

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE - UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Carla Zanatelli

**Modelos *in vitro* e *in silico* para a
redução do uso de animais: uma
tecnologia crucial para o avanço de
pesquisas dermatológicas**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre
2022

Carla Zanatelli

Modelos *in vitro* e *in sílico* para a redução do uso de animais: uma tecnologia crucial para o avanço de pesquisas dermatológicas

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dra. Márcia Rosângela Wink

Porto Alegre
2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo na Publicação

Zanatelli, Carla

Modelos in vitro e in slico para a redução do uso de animais: uma tecnologia crucial para o avanço de pesquisas dermatológicas / Carla Zanatelli. -- 2022. 49 p. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2022.

Orientador(a): Márcia Rosângela Wink.

1. testes em animais. 2. modelos alternativos. 3. testes dermatológicos. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pela presença constante em minha vida, por dar a mim resiliência para que fosse possível chegar ao final desta caminhada, renovando minha esperança em todo o tempo.

Ao meu pai, **Luis Carlos**, pelo amor e apoio em minhas decisões, por me ensinar sobre valores e sobre não esmorecer diante das dificuldades. À minha mãe **Marli**, por me estimular sempre, foi a minha primeira professora em casa e na escola, por me ensinar ler o mundo e as palavras, e através da independência pelo estudo, alçar voos mais altos.

À **Prof^a Márcia**, pela orientação em mais esta etapa da vida acadêmica, o seu conhecimento, suas contribuições e todo suporte fizeram este trabalho possível de ser realizado.

Ao **Guilherme**, pelo suporte e paciência, por estar sempre pronto, indo me buscar ou me esperando com comida quando voltava tarde do laboratório, aguentando minha ausência em muitos momentos além dos plantões do hospital sabendo que tinha laboratório, sendo ouvinte quando os experimentos davam errado ou comemorando comigo quando as células sobreviviam, ter você comigo fez as pedras do caminho mais leves.

À **Liliana**, por novamente abraçar comigo a experimentação, mesmo à distância em parte do trabalho, tua solicitude foi indescritível, foram inúmeras vídeo chamadas, mensagens trocadas, e quando voltou, foram muitos os finais de semana e dias em que saiu tarde do laboratório me auxiliando nos experimentos. Só posso agradecer pela ajuda despendida e pela amizade que levarei por toda vida.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Celular da UFCSPA. Em especial,

Thaís, minha colega desde a IC, com quem já dividi tantas discussões científicas, angústias, aprendizados e neste trabalho não seria diferente, meu especial obrigada por todo apoio. **Alicce**, que chegou ao fim desta caminhada, mas foi fundamental, me dando suporte nos experimentos, foi minha companheira, solícita e dedicada em todos os momentos, obrigada por tua amizade.

Ao **Giuliano Rizzoto**, por aguentar uma jovem eufórica no início da iniciação científica ensinando os conhecimentos básicos de laboratório e muito do que levo comigo até hoje e por me auxiliar na produção deste trabalho.

Ao **Cristiano Rodrigues**, por me ensinar os primeiros passos no cultivo celular, além de dar os primeiros pontapés para divulgar cientificamente a produção de conhecimento, obrigada por tudo.

À **minha família e amigos**, por todo carinho, incentivo e por entenderem meus momentos de ausência.

RESUMO

Modelos alternativos são ferramentas para substituir e reduzir o número de animais utilizados nas ciências biomédicas, seja para pesquisas ou testes de produtos industriais. Ao longo dos anos, vários modelos alternativos foram desenvolvidos nos mais diversos campos, com o objetivo final de mimetizar as funções sensoriais da pele, como por exemplo, o uso de substitutos dérmicos sintéticos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é apresentar os atuais modelos alternativos disponíveis para as ciências dermatológicas, avaliar suas aplicações e discutir suas vantagens e desvantagens, bem como as perspectivas futuras para uma translação clínica segura. A implementação de métodos alternativos para testes em têm sido notórios na indústria cosmética dermatológica, permitindo a realização de diversos testes químicos e moleculares de triagem sem o uso de animais. Porém, nas ciências dermatológicas ainda existem muitas barreiras que esses métodos alternativos proporcionam, como os diferentes microambientes teciduais e o entendimento das respostas metabólicas sistêmicas. Modelos comerciais de pele equivalente fabricada permitem a substituição de animais em testes de corrosão e irritação, porém, dentre os modelos avaliados, não há um método isolado que possa ser utilizado para excluir por completo os experimentos *in vivo*, sendo, portanto, necessária a avaliação dos protocolos regulatórios existentes e desenvolvimento de protocolos *in silico*, *in vitro* ou sua combinação. Espera-se que no futuro novas tecnologias alternativas sejam desenvolvidas possibilitando maior redução do uso de modelos animais além de fornecer conhecimento aplicável a todos os campos científicos.

Palavras-chave: Testes em animais, modelos alternativos, testes dermatológicos.

ABSTRACT

Alternative models are tools to replace and reduce the number of animals used in biomedical sciences, whether for research or testing of industrial products. Over the years, several alternative models have been associated in the most diverse fields, with the ultimate goal of mimicking the sensory functions of the skin, such as the use of synthetic dermal substitutes. Therefore, the objective of this work is to present the current alternative models available for the dermatological sciences, evaluate their applications and discuss their advantages and permanence, as well as the future perspectives for a safe clinical translation. The implementation of alternative methods for testing has been notorious in the dermatological cosmetic industry, allowing the performance of several chemical and molecular screening tests without the use of animals. However, in the dermatological sciences there are still many barriers that these alternative methods have provided, such as the different tissue microenvironments and the understanding of systemic metabolic responses. Commercial models of manufactured equivalent skin allow the substitution of animals in adherence and adherence tests, however, among the adopted models, there is not an isolated method that can be used to completely exclude in vivo experiments, therefore, it is necessary to evaluate the existing regulatory protocols and development of in silico, in vitro or combination protocols. It is expected that in the future new alternative technologies are seeking to further reduce the use of animal models in addition to knowledge applicable to all scientific fields.

Keywords: Animal testing, alternative models, dermatological tests.

SUMÁRIO

1. REFERENCIAL TEÓRICO	9
1.1. PELE	9
1.2. FERIDAS E CICATRIZAÇÃO	11
1.3. MATRIZES BIOLÓGICAS UTILIZADAS COMO SCAFFOLD	12
1.3.1. Submucosa de intestino	12
1.3.2. Membrana amniótica	13
1.4. CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS	15
1.5. BIOENGENHARIA	16
1.6. MÉTODOS ALTERNATIVOS	17
2. JUSTIFICATIVA	19
3. OBJETIVOS	20
4. ARTIGO CIENTÍFICO	21
5. PROPRIEDADE INTELECTUAL	36
6. CONCLUSÃO	38
7. PERSPECTIVAS	39
REFERÊNCIAS	40
APÊNDICES	44
APÊNDICE A - PRODUÇÃO CIENTÍFICA GERADA DURANTE O MESTRADO	44
APÊNDICE B - Parecer CEP UFCSPA	46
APÊNDICE C - Parecer CEP ISCMPA	48

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1. PELE

Como o maior órgão do corpo, a pele cobre toda a superfície externa do corpo e é composta de três camadas, a epiderme, a derme e a hipoderme. A espessura, pigmentação e distribuição dos apêndices da pele variam em diferentes partes do corpo, dependendo da função e das necessidades da área (ZAIDI; LANIGAN, 2010).

A epiderme é composta por multicamadas divididas em estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido e o estrato córneo. Os queratinócitos são o tipo celular predominante da epiderme, originam-se na camada basal, produzem queratina e são responsáveis pela formação da barreira hídrica epidérmica através da produção e secreção de lipídios. Adicionalmente, os queratinócitos desempenham múltiplos papéis essenciais para o reparo da pele pois são executores do processo de reepitelização, no qual migram, proliferam e se diferenciam para restaurar a barreira epidérmica, uma vez que têm *crosstalk* ativo com células imunes durante o reparo do tecido. Os melanócitos, derivados das células da crista neural, são encontrados entre as células do estrato basal e produzem principalmente melanina, que é responsável pelo pigmento da pele. As células de Langerhans, células dendríticas que desempenham um papel significativo na apresentação de antígenos e as células de Merkel, encontradas no estrato basal, desempenham uma função sensorial como mecanorreceptores (PIIPPONEN; LI; LANDÉN, 2020; YOUSEF; ALHAJJ; SHARMA, 2021)

Ligada à epiderme ao nível da membrana basal, encontra-se a derme, a qual desempenha um papel crucial no amortecimento do corpo e no fornecimento de estrutura e é organizada como uma rede em forma de malha que consiste em tecido conjuntivo, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e mastócitos. O tecido conjuntivo é formado principalmente por fibroblastos, que são responsáveis pela síntese de proteínas de elastina e colágeno. As proteínas de elastina desempenham um papel na garantia de elasticidade e resistência à pele. As fibras de colágeno são proteínas estruturais que desempenham papéis importantes no alongamento e na resistência à

tração da pele. Os mastócitos são responsáveis pela resposta inflamatória da pele para combater microorganismos, alérgenos e lesões físicas (THE INTEGUMENT, 2007; JO et al., 2021).

A hipoderme consiste principalmente de tecido conjuntivo frouxo, que forma camadas deslizantes de tecido adiposo que isolam e protegem a pele. O tecido é particularmente rico em proteoglicanos e glicosaminoglicanos e as células encontradas na hipoderme são denominadas fibroblastos, células adiposas e macrófagos que têm um papel particular na homeostase dos adipócitos na obesidade, possivelmente associados à remodelação tecidual (WONG et al., 2016).

