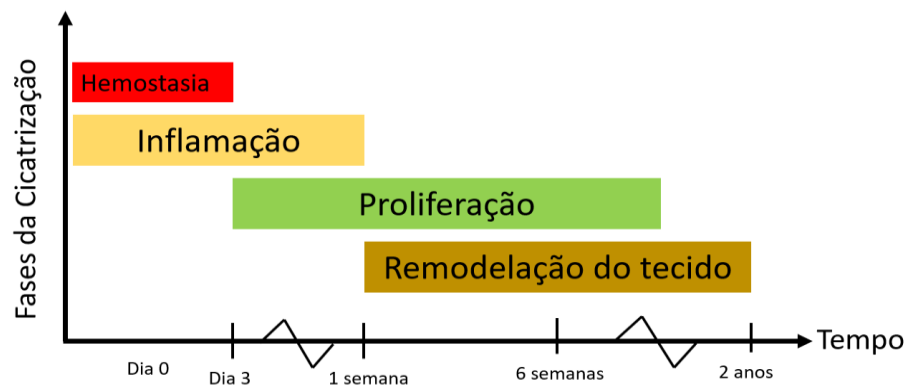
A epiderme é a camada mais externa da pele, tendo como principais funções a barreira física e imunológica, composta principalmente por queratinócitos e melanócitos, também possui células imunoresidentes incluindo células Langerhans, células de Merkel, além de possui células não epiteliais (ABDO *et al.*, 2020; TAVAKOL *et al.*, 2016). Abaixo da epiderme se encontra a derme, compostas principalmente por fibroblastos, ela também acomoda os sistemas neurais, vasculares, linfáticos e anexos da pele, e é responsáveis pelo transporte de nutrientes para epiderme, células imunes dentro da pele e mediadores bioativos(LAI-CHEONG & MCGRATH, 2017). A hipoderme camada mais interna da pele é constituída principalmente por tecido adiposo, que possuem função de isolamento térmico e proteção mecânica além de atuar como fonte de energia, na geração calor e reserva de nutrientes para períodos de inanição (MOHAMED & HARGEST, 2022).

2.2. CICATRIZAÇÃO

A capacidade do corpo de se regenerar após uma lesão, reestabelecendo funções celulares e teciduais e reconstruindo estruturas danificadas é essencial para manutenção da vida. Após o tecido sofrer um dano por algum fator externo seja um acidente, cirurgia, doença etc., o processo de cicatrização é iniciado a partir de uma resposta complexa e organizada na tentativa de reconstruir e reestabelecer a integridade e função dos tecidos lesionados (KIYA & KUBO, 2019).

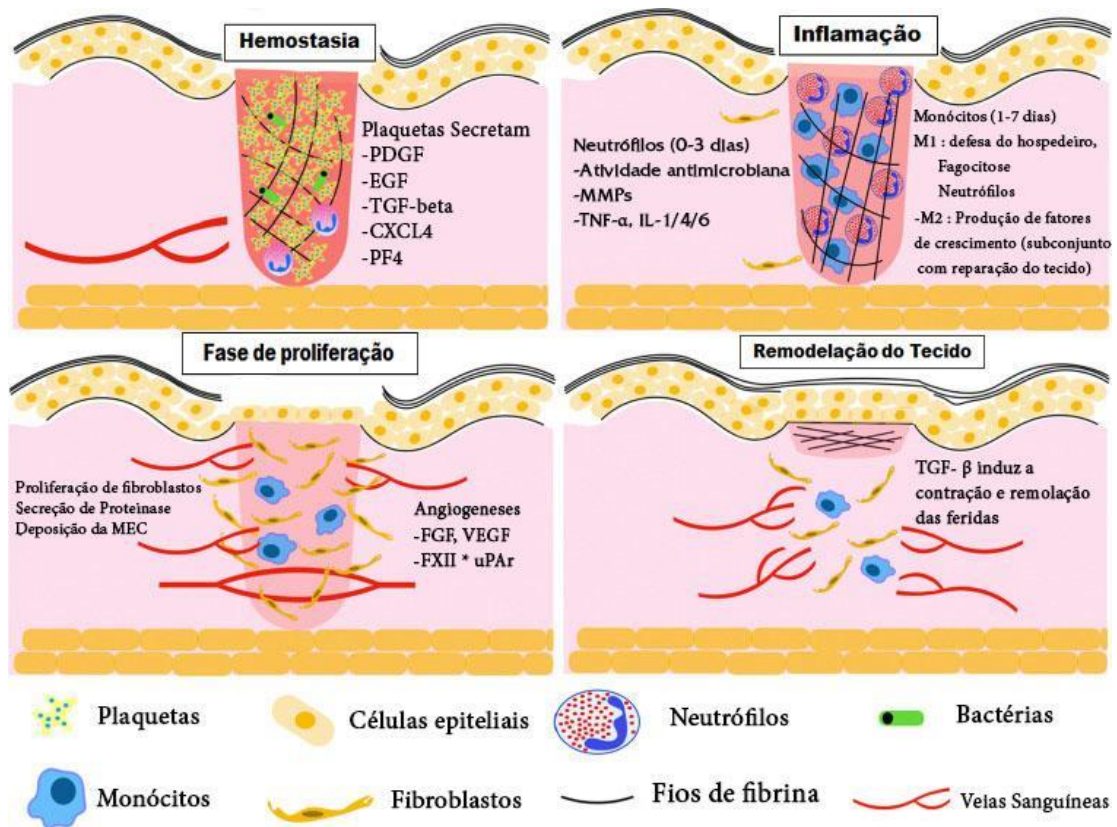
O processo de cicatrização é bastante delicado e dinâmico e envolve quatro fases distintas e ocorrem em sequência e sobrepostas que incluem homeostase, inflamatória, proliferação e remodelação (Figuras 2 e 3)(ABDOLI *et al.*, 2017; LACERDA *et al.*, 2018).

Figura 2- Fases de cicatrização de feridas. Linha do tempo que descreve as fases sequenciais, embora sobrepostas, da cicatrização de feridas, hemostasia (vermelho), inflamação (amarelo), proliferação de queratinócito, angiogênese (verde) e remodelação do tecido (marrom).



Fonte: Traduzido de Opneja *et al.*, 2019.

Figura 3- Contribuição das células hematopoiéticas para a cicatrização de feridas. As fases da cicatrização de feridas são descritas de forma ilustrativa abaixo.



Fonte: Traduzido de Opneja *et al.*, 2019.

A hemostasia é iniciada imediatamente após a lesão na pele, um vazamento de sangue pelos vasos sanguíneos danificados acontece na maioria dos ferimentos na pele o que resulta no rápido recrutamento de plaquetas. Um escudo temporário é formado por um coágulo como proteção dos tecidos desnudados da ferida, constituído por plaquetas que estão embutidas em uma malha de fibras de fibrina que previne o sangramento, auxilia na adesão das células para formação de uma matriz extracelular temporária, além de ajudar na defesa contra propagação bacteriana (ISAAC *et al.*, 2010; OPNEJA *et al.*, 2019).

A fase inflamatória é responsável pela prevenção de infecção na lesão, após 24 h da lesão as plaquetas começam a liberar substâncias quimiotáticas e os neutrófilos, responsáveis pela produção de radicais livres e destruição bacteriana, são as primeiras células a chegarem na lesão. Nessa fase também ocorre a liberação de marcadores químicos, migração de leucócitos, linfócitos e macrófagos que possuem a função de fagocitar corpos estranhos como por

exemplo bactérias e fragmentos celulares destruídos pelos neutrófilos. Além disso, os macrófagos têm a função de secretar citocinas e fatores de crescimento que contribuem com a angiogênese, fibroplasia e síntese de matriz extracelular (PAN *et al.*, 2021).

A fase de proliferação é subdividida em quatro etapas fundamentais: epitelização, angiogênese, formação do tecido granuloso e deposição do colágeno (ISAAC *et al.*, 2010). A epitelização pode ocorrer de duas maneiras, quando a membrana basal está intacta ocorre a migração das células epiteliais em direção superior, com isso a epiderme é restaurada em três dias. Porém quando a membrana basal se encontra lesada, as células epiteliais das bordas da ferida começam a se proliferar com intuito de restabelecer a barreira protetora (OPNEJA *et al.*, 2019). O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), é o fator estimulatório da angiogênese a qual é caracterizada pela formação de capilares e migração das células endoteliais que são essenciais na cicatrização adequada da lesão. A formação de tecidos de granulação é a etapa final da fase de proliferação. As células endoteliais e os fibroblastos são as principais células dessa fase. O fator derivado das plaquetas (PDGF) é responsável pela ativação e proliferação dos fibroblastos que migram dos tecidos vizinhos para a lesão, em seguida o fator de crescimento de transformação beta (TGF- β) é responsável por estimular a produção de colágeno tipo I pelos fibroblastos o que leva a sua transformação a miofibroblastos que são responsáveis pela contração da lesão (MA *et al.*, 2012; ZENG *et al.*, 2017).