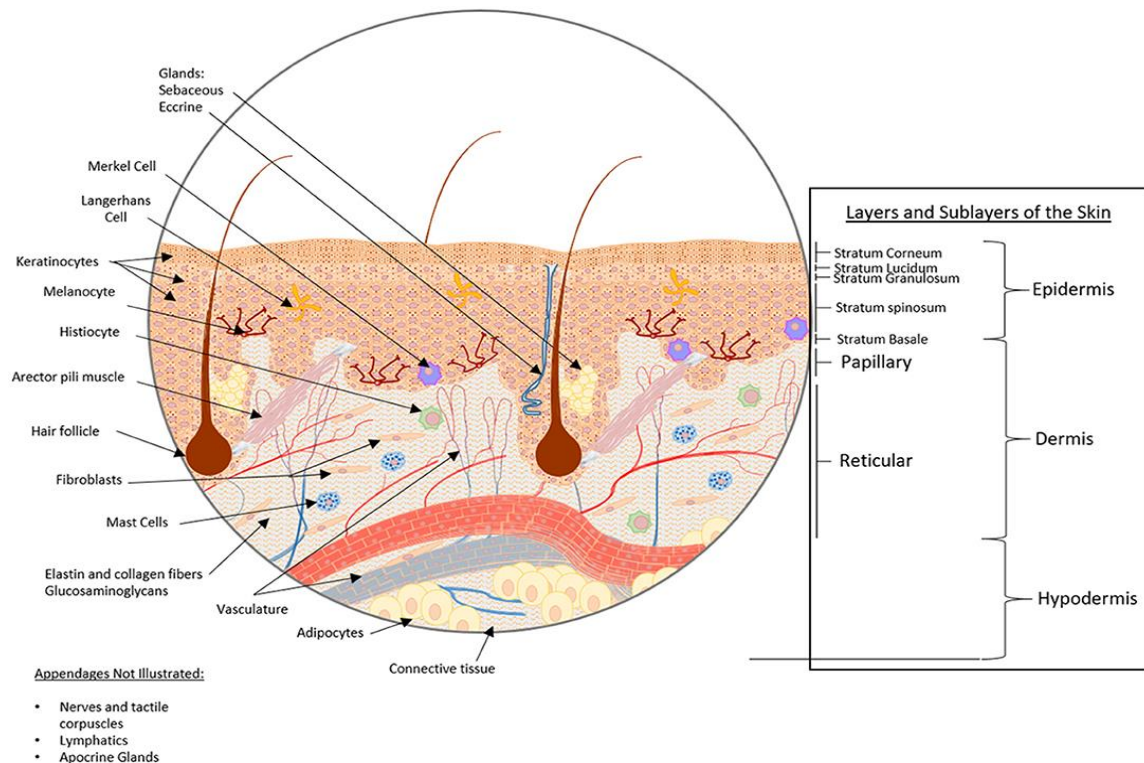


Figura 1. Estrutura da pele saudável: camadas, subcamadas e apêndices/macroestruturas (RANDALL et al., 2018).

A estrutura complexa da pele humana e suas características físico químicas a transformam na primeira linha de defesa externa, sendo eficaz contra fatores exógenos, como patógenos, luz ultravioleta (UV), produtos químicos e lesões mecânicas, auxiliando na manutenção da homeostase do corpo humano (BOER et al., 2016; GRAVITZ, 2018). No entanto, por atuar como função de barreira, a pele é exposta a diversas lesões e patologias que precisam de uma rápida regeneração.

1.2. FERIDAS E CICATRIZAÇÃO

Insultos furtivos à pele como as queimaduras, resultam em cicatrizes físicas e psicológicas ao longo da vida, causando dor, presente nas fases aguda e crônica do tratamento e influenciando a saúde mental, qualidade de vida, capacidade de retorno ao trabalho e consequente morbimortalidade (JESCHKE et al., 2020)

Os eventos celulares e bioquímicos que atuam no reparo de feridas podem ser divididos nas seguintes etapas: reação inflamatória, proliferação celular e síntese dos elementos que compõem a matriz extracelular e o período posterior, denominado remodelamento. Esses estágios não se excluem mutuamente, mas se sobrepõem ao longo do tempo (DE OLIVEIRA GONZALEZ et al., 2016).

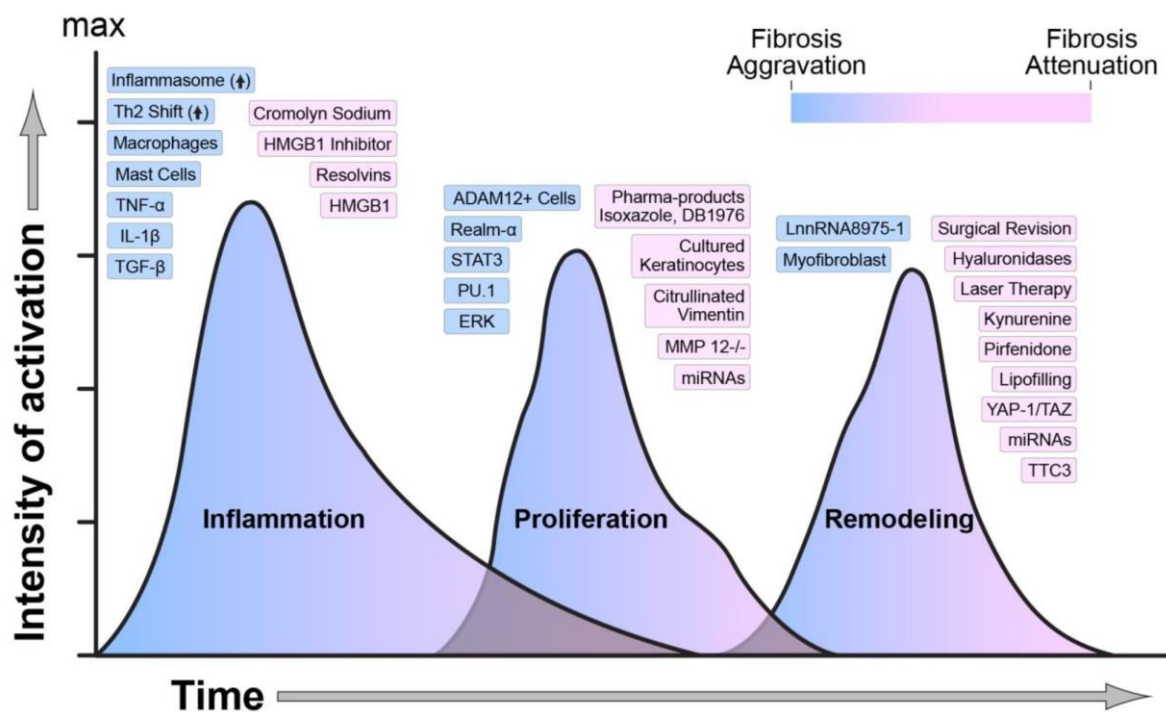


Figura 2. Reguladores da cicatrização e cicatrização. A ativação temporal, sobreposição e intensidade de ativação de cada fase da cicatrização de feridas são reguladas por vários fatores moleculares, biológicos e mecânicos. A figura indica como cada um desses fatores está modulando a cicatrização de feridas para um agravamento ou atenuação da fibrose. Azul indica ativação e rosa indica atenuação da fibrose (EL AYADI; JAY; PRASAI, 2020)

A fibrose é um processo natural para restaurar a função do tecido durante a cicatrização saudável de feridas. Quando patológica, a fibrose pode resultar em cicatrizes prejudiciais e tecido disfuncional. Em queimaduras, a resposta ao estresse hipermetabólico se manifesta como um aumento sustentado de citocinas inflamatórias que afetam a migração de células imunes, incluindo neutrófilos e macrófagos, atraídos para a área da ferida. O dano tecidual após a queimadura induz a ativação de várias

moléculas associadas ao dano (DAMPs) que sinalizam as células imunes para migrar para a ferida. A inflamação inicial ativa múltiplas populações de células na derme e epiderme para auxiliar na reepitelização e fechamento da ferida (EL AYADI; JAY; PRASAI, 2020).

Em casos onde ocorre a ruptura da pele de maneira ampla, o processo de cicatrização plena não ocorre sem tratamento com uso de subsídios como curativos, no qual a escolha do material decorre do conhecimento dos mecanismos de cicatrização e reparação tissular, considerando que as lesões a depender grau não reepitelizam e muitas vezes podem necessitar de enxertia de tecido (GUERRA et al., 2011; JESCHKE et al., 2020; SILVA et al., 2020).

Portanto, uma alternativa no tratamento destes casos é o enxerto autólogo de pele, entretanto, algumas vezes as lesões podem ser muito extensas e as áreas doadoras são insuficientes para a cobertura da área danificada, em outros casos, o leito das feridas pode apresentar má qualidade, prejudicando a integração da pele transplantada e acarretando a perda do enxerto (TAM et al., 2013; DEARMAN; BOYCE; GREENWOOD, 2021). Outra alternativa nestes casos pode ser o uso de um curativo substituto, de origem biológica ou sintética, que permita a oclusão temporária ou definitiva das feridas (HALIM; KHOO; YUSSOF, 2010).

Curativos comerciais, possuem ampla disponibilidade e variedade, porém tem limitações como perda por infecção e altos custos (DEARMAN; BOYCE; GREENWOOD, 2021). Somados a isso, os custos crescentes dos cuidados de saúde, o reconhecimento de ameaças de infecção difíceis de tratar, como biofilmes, e a ameaça contínua de diabetes e obesidade em todo o mundo tornam as feridas crônicas um desafio clínico, social e econômico substancial, que acarreta em grandes despesas geradas no tratamento de feridas cirúrgicas, úlceras diabéticas, e outras feridas ambulatoriais (SEN, 2019).

Uma opção menos onerosa é o uso de membranas amnióticas. Os curativos constituídos de âmion formam uma barreira protetora contra as bactérias ambientais, aceleram a reepitelização das lesões e diminuem a dor local por proteger as terminações nervosas e reduzir a inflamação local (FERREIRA et al., 2010).

1.3. MATRIZES BIOLÓGICAS UTILIZADAS COMO SCAFFOLD

1.3.1. Submucosa de intestino

Matrizes de tecido acelular, por exemplo, submucosa do intestino delgado (SIS)

tanto alogênicas quanto xenogênicas, podem manter a composição e a microestrutura histológica dos tecidos originais. A principal vantagem desses materiais é a disponibilidade de proteínas da matriz extracelular (MEC), como colágeno, elastina e laminina, e fatores de crescimento, que fornecem um microambiente tridimensional ideal para o crescimento e organização celular, aumentando a migração celular e diferenciação durante regeneração. De fato, a principal vantagem desses scaffolds consiste na possibilidade de reconstruir e reparar o tecido danificado, sinalizando as células hospedeiras para migrar, crescer e formar novos vasos e promover a diferenciação para criar remodelamento específico do tecido, fazendo com que seja uma matriz fortemente recomendada como um biomaterial biocompatível livre de células para o reparo de tecidos lesados ou reconstituição de um tecido *in vitro* (ZHENG et al., 2005; CASARIN et al., 2022).

1.3.2. Membrana amniótica

A membrana amniótica humana (hAM) é uma membrana fetal ligada ao córion formando o saco amniótico que, preenchido com líquido amniótico, protege o feto e confere um ambiente adequado para o seu desenvolvimento (SANDOVAL; ORTEGA; BALMELLI, 2022).

É uma membrana fina e semitransparente, formada por um tecido avascular na camada mais interna da membrana fetal. Anatomicamente, a membrana amniótica humana pode ser dividida em cinco camadas: epitélio, membrana basal acelular, camada compacta, camada fibroblástica e camada esponjosa (HAO et al., 2000).