A fase de remodelação do tecido é caracterizada pela deposição, de maneira organizada, do colágeno, que inicialmente é produzido com uma espessura mais fina que a presente na pele saudável e é orientado paralelamente à pele (ISAAC *et al.*, 2010). Com o tempo o colágeno de tipo III é reabsorvido e ocorre a produção de um colágeno mais espesso ao longo das linhas de tensão e com isso ocorre um aumento na força de tensionamento da ferida. O processo de reorganização da nova matriz é muito importante para a cicatrização. A collagenase secretada pelos leucócitos e fibroblastos promovem a lise da matriz antiga, e com isso, para o sucesso da cicatrização, deve-se

haver um equilíbrio entre os processos de síntese na nova pele, e a lise da antiga matriz (OPNEJA *et al.*, 2019).

2.3. ENGENHARIA DE TECIDOS DE PELE

A engenharia de tecidos (ET) pode ser definida como a combinação dos princípios da engenharia e as ciências da saúde para a compreensão da relação estrutura/função de tecidos saudáveis e patológicos, ainda para o desenvolvimento de substitutos biológicos buscando o reparo ou regeneração de tecidos e órgãos, e que mantenham suas funções (AHMED *et al.*, 2018). Com a grande limitação dos transplantes de órgão, a falta de doadores e rejeição do tecido implantado, além das poucas alternativas disponíveis, como dispositivos médicos não restaurarem por completo as funções do tecido, a ET apresenta grande potencial para solucionar essas limitações. Sua proposta é substituir os tratamentos convencionais (transplantes de órgãos e implantes artificiais) e a necessidade de desenvolvimento de alternativas para substituição dos modelos para ensaios *in vivo* (AIRES-FERNANDES *et al.*, 2022; BODNAR *et al.*, 2018; BAMBOLE & YAKHMI, 2016)

A ET tem atuado no desenvolvimento e crescimento *in vitro* de equivalentes tridimensionais para diversas aplicações como implante e reparo de regiões lesadas, em terapias celulares que se baseiam na aplicação de solução de células livres ou combinadas a compostos biocompatíveis para indução de reparo e regeneração de órgãos e tecidos, no desenvolvimento de próteses e dispositivos que mimetizam os tecidos humanos para substituição e/ou funcionalização de lesões e órgãos danificados, como estrutura óssea, musculatura, tendões, cartilagens e componentes do aparelho cardíaco (válvulas, coronárias e vasos ventriculares) (BAMBOLE & YAKHMI, 2016; ZENG *et al.*, 2017).

2.4. EQUIVALENTES DE PELE TRIDIMENSIONAIS

Os Equivalentes de pele tridimensionais (EPT) são matrizes de cultura de células, as quais possuem intuito de produzir tecidos vivos, que podem mimetizar a morfologia e as funções que ocorrem naturalmente *in vivo*, além de

serem utilizados para estudos de progressão e propagação de doenças, em testes com novos fármacos, triagem de compostos, e na substituição e reparo de tecidos (JENSEN *et al.*, 2018). A proposta de desenvolvimento de um EPT surgiu da possibilidade de cultivo de fibroblastos e queratinócitos *in vitro*, junto com matrizes que compõe a pele.

O primeiro protocolo desenvolvido utilizava queratinócitos de células isoladas, esses queratinócitos se multiplicavam e coalesciam, com isso havia a formação de um epitélio transplantável (RHEINWALD & GREEN, 1974). Estudos posteriores desenvolveram protocolos onde fibroblastos humanos eram semeados em gel de colágeno tipo I, formando assim equivalentes dérmicos (ED), os quais faziam com que o este substrato fosse contraído, a partir desse modelo se tornou possível o estudo do processo de contração da pele durante a cicatrização (BELL *et al.*, 1979).

Atualmente os EPT têm sido produzidos a partir da semeadura de queratinócitos humanos em ED para produzir uma epiderme completamente diferenciada (KIM *et al.*, 2018). Assim esses EPT têm sido empregados como modelos de pele humana em diferentes áreas tecnológicas como a biologia molecular, farmacologia, cosmética, engenharia tecidual e clínica médica (Z. ZHANG & MICHNIAK-KOHN, 2012). Além da utilização como substitutos de pele para tratamento de lesões cutâneas, os EPT têm valor adicional como ferramentas para entender essas doenças e a biologia da pele fundamental, além de facilitar a pesquisa em dermatologia e farmacologia da pele (YAN *et al.*, 2018).

Muitos estudos descrevem metodologias distintas, tais como, utilização de fibrina associada a uma rede polímeros como estrutura de sustentação das células, quitosana, e mais atual o uso da impressão 3D (GSIB *et al.*, 2018; SRIRAM *et al.*, 2016; YAN *et al.*, 2018). Utilização de matrizes de colágeno tipo I como estrutura está entre as mais consagradas por possuir a capacidade de interferência no processo de cicatrização e por possuir maior semelhança com a pele humana, pois o colágeno é o principal componente da matriz extracelular (MEC) (ZENG *et al.*, 2017).

Com isso os EPT também mostram potencial como ferramentas para estudos da MEC, a qual é base de sustentação dos tecidos (KIM *et al.*, 2018). A MEC é composta principalmente por proteínas fibrosas, como o colágeno e a elastina, que são responsáveis pela sustentação estrutural e elástica de diversos tecidos, fibronectina e laminina, que estão relacionadas com a adesão entre a matriz e a célula; e cadeias de polissacarídeos como as glicosaminoglicanos (GAGs) e proteoglicanos, que são muito resistentes à compressão e permiti a difusão de nutrientes, hormônios e outros mensageiros químicos (ZENG *et al.*, 2017). As metaloproteínas secretadas pela MEC desempenham papel importante no crescimento, proliferação celular e as etapas da cicatrização, regeneração tecidual e morte (MASCIAANTONIO *et al.*, 2017). Com isso a produção de EPT facilita a pesquisa nas áreas dermatológicas e farmacológicas da pele (KIM *et al.*, 2018)

Com a crescente busca na redução do uso de animais na pesquisa, a pesquisa por alternativas ou substituintes cutâneos, também são de grande importância (DOKE & DHAWALE, 2015). Neste contexto o uso da ET para o desenvolvimento de modelos capazes de mimetizarem as funções dos tecidos para testes de segurança e eficácia tem se mostrado muito promissor (HOLMES *et al.*, 2009).

2.5. TERAPIA FOTODINÂMICA DE BIOESTIMULAÇÃO

A terapia fotodinâmica (TFD) é um método terapêutico utilizado para o tratamento de diversas doenças, possui vantagens e muita aceitação clínica devido baixa invasividade e maior segurança comparando-se às terapias convencionais, além de se mostrar bastante eficiente por sua versatilidade e simplicidade terapêutica (LI *et al.*, 2017; WEI *et al.*, 2017). Seus mecanismos de ação são baseados na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) como por exemplo o oxigênio singleto (1O_2), peróxido de hidrogênio, ânion radical superóxido, radical hidroxila, além de outras formas radicalares (CH_3^{\cdot} , NO_2^{\cdot} , $R-CO_2^{\cdot}$, etc.), partindo-se da administração de um composto denominado fotossensibilizador (FS), em seguida se faz a irradiação de luz

visível monocromática (geralmente do tipo LASER ou LED) em um comprimento de onda específico, desencadeando uma série de reações fotoquímicas que levam à produção de $^1\text{O}_2$ e EROS que induzem uma sucessão de eventos biológicos, incluindo fototoxicidade, dano vascular e resposta do sistema imunológico ou fotobioestimulação quando empregados a baixa potência (LUO *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2018).