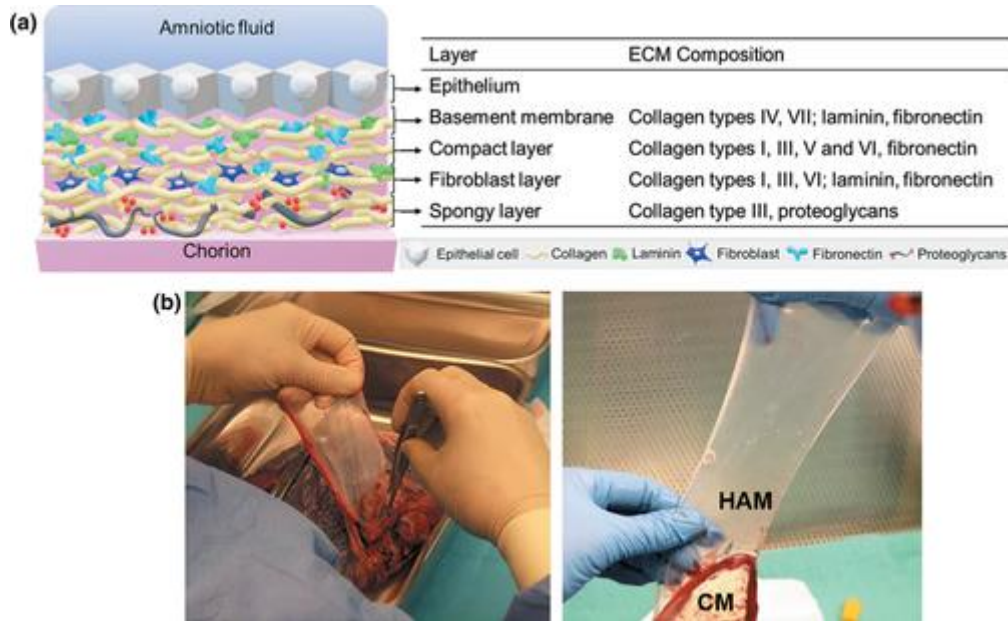


Figura 3. Membranas placentárias humanas: (a) Representação esquemática da estrutura da membrana amniótica humana (hAM) e a composição da matriz extracelular para cada camada. (b) Aparência geral das membranas fetais humanas (imagem à esquerda), a hAM é uma fina camada translúcida ligada à membrana coriônica (CM) (imagem à direita) (LEAL-MARIN et al., 2021).

Como curativo biológico temporário, a membrana amniótica parece ser eficaz no alívio da dor, na diminuição a taxa de infecção, aceleração da epitelização e facilita o manejo dos curativos na ferida, além de reduzir a perda de líquidos, proporcionando melhor controle de infecção e acelerando a cicatrização, contribuindo também na redução de cirurgias de revisão de cicatriz e melhorando as contraturas de enxertos de espessura parcial (RAZA et al., 2020). O aloenxerto a partir de membrana amniótica/coriônica humana desidratada (dHACM) contém células intactas, mas não viáveis e é conhecido por ter citocinas e quimiocinas que auxiliam na cicatrização de feridas, fornecendo um envoltório que fornece uma matriz para migração e proliferação de células (PUYANA et al., 2019).

A hAM provou também ser um excelente suporte/andaime para a engenharia de tecidos, devido à sua capacidade de permitir o transporte de água e a presença de fatores de crescimento, como o fator de crescimento epitelial, efeitos anti-inflamatórios devido à produção de fatores anti-inflamatórios como ácido hialurônico, supressão de citocinas pró-inflamatórias, propriedades antibacterianas devido a moléculas como a elafina, propriedades antifibróticas devido à regulação negativa do TGF- β e da expressão do seu receptor e baixa antigenicidade (LEAL-MARIN et al., 2021).

1.4. CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS

As células tronco mesenquimais (MSCs), são aquelas que possuem a capacidade de se dividir simetricamente ou assimetricamente, exibem diferenciação em várias linhagens e capacidade de organizar em agrupamentos multifuncionais (DING; SHYU; LIN, 2011; PITTENGER et al., 2019).

O termo “células-tronco mesenquimais” foi apresentado por Caplan em 1991, após seus estudos com pesquisa de medula óssea humana. Devido ao seu fácil isolamento, expansão e multipotencialidade, as MSCs foram rapidamente popularizadas como um agente terapêutico promissor para a medicina regenerativa, devido às excelentes propriedades como a possibilidade de extração a partir de diversos tecidos, incluindo medula óssea, tecido adiposo e derme, potencial de se diferenciarem em quase todas as células de linhagem em estágio final, para permitir sua semeadura em *scaffolds* específicos, além de suas propriedades imunológicas, incluindo capacidades anti inflamatórias, imunorreguladoras e imunossupressoras, contribuem para seu papel potencial como agentes imunotolerantes (HAN et al., 2019; JO et al., 2021).

A diferenciação das MSCs em linhagens pode ocorrer sob condições específicas *in vitro*, como adição de fatores de crescimento e reagentes de indução, ou através de microambiente construído com *scaffolds* de biomateriais no qual também se pode fornecer às condições adequadas de proliferação e diferenciação. No ambiente *in vivo* a diferenciação também é regulada por eventos moleculares, envolvendo a modulação de fatores de transcrição (DING; SHYU; LIN, 2011).

Outra propriedade trófica primária das MSCs é a secreção de fatores de crescimento e outras quimiocinas para induzir a proliferação celular e a angiogênese, o que pode auxiliar na regeneração de tecidos, promovendo cicatrização. As MSCs expressam proteínas mitogênicas, como fator de crescimento transformador alfa (TGF- α), TGF- β , fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento epitelial (EGF), fator de crescimento de fibroblastos básico (FGF-2) e fator de crescimento semelhante à insulina -1 (IGF-1) para aumentar a divisão de fibroblastos, células epiteliais e endoteliais. Os efeitos tróficos se estendem além da proliferação celular para a redução da formação de tecido cicatricial, quando as MSCs induzem células locais do tecido danificado a secretar fatores parácrinos, como o fator de

crescimento de queratinócitos (KFG-1), fator 1 derivado de células estromais (SDF-1) e proteína inflamatória 1 alfa e beta de macrófagos (MURPHY; MONCIVAIS; CAPLAN, 2013;JO et al., 2021).

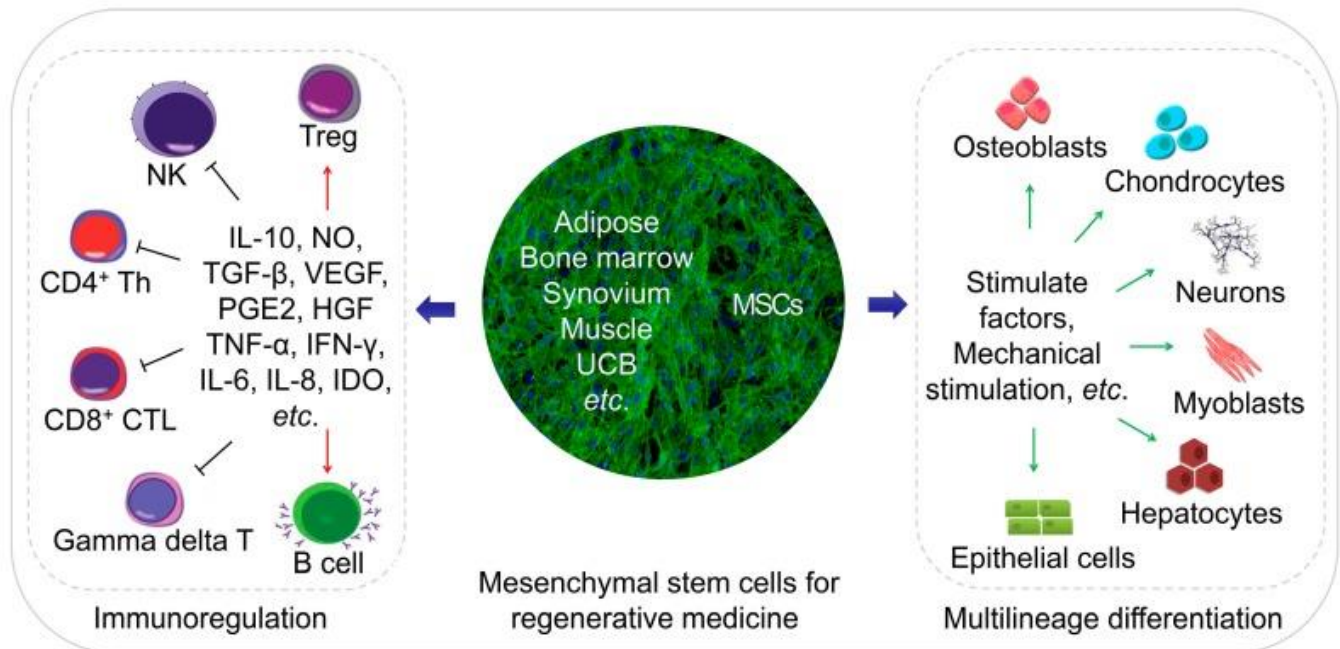


Figura 4. Diagrama esquemático da medicina regenerativa baseada em células-tronco mesenquimais (MSCs), suas fontes de extração, capacidade de diferenciação multilinhagem e as propriedades imunorreguladoras das MSCs as tornam uma ferramenta terapêutica celular ideal (HAN et al., 2019).

1.5. BIOENGENHARIA

A engenharia de tecidos combina células, andaimes e fatores de crescimento para regenerar tecidos ou substituir tecidos danificados ou doentes, enquanto a medicina regenerativa combina a engenharia de tecidos com outras estratégias, incluindo terapia baseada em células, terapia genética e imunomodulação, para induzir a regeneração de tecidos/órgãos *in vivo* (HAN et al., 2020).

A medicina regenerativa pode utilizar três estratégias para a produção de tecnologias: (1) terapias baseadas em células; (2) uso de materiais biológicos ou sintéticos para liderar processos de reparo e crescimento celular através do implante dos mesmos; (3) complexo de biomaterial semeado com células, implantado no corpo

para reparar e regenerar tecidos/órgãos (SAMPOGNA; GURAYA; FORGIONE, 2015).

O uso de células-tronco mesenquimais na engenharia de tecidos é uma modalidade de tratamento que visa aplicações em uma grande variedade de patologias. As vantagens desta abordagem incluem um reparo de alta qualidade com regeneração do tecido lesado, mas sem formação de tecido fibroso. A morbidade do local é mínima em comparação com a enxertos autólogos de osso e cartilagem por exemplo atualmente usados, pois um pequeno número de células é necessário com subsequente expansão *ex-vivo*, além disso, as MSCs possuem alto potencial de proliferação, podem ser manuseadas e manipuladas facilmente permitindo a diferenciação antes da implantação (POUNTOS et al., 2007).

Os biomateriais, representados por hidrogéis e scaffolds descelularizados, apresentam vantagens para terapias regenerativas, incluindo aumento da sobrevivência celular e retenção/enxerto celular no tecido hospedeiro, promoção de respostas de sinalização parácrinas protetoras por conter e liberar moléculas bioativas funcionais, tais como fatores angiogênicos, antiapoptóticos e/ou imunomoduladores e fornecendo suporte mecânico para os tecidos danificados. Biomateriais ideais na engenharia de tecidos são geralmente considerados como sendo produtos biocompatíveis, biodegradáveis, menos imunogênicos e biomiméticos que se assemelham às propriedades do tecido nativo alvo (HÄNEKE; SAHARA, 2022).