A terapia de fotobiomodulação (TFB) ou laser terapia, consiste na utilização de fontes de luz de baixa intensidade afim de ativar os cromóforos endógenos com intuito de gerar respostas de ativação da regeneração celular e anti-inflamatórias (LIU *et al.*, 2014; MA *et al.*, 2012). Estudos demonstram os benefícios dessa terapia, como por exemplo, aumento da função neuronal pós-trauma, estimulação do crescimento neuronal, efeitos protetores em cardiomiócitos pós isquemia, modulação do sistema imune, remodelação e reparo do tecido ósseo e regeneração de nervos e músculos (ALGHAMDI *et al.*, 2012; DAWOOD & SALMAN, 2013; ELSON & FORAN, 2015; NOVAES *et al.*, 2014; PELOW *et al.*, 2010; PRINDEZE *et al.*, 2012). Estudos também demonstram efeitos da TFB na produção de colágeno, proliferação de fibroblastos e redução da resposta inflamatória, o que a torna uma terapia alternativa para os processos de cicatrização e reparação tecidual (DEYHIMI *et al.*, 2016).

Embora o objetivo inicial da TFD seja a produção de altas concentrações de ERO, o que acarreta em danos celulares, como a apoptose ou necrose das células patogênicas (SIQUEIRA-MOURA *et al.*, 2013), estudos recentes apontam que a diminuição da densidade de energia e por consequência uma baixa produção de ERO podem levar a uma resposta bioestimuladora em células, tecidos ou órgãos, semelhante ao que já acontece com a terapia de fotobiomodulação, ativando respostas de crescimento, diferenciação e regeneração celular, (TEDESCO & JESUS, 2017).

Diante desse cenário estudos apontam a relação das doses de energia em relação ao efeito terapêutico da TFD, mostrando que baixas doses de energia podem levar as respostas que estimulam a sobrevivência celular, podendo

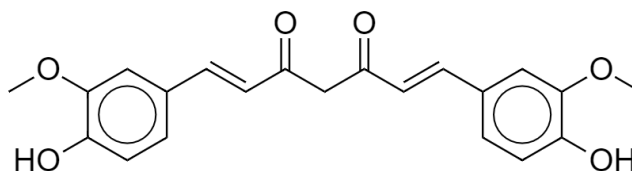
assim denominar terapia fotodinâmica de bioestimulação (TFDB) (AYSAN *et al.*, 2013; TOPALOGLU & BAKAY, 2022).

2.6. FOTOSSENSIBILIZADORES

Os fotossensibilizadores são compostos químicos classificados como corantes (naturais ou sintéticos), capazes de absorverem luz em um comprimento de onda específico, e então atuarem como responsáveis pelo desencadeando de uma série de reações fotoquímicas resultantes da produção de $^1\text{O}_2$ e ERO (KWIATKOWSKI *et al.*, 2018).

Neste contexto a curcumina (figura 4) é um composto natural que possui grande potencial como fotossensibilizador (MACHADO *et al.*, 2019), além disso desperta grande interesse medicinal baseado em estudos preliminares que mostram seu potencial para tratamento e prevenção de diversas patologias, tais como doenças inflamatórias, cardiovasculares, neurodegenerativas e neoplásicas, e atuar com forte ação antioxidante (DE MATOS *et al.*, 2018; GUAN *et al.*, 2016). A versatilidade terapêutica da curcumina é resultado da sua ampla capacidade regulatória de alvos moleculares, como, fatores de crescimento e transcrição e também de receptores de citocinas, enzimas e genes responsáveis pela proliferação celular e apoptose (MACHADO *et al.*, 2019), No entanto a eficácia da curcumina em sistemas *in vitro* e *in vivo* depende da sua biodisponibilidade o que é limitado pela sua baixa solubilidade em meio aquoso, com isso se faz necessária a combinação da curcumina com a nanotecnologia farmacêutica.

Figura 4 - Fórmula química estrutural da curcumina.