1.6. MÉTODOS ALTERNATIVOS

Alternativas aos testes em animais foram propostas para superar algumas das desvantagens associadas aos experimentos com animais e evitar os procedimentos antiéticos. Vários métodos têm sido sugeridos para evitar o uso de animais em experimentação. Esses métodos fornecem meios alternativos para o teste de drogas e produtos químicos, até alguns níveis. As vantagens associadas a estes métodos incluem, entre outras, eficiência de tempo, requer menos mão de obra e custo-benefício (SONALI; DHAWALE, 2015).

O desenvolvimento de um modelo de pele requer em primeiro lugar o isolamento e crescimento de fibroblastos dérmicos e queratinócitos epidérmicos de tecidos bióticos humanos. Um modelo equivalente de pele humana *in vitro* pode ser utilizado para avaliar a eficácia e o modo de ação de novos agentes, bem como

modelo de cicatrização de feridas (MERTSCHING et al., 2008).

Os substitutos alternativos formalmente validados, funcionam como substitutos para testes antes realizados exclusivamente em animais, como por exemplo o teste de Draize de coelho para verificar a corrosividade de compostos na pele. Como opções que substituem este teste, atualmente são liberados o uso de equivalentes epidérmicos humanos reconstruídos como EpiSkin™, EpiDerm™ e SkinEthic™ e para irritação da pele EpiSkin™, EpiDerm™ e SkinEthic™ são validados como substitutos de teste autônomos. Os dados desses testes raramente são considerados isoladamente e são avaliados em combinação com outros fatores para estabelecer o potencial geral de irritação ou corrosão de um ingrediente (HIBATALLAH et al., 2009).

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente, o uso de animais em pesquisa em todo mundo é baseado pelos princípios dos 3Rs (redução, refinamento e substituição), visando redução no número de animais utilizados, melhora na condução dos estudos minimizando o sofrimento o máximo possível, e a busca por métodos alternativos que substituam os testes *in vivo*. Esta teoria norteia pesquisadores a buscarem diminuir o número de animais utilizados e aprimorar as técnicas de modo a não repetir experimentos desnecessariamente, refazer procedimentos, além de buscar o modelo mais adequado para cada tipo de experimento, além de sempre que possível, substituir o uso de animais por um método alternativo disponível.

É crescente a necessidade de revisar o estado da arte de testes que atuem como ferramenta nas pesquisas de modelos dérmicos, visando minimizar o uso de animais. Ainda, existe a necessidade de inovação em opções de novos substitutos dérmicos que mimetizam a pele humana e possuam capacidade de reprodutibilidade, eficiência e potencial de manutenção tanto fisiológico quanto patológico. Importammentemente, que possam ser usados futuramente como terapias alternativas no tratamento de lesões. Portanto, este estudo tem como principal objetivo pesquisar e descrever os modelos vigentes de testes utilizados para pesquisas, envolvendo a pele, sem o uso de animais.

3. OBJETIVOS

Objetivo geral

Revisar o estado da arte do desenvolvimento de modelos que possam substituir o uso de animais para o estudo de aspectos fisiológicos e patológicos da pele humana.

Objetivos específicos

- Explorar como iniciaram os experimentos em modelos animais e os princípios de uso racional;
- Descrever as regulamentações envolvidas no uso de experimentos com animais no Brasil e em outros países;
- Realizar levantamento dos modelos substitutivos existentes, descrevendo seus usos, vantagens e limitações;
- Gerar linha do tempo com os modelos substitutivos envolvendo pele desde os primórdios até os desenvolvidos atualmente;
- Gerar Propriedade Intelectual (P.I.) com registro de modelo de pele.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo científico no formato “Short Communication” submetido na revista Archives of Toxicology.

Regras da revista: <https://www.springer.com/journal/204/submission-guidelines#Instructions%20for%20Authors>

Archives of Toxicology

Alternative in vitro models to reduce animal use: a crucial technological advance in dermatological sciences

–Manuscript Draft–

Manuscript Number:							
Full Title:	Alternative in vitro models to reduce animal use: a crucial technological advance in dermatological sciences						
Article Type:	Review						
Corresponding Author:	Marcia Rosângela Wink, PhD Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre Porto Alegre, Rio Grande do Sul BRAZIL						
Corresponding Author Secondary Information:							
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre						
Corresponding Author's Secondary Institution:							
First Author:	Luiza Pretto, MSc						
First Author Secondary Information:							
Order of Authors:	Luiza Pretto, MSc Thaís Casagrande Paim, MSc Carla Zanatelli Marcia Rosângela Wink, PhD						
Order of Authors Secondary Information:							
Funding Information:	<table border="1"> <tr> <td>Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS 07/2021 – PqG (21/2551-0001947-6).)</td> <td>Professor Marcia Rosângela Wink</td> </tr> <tr> <td>Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MS-SCTIE-Decit/CNPq nº 12/2018 (441575/2018-8))</td> <td>Professor Marcia Rosângela Wink</td> </tr> <tr> <td>Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MS-SCTIE-DECIT-DGITIS-CGCIS/CNPq nº 26/2020 (442586/2020-5))</td> <td>Professor Marcia Rosângela Wink</td> </tr> </table>	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS 07/2021 – PqG (21/2551-0001947-6).)	Professor Marcia Rosângela Wink	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MS-SCTIE-Decit/CNPq nº 12/2018 (441575/2018-8))	Professor Marcia Rosângela Wink	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MS-SCTIE-DECIT-DGITIS-CGCIS/CNPq nº 26/2020 (442586/2020-5))	Professor Marcia Rosângela Wink
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS 07/2021 – PqG (21/2551-0001947-6).)	Professor Marcia Rosângela Wink						
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MS-SCTIE-Decit/CNPq nº 12/2018 (441575/2018-8))	Professor Marcia Rosângela Wink						
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MS-SCTIE-DECIT-DGITIS-CGCIS/CNPq nº 26/2020 (442586/2020-5))	Professor Marcia Rosângela Wink						
Abstract:	Alternative models are tools to replace and reduce the number of animals used in the biomedical sciences, either for research or tests of industrial products. Over the years, several new alternative models have been developed in the most diverse fields. The objective of this viewpoint is to present the current alternative models available for dermatological sciences, evaluate their applications, and discuss their advantages and disadvantages, as well as the future perspectives for safe clinical translation. The implementation of alternative methods for animal testing has already made significant advances in the dermatological cosmetic industry, enabling to perform several chemical, molecular screening tests without the use of animals. However, in the dermatological sciences there are still many barriers regarding the results that these alternative methods provide, such as the different tissue microenvironments and also the understanding of the systemic metabolic responses. Therefore, it is expected that in the future new alternative technologies will be developed making possible the reduction of animal models and still providing reliable knowledge applicable to all scientific fields.						
Suggested Reviewers:	Silvia Engler, PhD Full Professor, USP: Universidade de São Paulo silvia@usp.br						

Alternative *in vitro* and *in silico* models to reduce animal use: a crucial technological advance in dermatological sciences

*Zanatelli, C.¹ *; Pretto, L.¹ *; Paim, T. C.¹; Wink, M¹.*

**These authors shared co-first authorship*

¹ Laboratório de Biologia Celular, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

Rua Sarmento Leite, 245, Prédio Principal, Sala 304,

Zip Code 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

Phone number: +55 51 33038762

@Corresponding author: Márcia Rosângela Wink, PhD

Email address: mwink@ufcspa.edu.br; marciawink@yahoo.com.br

Manuscript words: 2000 words (without abstract and references)

Figures: 2

Table: 1

Abstract

Alternative models are tools to replace and reduce the number of animals used in the biomedical sciences, either for research or tests of industrial products. Over the years, several new alternative models have been developed in the most diverse fields. The aim of this viewpoint is to present the current alternative models available for dermatological sciences, evaluate their applications, and discuss their advantages and disadvantages, as well as the future perspectives for safe clinical translation. The implementation of alternative methods for animal testing has already made significant advances in the dermatological cosmetic industry, enabling to perform several chemical, molecular screening tests without the use of animals. However, in the dermatological sciences there are still many barriers regarding the results that these alternative methods provide, such as the different tissue microenvironments and also the understanding of the systemic metabolic responses. Therefore, it is expected that in the future new alternative technologies will be developed making possible the reduction of animal models and still providing reliable knowledge applicable to all scientific fields.

Keywords: Animal testing; Alternative models; Dermatological tests.

To understand human physiology and pathology, the scientific community in its beginnings used dogs, chickens, rabbits, rodents, pigs, cows, sheep, and non-human primates (Franco 2013). It is indisputable that, for the time, the use of these animals was necessary and allowed the wide basic knowledge fundamental for the dissemination of several therapies that currently exist. Although, not only studies evoking treatments went ahead but also those that aimed to improve the ways of studying. In this scenario, after some time, alternative models were thought and many continue to be developed to reduce the use of animals, based on the concept of the "Three Rs" (replaced, reduced, refinement) created during the 1950s by Russel and Burch (Russell and Burch 1959; Sonali and Dhawale 2015).

Nevertheless, the use of these approaches does not fully replace animal use yet. Animal testing is still required when it comes to understanding systemic situations, once despite the existence of excellent alternative models, the interaction between physiological systems has not been fully replaced to understand the homeostasis of an organism (Françoise Barré-Sinoussi 2015). Examples of these situations are studies involving immunological diseases, sepsis and pharmacological action of drugs or chemical substances. In these cases, a scenario emerges that highlights the need to search for new methods that can reverse this situation, drawing attention to the bioethical issue. In addition, the United Nations (UN) established 17 Sustainable Development Goals (SDGs) in 2015, where the promotion of innovation is cited (SDG 9: build resilient infrastructures, promote inclusive and sustainable industrialization and foster innovation).

In this unfilled gap, is noticeably visible the emergence to promote more discussions to save animals. It is perceived that there is a worldwide concern, as

pharmaceutical companies have been developing cruelty-free products and a growing number of people have adhered to veganism (Wang, Zhao, and Song 2020). Furthermore, in a study addressing public opinion regarding animal use in medical training, Merkley *et al.* (2018) found that the majority of the interviewed agree that if effective alternative models exist to study a determined condition, they should be used instead of animals for medical training. A supermajority of these participants agreed that it is unethical or morally wrong to use animals for this reason when non-animal methods are available (Merkley, Pippin, and Joffe 2018).

Following this time frame, several movements around the world have gained strength to refine ethical issues. In our country, Brazil, a law was created in 2008 to manage animal use: the Arouca Law (11.794/2008). It establishes procedures for the scientific use of animals and creates the National Council for the Control of Animal Experiments (CONCEA), the highest Brazilian agency in the area. The CONCEA validates alternative methods for testing medicines, cosmetics, health products, among other substances, aiming to replace the use of animals in cosmetic tests. Moreover, each *in vivo* study needs to be approved by a local committee before starting. Not rare, the committee returns the study to the researcher for adjustments, aiming to minimize the animal number and suffering. Such as Brazil, other countries have their laws and guidelines with the same goal.