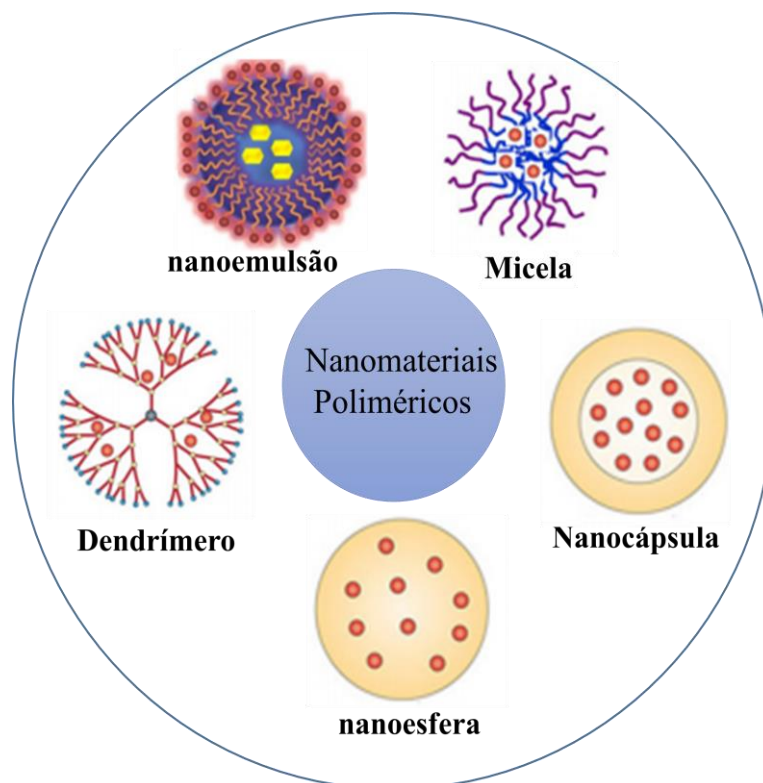


Fonte: autor.

2.7. NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

A Nanotecnologia Farmacêutica (NF) revolucionou as formas convencionais de liberação e *design* de medicamentos, com potencial de fornecer soluções inovadoras para diagnósticos, terapia e profilaxia para diversas doenças (AMANTINO *et al.*, 2020). A NF tornou possível o desenvolvimento de medicamentos em nanoescala com alta especificidade e direcionamento para o tratamento específico de diversas doenças (MARASSI *et al.*, 2015). O uso de nanocarreadores (figura 5) para incorporação de princípios ativos e fármacos proporciona muitas vantagens terapêuticas, comparando-se aos sistemas de entrega convencionais, tais como, biocompatibilidade, transporte eficiente do fármaco, liberação controlada e sustentada, e redução de efeitos adversos inerentes ao fármaco, ampliação das formas de administração, destacando-se as vias oral, ocular, nasal, transdérmica, subcutânea, intraperitoneal e intramuscular, e além da possibilidade de administração direta na circulação sanguínea sem risco de bloqueio dos vasos ou de efeito tromboembólico (BIRHANU *et al.*, 2017).

Figura 5 - Principais sistemas nanoestruturados poliméricos utilizados para aplicações biológicas como nanocarreadores de ativos



Fonte: Adaptado de Alcalá-Alcalá & Quintanar-Guerrero, 2015; Tang *et al.*, 2016.

As nanoemulsões com recobrimento polimérico ou nanocápsulas poliméricas (NC) apresentam muitas vantagens dentre outros tipos de nanocarreadores, desde sua estabilidade prolongada, baixo custo de obtenção, promoção de liberação controlada e/ou sustentada, além da capacidade de encapsulação de ativos com solubilidade distinta, alta biocompatibilidade e biodegradabilidade (DAVEY, 2021; SIQUEIRA-MOURA *et al.*, 2013)

Portanto neste contexto a presente tese teve como foco principal, o aperfeiçoamento do equivalente dérmico em equivalente de pele 3D, a partir do desenvolvimento de camadas compostas por co-cultura de células com queratinócitos e fibroblastos, e utilizá-los como alternativa a testes *in vivo*, e modelo para ensaios de terapia fotodinâmica de bioestimulação (TFDB) com nanocápsulas de curcumina.

3. OBJETIVOS

3.1.OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver e caracterizar um novo equivalente de pele tridimensional *in vitro* para utilização como substituto aos modelos *in vivo* em testes de terapia fotodinâmica de bioestimulação com nanocápsulas de curcumina.

3.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver os equivalentes de pele tridimensionais (EPT);
- Analisar a morfologia e imuno-histoquímica dos EPT;
- Desenvolver as nanocápsulas com curcumina (NC/Curc);
- Determinar o tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial Zeta e tempo de estabilidade de formulação contendo fotossensibilizador nanoestruturado (curcumina/nanocápsula polimérica);
- Analisar morfologicamente as formulações de NC e NC/Curc;
- Realizar ensaios de citotoxicidade das formulações em monocamada celular e nos equivalentes de pele tridimensionais;
- Avaliar o efeito da fotobioestimulatório das NC/Curc em monocamada e em equivalentes tridimensionais empregando-se imuno-histoquímica;
- Avaliar a rede tridimensional do equivalente de pele e da matriz extracelular utilizando técnicas de microscopia eletrônica da alta resolução.
- Estudar o efeito fotobioestimulatório das NC/Curc nos EPT monitorando-se a viabilidade celular após irradiação

5. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos podemos concluir que o objetivo inicial do trabalho foi alcançado, as NC/Curc possuem grande potencial para utilização na terapia fotodinâmica de bioestimulação, os equivalentes de pele 3D apresentaram grande potencial como modelo de estudos *in vitro*, para avaliação dos efeitos biostimulatórios da combinação de fotossensibilizadores e baixas doses de energia. Com isso podemos afirmar que os resultados obtidos são bastante satisfatórios e de grande importância e relevância acadêmica e científica, e podendo atuar como importante suporte e referência para estudos futuros nesta área do conhecimento.

REFERÊNCIAS

ABDO, J. M.; SOPKO, N. A.; MILNER, S. M. The applied anatomy of human skin: A model for regeneration. *Wound Medicine*, v. 28, September 2019, 2020. 100179. <https://doi.org/10.1016/j.wndm.2020.100179>.

ABDOLI, A.; MASPI, N.; GHAFARIFAR, F. Wound healing in cutaneous leishmaniasis: A double edged sword of IL-10 and TGF- β . In *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* (v. 51, p. 15–26, 2017. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2017.02.001>.

AIRES-FERNANDES, M.; AMANTINO, C. F.; DO AMARAL, S. R.; PRIMO, F. L. Tissue Engineering and Photodynamic Therapy: A New Frontier of Science for Clinical Application -An Up-To-Date Review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v.10, June, p. 1–13, 2022. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.837693>.

AMANTINO, C. F.; *et al.* Anthraquinone encapsulation into polymeric nanocapsules as a new drug from biotechnological origin designed for photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v.31, 101815, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101815>.

AYSAN, N. *et al.* Biostimulative effect of 809-nm diode laser and indocyanine green on *p. aeruginosa* instead of photodynamic therapy . *Mechanisms for Low-Light Therapy VIII*, v. 8569, 85690D, 2013. <https://doi.org/10.1117/12.2003800>.

BAMBOLE, V.; YAKHMI, J. V. Tissue engineering: Use of electrospinning technique for recreating physiological functions. In: BAMBOLE, V.; YAKHMI, J. V. (editor). *Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering: Applications of Nanobiomaterials*. Elsevier Inc, 2016. v. 5, p. 387–455. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-42865-1.00014-3>.

BELL, E.; IVARSSON, B.; MERRILL, C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.76, n. 3, p. 1274–1278, 1979.

<https://doi.org/10.1073/pnas.76.3.1274>.

BODNAR, C.; CHRISTIANI, T. R.; DAHM, K.; VERNENGO, A. J. Implementation and assessment of an undergraduate tissue engineering laboratory course. *Education for Chemical Engineers*, v. 24, p. 52–59, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ece.2018.07.002>

CASTILHO-FERNANDES, A.; *et al.* Adipogenic differentiation of murine bone marrow mesenchymal stem cells induced by visible light via photo-induced biomodulation. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 25, p. 119–127, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.11.013>.

DAVEY, B. R. What are Nanocapsules? Nanocapsules – An Overview *Delivering Drugs Using Nanocapsules Derived from Cow 's Milk.* , p. 1–5, 2021.

DOKE, S. K.; DHAWALE, S. C. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2015.. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.11.002>

DE FARIA, C. M. G.; COSTA, C. S.; BAGNATO, V. S. Photobiomodulation effects on photodynamic therapy in HNSCC cell lines. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 217, p. 112170, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112170>.

GHAFAARI, R.; *et al.* Fabrication and characterization of novel bilayer scaffold from nanocellulose based aerogel for skin tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 136, p. 796–803, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.104>

HUANG, J.; *et al.* Evaluation of tofu as a potential tissue engineering scaffold. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 6, n. 9, p. 1328–1334, 2018. <https://doi.org/10.1039/c7tb02852k>

JAYARAMAN, S.; *et al.* PCNA and Ki67: Prognostic proliferation markers for oral cancer. *Oral Oncology*, v. 130, n. May, p. 105943, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2022.105943> .