In attempting to avoid the use of animals, the regulations had a key role in stimulating the development of alternative models and improving those already existing. In this context, an area that has been greatly benefited is dermatological science. Considering that this field involves the testing of cosmetic substances, most of the alternative models were developed to attend to this need (Figure 1).

In the European Union (EU), animal tests for finished cosmetics were banned in 2004 and for cosmetic ingredients in 2009 ("Ban on Animal Testing" n.d.). In this context, the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCs) was created in the EU, as an independent committee of experts from different countries. One of its responsibilities is to establish guidelines for the cosmetics industries to develop studies for the safety evaluation of cosmetics, relevant toxicological tools for the safety evaluation of cosmetic ingredients as alternatives to animal testing, such as corrosivity and irritation, skin sensitization, dermal/percutaneous absorption, repeated dose toxicity, reproductive toxicity, mutagenicity/genotoxicity, carcinogenicity, toxicokinetics studies, photo-induced toxicity and human data (SCCS, 2021). The main challenge of overcoming *in vitro* results is to predict the real benefits of cosmetic products in contact with all the systems that involve the human body as a whole (Eberlin *et al.* 2020).

The alternative methods to dermal research have their own advantages and disadvantages (Table 1). A common feature among them is the use as proof of concept, where a large funnel is generated, and only substances and/or therapies with pharmacological activity or those that have a biological potential will proceed to animal testing ("Animal Models in Translational Medicine: Validation and Prediction" 2014). The majority of these alternative methods are cell-based *in vitro* models.

The two-dimensional (2D) models are the most commonly used. In adherent 2D cultures, cells grow as an attached monolayer and the advantages of these cultures are associated with simple and cost-effective maintenance. Unfortunately, adherent cultures have disadvantages, as the cultured cells do not mimic the natural tissue structures and after tissue isolation in the 2D conditions, the morphology of the cells is altered as well as the mode of cell division (Kapałczyńska *et al.* 2018). Three-dimensional engineered models that mimic skin tissue have been developed to improve the limitations of predictivity of the 2D *in vitro* models (Verneti *et al.*, 2017).

The interactions between different cell types of tumor and stroma are difficult to model in 2D, thus, to better mimic the *in vivo* situation, different 3D-cell culture approaches with several degrees of complexity have been developed. Spheroids have formats that are very useful for basic and applied melanoma research, track cellular behavior in a cell-type specific manner and recapitulate different characteristics of early melanoma stages. They can be used to evaluate novel drugs and combination therapies. (Vörsmann et al. 2013).

Techniques for developing 3D skin models demand a high level of innovation and complexity through cell cultures (Moraes et al. 2020). One of the main goals is the development of skin equivalents *in vitro* for dermal toxicity evaluation (do Nascimento Pedrosa et al. 2021). The simplest 3D model is known as reconstructed human epidermis (RHE) and contains an epidermal layer of skin composed only of keratinocytes. EpiSkin™, Epiderm™, SkinEthic™, epiCS™, and LabCyte EPI-MODEL24 are commercially available models of RHE approved by ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) to replace *in vivo* rabbit skin irritation tests and for skin corrosion tests of cosmetic ingredients, more recently were also validated Skin+ and KeraSkin™ as irritation tests (OECD 2021, 2019). KeratinoSens™ and LuSens are models constructed with immortalized HaCaT stably transfected with a selectable plasmid, which are used in Skin sensitization tests also approved by ECVAM (OECD 2022). Other alternative methods, although not yet validated, are being developed.

The Full-Thickness Skin Models or human skin equivalents (HSE) are models more complex, which consist of an epidermis and dermis (keratinocytes and fibroblasts) and have been used to evaluate drug or treatments efficacy (Bataillon et al. 2019; Mathes, Ruffner, and Graf-Hausner 2014). Recently, 3-D vascularized human skin equivalents (vHSEs) that can mimic native skin have been developed (Rimal et al. 2021; “JoVE Video Dataset” 2021). In this way, the electrospinning technique has been used to form polymeric mats that, together with porous structures, allow the seeding of cells such as keratinocytes and fibroblasts, to produce an equivalent skin (Camarena et al. 2020).

3D bioprinting is another important tool for dermal toxicity evaluation, it is used to extrude materials and develop scaffolds to target tissues in the required structure (Javaid and Haleem 2021). They enable the accurate construction based on biomolecules, synthetic/natural hydrogels, and cells (Fayyazbakhsh 2020; Manita et al. 2021). Different bioprinting methods have been used to fabricate skin tissue models such as extrusion-based, laser-assisted, and microvalve-based bioprinting (Ng and Yeong 2019). Authenticity, scalability, and reproducibility of the tissues are the main advantages of bioprinted skin, when compared to conventional constructs, (Millás et al. 2019). 3D skin bioprinting has the potential to be applied in penetration and absorption tests of cosmetic ingredients, however there are challenges to overcome such as producing sensitive, dry, oily skin with different textures, pigmented with different shades, and that contain appendages, hair follicles, hypodermic layer, microvessels and immune cells (Millás et al. 2019; Olejnik et al. 2022). It is a research target of global cosmetic leaders that still requires standardization and regulatory approvals (Yan et al. 2018).

Limitations on traditional 2D cultures and 3D organ models have stimulated in the last decade the use of technologies such as microfabrication. In this context, Organs-on-chips have been developed. They consist of complex tissue-like structures within the microfluidic chips that allow the dynamic culture of cells inside, in order to model or mimic the physiology of a tissue or organ. Skin-on-a-chip (SoC) has made

considerable advances in the transport of substances or delivery and microfluidics maintain the high throughput capacity of the systems, while reducing costs and reagent volumes needed for the experiments (Zhang et al. 2018; Risueño et al. 2021). They are suitable for drug testing on a specific cell type to evaluate their response, biocompatibility, or toxicity in a cell monolayer, which is easier to obtain than a 3D equivalent. Additionally, skin-on-chip is the best platform to study cell–cell interactions, expose cells to mechanical strains, or even study immune response (Zoio and Oliva 2022).

The computational models generated from bioinformatics tools are emerging as a new opportunity to reduce not only the use of animal models, but also the volume of *in vitro* experiments. Utilizing bioinformatics, we can analyze data from human cell cultures exposed to different toxicants (Grafström et al. 2015). Dermatology was one of the first medical disciplines to welcome and support bioinformatics results, the name “skinomics” has been proposed to designate specifically the bioinformatics studies in dermatology and skin biology. Their objective are to provide knowledge of skin biology, improve the function of the healthy skin, besides assist in treating pathological skin conditions through *in silico* experiments, where computer simulations using databases allows that an organic phenomenon can be modeled (Younis et al. 2016; Gunia-Krzyżak et al. 2016). *In silico* models make predictions concerning absorption, distribution, metabolism, and excretion of a chemical from molecular data (Madden et al. 2020). The new possibilities and results that will be generated by this new area are promising and exciting (Selvestrel et al. 2022)

More recently, researchers are exploring the uses of artificial intelligence (AI), to improve or supplement current screening processes in melanoma and nonmelanoma skin cancer (De et al. 2020), this methods can be explored in future for use as strategy alternative to animal research.

The alternative models cited are a very important strategy to mimic biological systems and minimize the use of animals. A number of models and techniques, as mentioned, have been developed for different purposes (Figure 2). As an excellent option for the use of scientific experimentation and initial therapies, a culture of two-dimensional monolayer methods among all the aforementioned is a technique that stands apart as a unique tool in clinical practice, due to its proven ability in simulating more complex systems. Other alternative models have limitations such as costs, time and scale of production, regulatory and intellectual property issues, but have a promissor potential to replace the use of animals in dermatological tests.

These methods still need to be more widespread, regarding their existence, possibilities of use, means of realization and costs involved in their use. It is notable that more developed countries are already ahead in the use of these methodologies. However, these innovative solutions must reach all countries, enabling them to refine and rethink the use of animals in dermal pharmacology and toxicology research and progressively in other fields.

Taken altogether we can conclude that there is no unique methodology capable of replacing *in vivo* experiments. It is necessary that each researcher evaluate the scientific question that should be addressed and then, select and develop the best *in silico*, *in vitro* protocols or their combination. After that, the questions that still remain to be answered at the systemic level as for example, modulation of the immune system, pharmacokinetics and pharmacodynamics, chronic toxicity, and so forth will still need *in vivo* experimentation, until new possibilities and technologies arise in science.

Acknowledgements

Thaís Casagrande Paim is supported by a CAPES PhD fellowship. M.R.W. is recipient of level 1 productivity research fellowships from CNPq. This study was supported by FAPERGS 07/2021 – PqG (21/2551-0001947-6); CNPq MS-SCTIE-Decit/CNPq nº 12/2018 (441575/2018-8) and MS-SCTIE-DECIT-DGITIS-CGCIS/CNPq nº 26/2020 (442586/2020-5).

References

- Bataillon, M., Lelièvre, D., Chapuis, A. et al. (2019). Characterization of a New Reconstructed Full Thickness Skin Model, T-Skin™, and its Application for Investigations of Anti-Aging Compounds. *Int J Mol Sci* 20, 2240. doi: 10.3390/ijms20092240.
- Beuren, A. G., Paim, É. D., Flores, N. da S. et al. (2023). Preventive measures for the progression of dysphagia in patients with cancer of head and neck subjected to radiotherapy: a systematic review with meta-analysis. *Codas* 35, e20210246. doi: 10.1590/2317-1782/20232021246en.
- Ban on animal testing. Available at: https://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics/ban-animal-testing_pt [Accessed December 9, 2021].
- Camarena, D. E. M., Matsuyama, L. S. A. S., Maria-Engler, S. S. et al. (2020). Development of Epidermal Equivalent from Electrospun Synthetic Polymers for In Vitro Irritation/Corrosion Testing. *Nanomaterials* 10, 2528. doi: 10.3390/nano10122528.
- De, A., Sarda, A., Gupta, S. et al. (2020). Use of Artificial Intelligence in Dermatology. *Indian J Dermatol* 65, 352-357. doi: 10.4103/ijd.IJD_418_20.
- Denayer, T., Stöhr, T. and Van Roy, M. (2014). Animal models in translational medicine: Validation and prediction. *New Horizons in Translational Medicine* 2, 5-11. doi: 10.1016/j.nhtm.2014.08.001.
- Fayyazbakhsh, F. (2020). A Brief Review on 3D Bioprinted Skin Substitutes. *Procedia Manufacturing* 48, 790-796. doi: 10.1016/j.promfg.2020.05.115.
- Françoise Barré-Sinoussi, X. M. (2015). Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. *Future Science OA* 1, FSO63. doi: 10.4155/fso.15.63.
- Franco, N. H. (2013). Animal Experiments in Biomedical Research: A Historical Perspective. *Animals: an Open Access Journal from MDPI* 3, 238-273. doi: 10.3390/ani3010238.
- Grafström, R. C., Nymark, P., Hongisto, V. et al. (2015). Toward the Replacement of Animal Experiments through the Bioinformatics-driven Analysis of “Omics” Data from Human Cell Cultures. *Altern Lab Anim* 43, 325-332. doi: 10.1177/026119291504300506.