JENSEN, G.; MORRILL, C.; HUANG, Y. 3D tissue engineering, an emerging

technique for pharmaceutical research. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 1. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.03.006>

KHOSHNOOD, N.; ZAMANIAN, A. Decellularized extracellular matrix bioinks and their application in skin tissue engineering. *Bioprinting*, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2020.e00095>

KIM, Y. Y.; *et al.* Laminin peptide YIGSR enhances epidermal development of skin equivalents. *Journal of Tissue Viability*, v. 27, n. 2, p. 117–121, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jtv.2018.02.001>

KNOX, S.; O'BOYLE, N. M. Skin lipids in health and disease: A review. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2021.105055>

LACERDA, J. Z.; *et al.* Annexin A12-26 treatment improves skin heterologous transplantation by modulating inflammation and angiogenesis processes. *Frontiers in Pharmacology*, v. 9, n. SEP, p. 1–11, 2018.

LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine*), v. 45, n. 6, p. 347–351, 2017. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01015>

MARASSI, V.; *et al.* Hollow-fiber flow field-flow fractionation and multi-angle light scattering investigation of the size, shape and metal-release of silver nanoparticles in aqueous medium for nano-risk assessment. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 106, p. 92–99, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.11.031>

MOHAMED, S. A.; HARGEST, R. Surgical anatomy of the skin. *Surgery*, v. 40, n. 1, p. 1–7, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2021.11.021>.

NEGRI, L. B.; *et al.* Photobiomodulation combined with photodynamic therapy using ruthenium phthalocyanine complexes in A375 melanoma cells: Effects of nitric oxide generation and ATP production. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 198, p. 111564, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111564> .

PRIMO, F. L.; *et al.* C. In Vitro Evaluation of Chloroaluminum Phthalocyanine Nanoemulsion and Low-Level Laser Therapy on Human Skin Dermal Equivalents and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. In *Current Medicinal Chemistry*, 2011. <https://doi.org/10.2174/092986711796504745>.

RAHMANI DEL BAKHSHAYESH, A.; *et al.* Recent advances on biomedical applications of scaffolds in wound healing and dermal tissue engineering. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 2018.

RHEINWALD, James G.; GREEN, Howard. Growth of cultured mammalian cells on secondary glucose sources. *Cell*, v. 2, n. 4, p. 287-293, 1974. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(74\)90023-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(74)90023-3).

RODRIGUES, M. C.; *et al.* Photodynamic therapy mediated by aluminium-phthalocyanine nanoemulsion eliminates primary tumors and pulmonary metastases in a murine 4T1 breast adenocarcinoma model. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 204, n. July 2019, p. 111808, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111808>.

SIQUEIRA-MOURA, M. P.; PRIMO, F. L.; ESPREAFICO, E. M.; TEDESCO, A. C. Development, characterization, and photocytotoxicity assessment on human melanoma of chloroaluminum phthalocyanine nanocapsules. *Materials Science and Engineering C*, v. 33, n. 3, p. 1744–1752, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.12.088>.

TAKKEM, A.; *et al.* Ki-67 prognostic value in different histological grades of oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v. 19, n. 11, p. 3279–3286, 2018. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2018.19.11.3279>

TARASSOLI, S. P.; JESSOP, Z. M.; AL-SABAH, A.; *et al.* Skin tissue engineering using 3D bioprinting: An evolving research field. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2017.12.006>.

TAVAKOL, S.; JALILI-FIROOZINEZHAD, S.; MASHINCHIAN, O.; MAHMOUDI,

M. Bioinspired Nanotechnologies for Skin Regeneration. *Nanoscience in Dermatology*. p.337–352, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802926-8.00026-4>.

TOPALOGLU, N.; BAKAY, E. Mechanistic approaches to the light-induced neural cell differentiation: Photobiomodulation vs Low-Dose Photodynamic Therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 37, n. December 2021, p. 102702, 2022.<https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102702> .

ZENG, Q.; *et al.* 6.20 Skin tissue engineering. *Comprehensive Biomaterials II*. p.334–382, 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.10157-2>