Gunia-Krzyżak, A., Popiol, J. and Marona, H. (2016). Melanogenesis Inhibitors: Strategies for Searching for and Evaluation of Active Compounds. *Curr Med Chem* 23, 3548-3574. doi: 10.2174/0929867323666160627094938.

Javaid, M. and Haleem, A. (2021). 3D bioprinting applications for the printing of skin: A brief study. *Sensors International* 2, 100123. doi: 10.1016/j.sintl.2021.100123.

JoVE. Video Dataset. Available at: <https://www.jove.com/v/62125/generation-of-self-assembled-vascularized-human-skin-equivalents> [Accessed December 15, 2021]. doi:10.3791/62125-v.

Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W. et al. (2018). 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci* 14, 910-919. doi: 10.5114/aoms.2016.63743.

Madden, J. C., Enoch, S. J., Paini, A. et al. (2020). A Review of In Silico Tools as Alternatives to Animal Testing: Principles, Resources and Applications. *Alternatives to Laboratory Animals* 48, 146-172. doi: 10.1177/0261192920965977.

Manita, P. G., Garcia-Orue, I., Santos-Vizcaino, E. et al. (2021). 3D Bioprinting of Functional Skin Substitutes: From Current Achievements to Future Goals. *Pharmaceuticals* 14, 362. doi: 10.3390/ph14040362.

Mathes, S. H., Ruffner, H. and Graf-Hausner, U. (2014). The use of skin models in drug development. *Adv Drug Deliv Rev* 69-70, 81-102. doi: 10.1016/j.addr.2013.12.006.

Merkley, R., Pippin, J. J. and Joffe, A. R. (2018). A survey to understand public opinion regarding animal use in medical training. *Altern Lab Anim* 46, 133-143. doi: 10.1177/026119291804600308.

Millás, A., Lago, J., Vasquez-Pinto, L. et al. (2019). Approaches to the development of 3d bioprinted skin models: the case of natura cosmetics. *International Journal of Advances in Medical Biotechnology - IJAMB* 2, 03. doi: 10.25061/2595-3931/ijamb/2019.v2i1.24.

Moraes, G. de S., Wink, M. R., Klamt, F. et al. (2020). Simplified low-cost methodology to establish, histologically process and analyze three-dimensional cancer cell spheroid arrays. *Eur J Cell Biol* 99, 151095. doi: 10.1016/j.ejcb.2020.151095.

do Nascimento Pedrosa, T., Catarino, C. M., Pennacchi, P. C. et al. (2021). Skin Equivalent Models: Protocols for In Vitro Reconstruction for Dermal Toxicity Evaluation. *Methods Mol Biol* 2240, 31-41. doi: 10.1007/978-1-0716-1091-6_3.

Ng, W. L. and Yeong, W. Y. (2019). The future of skin toxicology testing - Three-dimensional bioprinting meets microfluidics. *Int J Bioprint* 5, 237. doi: 10.18063/ijb.v5i2.1.237.

OECD (2019). *Test No. 431: In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) Test Method*. doi: 10.1787/9789264264618-en.

OECD (2021). *Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method*. doi: 10.1787/9789264242845-en.

OECD (2022). *Test No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation*. doi: 10.1787/9789264229822-en.

Olejnik, A., Semba, J. A., Kulpa, A. et al. (2022). 3D Bioprinting in Skin Related Research: Recent Achievements and Application Perspectives. *ACS Synth Biol* 11, 26-38. doi: 10.1021/acssynbio.1c00547.

Rimal, R., Marquardt, Y., Nevolianis, T. et al. (2021). Dynamic flow enables long-term maintenance of 3-D vascularized human skin models. *Applied Materials Today* 25, 101213. doi: 10.1016/j.apmt.2021.101213.

Risueño, I., Valencia, L., Jorcano, J. L. et al. (2021). Skin-on-a-chip models: General overview and future perspectives. *APL Bioengineering* 5, 030901. doi: 10.1063/5.0046376.

Russell, W. M. S. and Burch, R. L. (1) (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*. Vol. 1. St Albans: Univ Federation for Animal Welfare.

Selvestrel, G., Robino, F. and Russo, M. Z. (2022). In Silico Models for Skin Sensitization and Irritation. *Methods Mol Biol* 2425, 291-354. doi: 10.1007/978-1-0716-1960-5_13.

Sonali, D. K. and Dhawale, S. C. (2015). Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal* 23, 223-229. doi: 10.1016/j.jsps.2013.11.002.

Vörsmann, H., Groeber, F., Walles, H. et al. (2013). Development of a human three-dimensional organotypic skin-melanoma spheroid model for in vitro drug testing. *Cell Death Dis* 4, e719. doi: 10.1038/cddis.2013.249.

Wang, Y., Zhao, Y. and Song, F. (2020). The Ethical Issues of Animal Testing in Cosmetics Industry. *Science Publishing Group* 8, 112-116. doi: 10.11648/j.hss.20200804.12.

Yan, W.C., Davoodi, P., Vijayavenkataraman, S. et al. (2018). 3D bioprinting of skin tissue: From pre-processing to final product evaluation. *Adv Drug Deliv Rev* 132, 270-295. doi: 10.1016/j.addr.2018.07.016.

Younis, S., Shnayder, V. and Blumenberg, M. (2016). Application of Bioinformatics Methodologies in the Fields of Skin Biology and Dermatology. Bioinformatics - Updated Features and Applications. InTech. doi: 10.5772/63799.

Zhang, Q., Sito, L., Mao, M. et al. (2018). Current advances in skin-on-a-chip models for drug testing. *Microphysiological systems* 2, 4. doi: 10.21037/mps.2018.08.01.

Zoio, P. and Oliva, A. (2022). Skin-on-a-Chip Technology: Microengineering Physiologically Relevant In Vitro Skin Models. *Pharmaceutics* 14, 682. doi: 10.3390/pharmaceutics14030682.

Subtitles

Figure 1 - Timeline showing the emergence of alternative methods. Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com).

Figure 2 -Alternative methods and their correlation with different biological purposes.

Table 1 - Alternative methods and their correlation with different biological purposes. Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com).

FIGURE 1

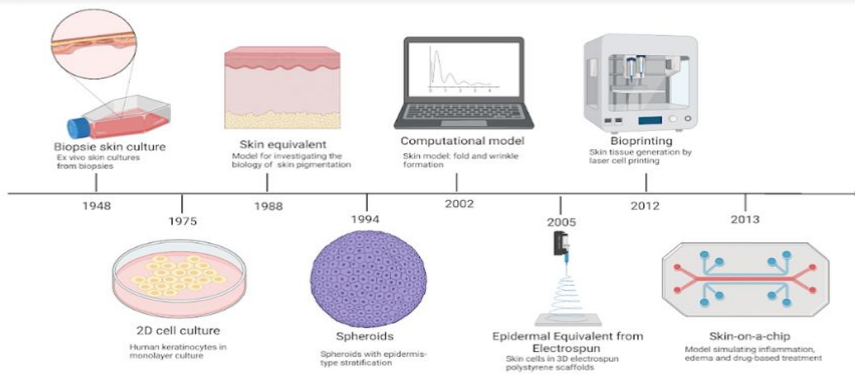


FIGURE 2

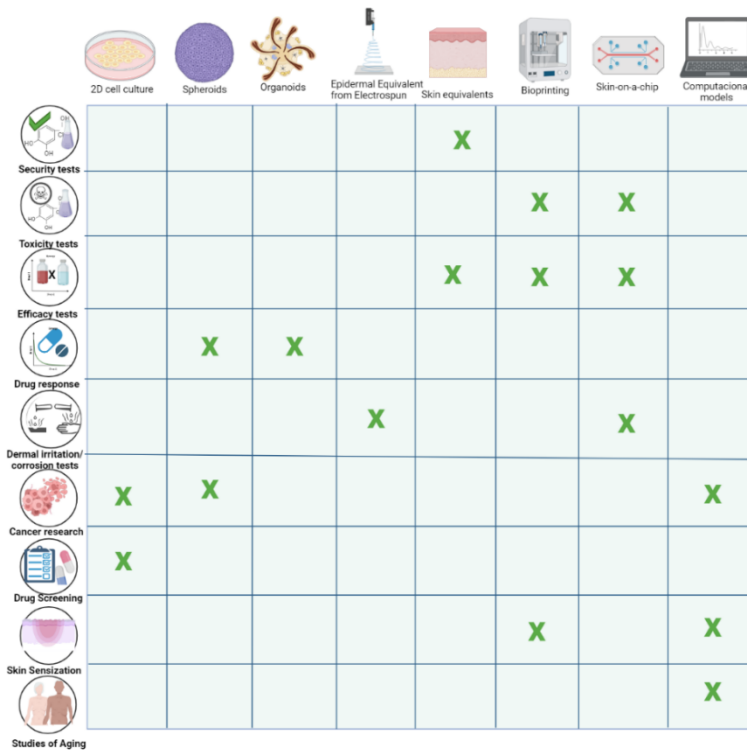


TABLE 1

Model	Composition	Application	Advantages	Disadvantages	Reference
Two-dimensional (2D) monolayer culture	Cells cultured in the plastic surface	Cancer biology Drug screening	Cost Straightforward to maintain	Cytoskeleton alteration and abnormality in cellular functions such as metabolism and protein expression No represent cell-to-cell or cell-to-extracellular matrix interactions Predictivity	<u>(Kamatar, Gunay, and Acar 2020)</u>
Human Skin Equivalent s (HSEs) <i>or</i> Human Epidermal Equivalent s (HEEs)	Three-dimensional model used one or more types cells	Chemical assessments in terms of efficacy and safety	Evaluation of compounds after topic exposure Authenticity Scalability and reproducibility of tissues compared to conventional constructs	Altered <i>in vitro</i> morphogenesis Limitation of primary tissue source when used primary cultures of cells	<u>(Millás et al. 2019)</u>

Spheroids	Single cell lineage or multiple cell types agglomerated and arranged as spheres - epithelial only 3D cultures	Drug response measurements Cancer research (because of the resemblance to non-vascularized tumor nodules)	Self-organization capacity Deposit extracellular matrix Formation of specific microenvironment	Susceptible to central necrosis	<u>(Sakalem et al. 2021)</u>
Organoids	Cultures containing multiple cell types, and must include epithelial- and mesenchymal-originated cells	Drug response measurements	Organotypic phenotype Self-renewal Survival at long-term	Low control over cell architecture Slow production Small to mimic micro-environmental tissue conditions	<u>(Low et al. 2021; Hagenbuchner, Nothdurfter, and Ausserlechner 2021; Sakalem et al. 2021)</u>
Computational models	numerical model or microarrays	Studies of Aging Cancer research Skin sensitization	Producing predictions quickly Methods cost-effective Do not require materials for testing Simulating different environments/ scenarios	significant error rates and outcomes can vary considerably Not regulated to use as the unique test Investigators' biases	<u>(Magenat-Thalman et al. 2002)</u> <u>(Wilm, Kühnl, and Kirchmair 2018)</u>

<p>Epidermal Equivalent from Electrospun Synthetic Polymers</p>	<p>Nylon and primary cells cultured</p>	<p>Platform to assess the potential of dermal irritation/corrosion of chemical products</p>	<p>Convenient process ability and handling Longer shelf-life Facile production Low cost (model based on collagen's exemption)</p>	<p>More chemical substances must be tested Model limited in mimicking authentic skin due to the lack of appendages</p>	<p><u>(Camarena et al. 2020)</u></p>
<p>3D bioprinting</p>	<p>Cells encapsulated in 3D spheroids made of bio-matrices</p>	<p>Drug efficacy Drug toxicity</p>	<p>Bioprinted tissue can be constructed entirely from human cells, preventing inter-species related biases</p>	<p>Fabrication of a vascular network is limited</p>	<p><u>(Hagenbuchner, Nothdurfter, and Ausserlechner 2021)</u></p>

Skin-on-chip (SoC)	Bioengineered microdevices with multiple relevant cell types, perfusion and/or biomechanical factors	Toxicity, corrosion, irritation, Sensitization assessment Efficacy of new compounds and therapeutics	High control over cell architecture	Cost Slow production	<u>(Hardwick et al. 2020)</u>
---------------------------	--	--	-------------------------------------	-----------------------------	-------------------------------

5. PROPRIEDADE INTELECTUAL

Omitida até depósito patentário.

“DESENVOLVIMENTO DE CURATIVO CUTÂNEO PRODUZIDO A PARTIR DE MEMBRANA AMNIÓTICA E CÉLULAS ISOLADAS DE PELE DE DESCARTE HOSPITALAR”.

Resumo: A elevada disponibilidade da Membrana amniótica (MA), facilidade de aceitação da doação pelas gestantes e baixo custo de manipulação, tem despertado o interesse na utilização estendida deste importante recurso biológico. A MA, além de promover a reepitelização do leito da ferida, aliviar a dor e prevenir infecção, é um tecido de fácil obtenção e manuseio, elevada disponibilidade, baixo custo para processamento e disponibilização. Ainda, pode reduzir a frequência de trocas de curativos, bem como impactar na redução do tempo de internação hospitalar. Assim, com os descartes produzidos em cirurgias de abdominoplastia, possuem elevada disponibilidade e seu uso além de possibilitar o isolamento de diversas células, também reduz a quantidade de descarte de resíduo gerado.

O Brasil ainda não possui regulamentação que permita a distribuição pelos Bancos de Tecidos da MA humana para utilização em tratamentos via Ministério da Saúde, bem como ainda não existem substitutos dérmicos biológicos aprovados e produzidos no Brasil, o que ainda gera necessidade de importação e custos. Assim sendo, a utilização de membrana amniótica captada no país como um curativo biológico, ainda carece de regularização para uso na clínica além da utilização via liberação através de comitês de ética, assim como, a aplicação clínica de células-tronco mesenquimais alogênicas ainda não teve sua segurança biológica validada para aplicação, impedindo, desta forma, a sua utilização até então.

Considerando todas as vantagens enumeradas acima, fica evidente a importância do desenvolvimento de substitutos dérmicos visto a necessidade de terapias alternativas que viabilizem solucionar o baixo número de doações, além de possibilitar também uma melhor resposta clínica dos pacientes bem como uma redução dos custos de internação hospitalar de pacientes queimados e politraumatizados. Dessa forma, os dados gerados nesse estudo tiveram por objetivo embasar o uso da membrana amniótica na prática clínica com base em resultados obtidos em ensaios

in vitro, garantindo a segurança biológica deste biomaterial.

6. CONCLUSÃO

Os modelos alternativos dermatológicos demonstram uma substancial evolução, para substituir e reduzir o número de animais necessários para avaliar produtos químicos e de saúde para a indústria.

Os avanços já alcançados possibilitam o refinamento amplo do cálculo amostral no uso de animais nos testes, e ampliam os horizontes também referentes a descoberta de novos fármacos que venham a se utilizar de modelos dérmicos bioquimicamente relevantes, no qual dentro das fases *in vitro*, *in vivo* e ensaios clínicos, a segunda fase seria impactada de maneira positiva com a combinação de modelos alternativos que venham a colaborar com seus resultados que podem servir de guia nas fases a seguir, além de nortear futuros avanços e lacunas que precisam ser preenchidas. Entretanto, ainda são necessários maiores aperfeiçoamentos desses modelos, que permitam maior convergência entre os sistemas biológicos além de compreensão de aspectos clínicos e aplicados a patologias dermatológicas, bem como o acesso a essas metodologias que permitam ser aplicadas com menor custo e de maneira mais acessível em países fora do primeiro mundo.

Portanto, dentre os modelos avaliados, não há um método isolado que possa ser utilizado para excluir por completo os experimentos *in vivo*, sendo, portanto, necessária a avaliação dos protocolos regulatórios existentes e desenvolvimento de protocolos *in silico*, *in vitro* ou sua combinação, até que novas possibilidades sejam descritas e estejam à disposição do mercado científico.

7. PERSPECTIVAS

- Geração de depósito de patente referente ao projeto “DESENVOLVIMENTO DE CURATIVO CUTÂNEO PRODUZIDO A PARTIR DE MEMBRANA AMNIÓTICA E CÉLULAS ISOLADAS DE PELE DE DESCARTE HOSPITALAR”;
- Revisão e publicação do artigo científico submetido para a revista Archives of Toxicology em 30 de agosto de 2022.

REFERÊNCIAS

- BOER, M. et al. Structural and Biophysical Characteristics of Human Skin in Maintaining Proper Epidermal Barrier Function. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii*, v. 33, n. 1, p. 1, fev. 2016. . Acesso em: 28 out. 2022.
- CASARIN, M. et al. Porcine Small Intestinal Submucosa (SIS) as a Suitable Scaffold for the Creation of a Tissue-Engineered Urinary Conduit: Decellularization, Biomechanical and Biocompatibility Characterization Using New Approaches. *International journal of molecular sciences*, v. 23, n. 5, p. 2826, 4 mar. 2022. Acesso em: 19 nov. 2022.
- DEARMAN, B. L.; BOYCE, S. T.; GREENWOOD, J. E. Advances in Skin Tissue Bioengineering and the Challenges of Clinical Translation. *Frontiers in Surgery*, v. 0, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fsurg.2021.640879>>. Acesso em: 4 nov. 2022.
- DE OLIVEIRA GONZALEZ, A. C. et al. Wound Healing - A Literature Review. *Anais brasileiros de dermatologia*, v. 91, n. 5, p. 614, 2016. . Acesso em: 4 nov. 2022.
- DING, D. C.; SHYU, W. C.; LIN, S. Z. Mesenchymal stem cells. *Cell transplantation*, v. 20, n. 1, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21396235/>>. Acesso em: 28 out. 2022.
- EL AYADI, A.; JAY, J. W.; PRASAI, A. Current Approaches Targeting the Wound Healing Phases to Attenuate Fibrosis and Scarring. *International journal of molecular sciences*, v. 21, n. 3, p. 1105, 7 fev. 2020. . Acesso em: 3 nov. 2022.
- FERREIRA, A. O. P. et al. Estabelecimento de protocolo de glicerolização de membranas amnióticas para uso como curativo biológico. *Revista Brasileira de Queimaduras*, v. 9, n. 1, p. 2–6, 2010. . Acesso em: 4 nov. 2022.
- GRAVITZ, L. *Skin*. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/d41586-018-07428-4>>. Acesso em: 28 out. 2022.
- GUERRA, A. C. P. C. da S. et al. Queimadura com exposição óssea dos membros inferiores: reconstrução com matriz de regeneração dérmica. *Revista brasileira de cirurgia*, v. 26, n. 1, p. 174–180, mar. 2011. . Acesso em: 21 nov. 2022.
- HALIM, A. S.; KHOO, T. L.; YUSSOF, S. J. M. Biologic and Synthetic Skin Substitutes: An Overview. *Indian journal of plastic surgery: official publication of the Association of Plastic Surgeons of India*, v. 43, n. Suppl, p. S23, set. 2010. Acesso em: 4 nov. 2022.
- HÄNEKE, T.; SAHARA, M. Progress in Bioengineering Strategies for Heart Regenerative Medicine. *International journal of molecular sciences*, v. 23, n. 7, p. 3482, 23 mar. 2022. Acesso em: 3 nov. 2022.
- HAN, F. et al. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Achievements,

- Future, and Sustainability in Asia. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 0, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2020.00083>>. Acesso em: 3 nov. 2022.
- HAN, Y. et al. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. *Cells*, v. 8, n. 8, p. 886, 13 ago. 2019. . Acesso em: 3 nov. 2022.
- HAO, Y. et al. Identification of Antiangiogenic and Antiinflammatory Proteins in Human Amniotic Membrane. *Cornea*, v. 19, n. 3, p. 348, maio 2000. . Acesso em: 3 nov. 2022.
- HIBATALLAH, J. et al. A tiered approach to the use of alternatives to animal testing for the safety assessment of cosmetics: eye irritation. *Regulatory toxicology and pharmacology: RTP*, v. 54, n. 2, jul. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19393279/>>. Acesso em: 4 nov. 2022.
- JESCHKE, M. G. et al. Burn Injury. *Nature Reviews. Disease Primers*, v. 6, n. 1, 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7224101/>>. Acesso em: 4 nov. 2022.
- JO, H. et al. Applications of Mesenchymal Stem Cells in Skin Regeneration and Rejuvenation. *International journal of molecular sciences*, v. 22, n. 5, mar. 2021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7957487/>>. Acesso em: 28 out. 2022.
- LEAL-MARIN, S. et al. Human Amniotic Membrane: A review on tissue engineering, application, and storage. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, v. 109, n. 8, ago. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33319484/>>. Acesso em: 3 nov. 2022.
- MERTSCHING, H. et al. Human Skin Equivalent as an Alternative to Animal Testing. *GMS Krankenhaushygiene interdisziplinär*, v. 3, n. 1, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2831516/>>. Acesso em: 4 nov. 2022.
- MURPHY, M. B.; MONCIVAIS, K.; CAPLAN, A. I. Mesenchymal Stem Cells: Environmentally Responsive Therapeutics for Regenerative Medicine. *Experimental & molecular medicine*, v. 45, n. 11, p. e54–e54, 15 nov. 2013. . Acesso em: 28 out. 2022.
- PIIPPONEN, M.; LI, D.; LANDÉN, N. X. The Immune Functions of Keratinocytes in Skin Wound Healing. *International journal of molecular sciences*, v. 21, n. 22, nov. 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7699912/>>. Acesso em: 28 out. 2022.
- PITTENGER, M. F. et al. Mesenchymal Stem Cell Perspective: Cell Biology to Clinical Progress. *npj Regenerative Medicine*, v. 4, n. 1, p. 1–15, 2 dez. 2019. . Acesso em: 3 nov. 2022.
- POUNTOS, I. et al. Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application. *Injury*, v. 38 Suppl 4, set. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18224734/>>. Acesso em: 3 nov. 2022.

- PUYANA, S. et al. *The Use of Dehydrated Human Amniotic/Chorionic Membrane Skin Substitute in the Treatment of Pediatric Facial Burn* *Journal of Craniofacial Surgery*, 2019. . Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1097/scs.0000000000005826>>.
- RANDALL, M. J. et al. Advances in the Biofabrication of 3D Skin in Vitro: Healthy and Pathological Models. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 0, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2018.00154>>. Acesso em: 3 nov. 2022.
- RAZA, M. S. et al. Glycerol Preserved Amnion: A Viable Source of Biological Dressing for Superficial Partial Thickness Facial Burns. *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan: JCPSP*, v. 30, n. 4, p. 394–398, abr. 2020.
- SAMPOGNA, G.; GURAYA, S. Y.; FORGIONE, A. Regenerative Medicine: Historical Roots and Potential Strategies in Modern Medicine. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, v. 3, n. 3, p. 101, 2015. . Acesso em: 3 nov. 2022.
- SANDOVAL, J.; ORTEGA, S.; BALMELLI, B. Uso de membrana amniótica como cobertura temporal en pacientes pediátricos con quemaduras. *Anales de la Facultad de Ciencias Médicas (Asunción)*, v. 55, n. 2, p. 59–67, 2022. . Acesso em: 3 nov. 2022.
- SEN, C. K. Human Wounds and Its Burden: An Updated Compendium of Estimates. *Advances in wound care: the journal for prevention and healing*, v. 8, n. 2, p. 39, 2 fev. 2019. Acesso em: 4 nov. 2022.
- SILVA, A. V. et al. *Terapias aplicadas no tratamento das lesões por queimaduras de terceiro grau e extensão variável: revisão integrativa* *Medicina (Ribeirão Preto)*, 2020. . Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v53i4p456-463>>.
- SONALI, D. K.; DHAWALE, S. C. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 23, n. 3, p. 223–229, 1 jul. 2015. . Acesso em: 20 abr. 2022.
- TAM, J. et al. Fractional Skin Harvesting: Autologous Skin Grafting without Donor-Site Morbidity. *Plastic and Reconstructive Surgery Global Open*, v. 1, n. 6, set. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4174164/>>. Acesso em: 4 nov. 2022.
- The Integument*. [s.l.] Mosby, 2007. 11–17 p.
- WONG, R. et al. The dynamic anatomy and patterning of skin. *Experimental dermatology*, v. 25, n. 2, fev. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26284579/>>. Acesso em: 3 nov. 2022.
- YOUSEF, H.; ALHAJJ, M.; SHARMA, S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. Em: *StatPearls [Internet]*. [s.l.] StatPearls Publishing, 2021.
- ZAIDI, Z.; LANIGAN, S. W. Skin: Structure and Function. *Dermatology in Clinical Practice*, p. 1–15, 2010. . Acesso em: 28 out. 2022.
- ZHENG, M. H. et al. Porcine small intestine submucosa (SIS) is not an acellular

collagenous matrix and contains porcine DNA: possible implications in human implantation. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, v. 73, n. 1, abr. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15736287/>>. Acesso em: 19 nov. 2022.

APÊNDICES

APÊNDICE A - PRODUÇÃO CIENTÍFICA GERADA DURANTE O MESTRADO

Co-autoria nos artigos publicados:

1. "The implications of the purinergic signaling throughout pregnancy". JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY, v. 1, p. 1-16, setembro de 2021. (FI - 6.384).

Received: 15 June 2021	Revised: 26 August 2021	Accepted: 14 September 2021
DOI: 10.1002/jcp.30594		
REVIEW ARTICLE		Journal of Cellular Physiology WILEY
<h2>The implications of the purinergic signaling throughout pregnancy</h2>		
<p>Lucas Sagrillo-Fagundes¹ Thaís Casagrande Paim¹ Luiza Pretto¹ Isadora Bertaco¹ Carla Zanatelli¹ Cathy Vaillancourt² Márcia R. Wink¹</p>		
<p>¹Departamento de Ciências Básicas da Saúde e Laboratório de Biologia Celular, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil</p> <p>²Centre Armand Frappier Santé Biotechnologie, INRS, Laval, Quebec, Canada</p> <p>Correspondence Márcia R. Wink, Departamento de Ciências Básicas da Saúde e Laboratório de Biologia Celular, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil. Email: mwink@ufcspa.edu.br</p> <p>Funding information NSERC/CRSNG, Grant/Award Number: 262011-2009; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul; Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologies; B3X postdoc fellowship; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grant/Award Numbers: MS-SCTIE-Dedit-DGITIS-CGCIS/CNPq no 26/2020, and MS-SCTIE-Dedit/CNPq no 12/2018</p>	<p>Abstract</p> <p>Purinergic signaling is a necessary mechanism to trigger or even amplify cell communication. Its ligands, notably adenosine triphosphate (ATP) and adenosine, modulate specific membrane-bound receptors in virtually all human cells. Regardless of the stage of the pregnancy, cellular communication between maternal, placental, and fetal cells is the paramount mechanism to sustain its optimal status. In this review, we describe the crucial role of purinergic signaling on the regulation of the maternal-fetal trophic exchanges, immune control, and endocrine exchanges throughout pregnancy. The nature of the modulation of both ATP and adenosine on the embryo-maternal interface, going through placental invasion until birth delivery depends on the general maternal-fetal health state and consequently on the selective activation of their specific receptors. In addition, an increasing number of studies have been demonstrating the pivotal role of ATP and adenosine in modulating deleterious effects of suboptimal conditions of pregnancy. Here, we discuss the role of purinergic signaling on the balance that coordinates the embryo-maternal exchanges and a promising therapeutic venue in the context of pregnancy disorders.</p> <p>KEYWORDS Adenosine, ATP, embryo-maternal interface, placenta, pregnancy</p>	

2. "Mechanical properties, *in vitro* and *in vivo* biocompatibility analysis of pure iron porous implant produced by metal injection molding: A new eco-friendly

feedstock from natural rubber (*Hevea brasiliensis*)” MATERIALS SCIENCE & ENGINEERING C-MATERIALS FOR BIOLOGICAL APPLICATIONS v. 131, p. 112532, 2021. (FI - 7.328)

Materials Science & Engineering C 131 (2021) 112532



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Materials Science & Engineering C

journal homepage: www.elsevier.com/locate/msec





Mechanical properties, *in vitro* and *in vivo* biocompatibility analysis of pure iron porous implant produced by metal injection molding: A new eco-friendly feedstock from natural rubber (*Hevea brasiliensis*)

Diego Pacheco Wermuth^{a,1}, Thaís Casagrande Paim^{b,1}, Isadora Bertaco^b, Carla Zanatelli^b, Liliana Ivet Sous Naasani^b, Mônica Slaviero^c, David Driemeier^c, André Carvalho Tavares^a, Vinicius Martins^f, Camila Ferreira Escobar^e, Luis Alberto Loureiro dos Santos^d, Lirio Schaeffer^{a,2}, Márcia Rosângela Wink^{b,*,2}

^a Laboratório de Transformação Mecânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil
^b Laboratório de Biologia Celular, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCS/PA), Rua Sarmento Leite 245, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil
^c Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, 91540-000 Porto Alegre, RS, Brazil
^d Laboratório de Biomateriais & Cerâmicas Avançadas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil
^e Centro de Ciência e Tecnologia em Energia e Sustentabilidade, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Av. Centenário 697, 44.085-132 Feira de Santana, BA, Brazil
^f Laboratório de Metalurgia do Pó, Instituto Federal Sul-rio-grandense Campus Sapucaia do Sul, Av. Copacabana 100, 93216-120 Sapucaia do Sul, RS, Brazil

3. “Bioscaffold developed with decellularized human amniotic membrane seeded with mesenchymal stromal cells: assessment of efficacy and safety profiles in a second-degree burn preclinical model”. BIOFABRICATION. Aceito em novembro de 2022. (FI - 11.061).

IOPscience
🔍 Journals ▾ Books Publishing Support
👤 Login ▾

Biofabrication

ACCEPTED MANUSCRIPT

Bioscaffold developed with decellularized human amniotic membrane seeded with mesenchymal stromal cells: assessment of efficacy and safety profiles in a second-degree burn preclinical model

Liliana Sous Naasani¹, Luiza Pretto¹, [Carla Zanatelli](#), Thaís Casagrande Paim¹, Aline Damo Souza², Pablo Fagundes Pase³, Marilda Da Cruz Fernandes¹, Jean Sevigny⁴ and Marcia R. Wink¹ 

Accepted Manuscript online 3 November 2022 • © 2022 IOP Publishing Ltd

[What is an Accepted Manuscript?](#)

DOI 10.1088/1758-5090/ac9ff4

Accepted Manuscript PDF

48 Total downloads

2

Turn on MathJax

Get permission to re-use this article

Share this article

APÊNDICE B - Parecer CEP UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Isolamento de células a partir de material de descarte humano para estudos em medicina regenerativa

Pesquisador: Marcia Rosângela Wink

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 98290318.5.3001.5345

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.214.091

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa a ser realizado em parceria com o Laboratório de Biologia Celular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre e as Unidades de Obstetrícia, Oftalmologia e Cirurgia Plástica da Santa Casa de Porto Alegre, utilizando material de descarte hospitalar como lipoaspirado, pele, limbo esclero-corneal, membrana amniótica e cordão umbilical, serão extraídos diferentes tipos celulares humanos (queratinócitos, melanócitos, células estromais mesenquimais e células endoteliais) para o desenvolvimento de novas terapias celulares para medicina regenerativa, como a aplicação de células estromais mesenquimais em sítios lesionados e também para a verificação da biocompatibilidade de materiais propostos para uso clínico, tais como filmes de quitosana e colágeno, stents cardíacos de ferro e geopolímeros.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Isolar células de tecidos humanos, que seriam descartados, para estudos que gerem novas terapias com potencial uso em medicina regenerativa.

Objetivo Secundário:

-Isolar e caracterizar células estromais mesenquimais de tecidos humanos de descarte: pele, cordão umbilical, gordura e limbo esclerocorneal para serem estudadas e testadas em biomateriais

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefons: (51)3303-8904

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE**



Continuação do Parecer: 3.214.091

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer do Relator.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1261653.pdf	15/01/2019 16:57:14		Aceito
Outros	termo.pdf	15/01/2019 16:51:23	Marcia Rosângela Wink	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_MATERIAIS_DE_DESCARTE E.pdf	12/11/2018 16:50:59	Samirai Vedovatto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEs_materiais_descarte_e_justificativas.pdf	12/09/2018 17:57:45	THAIS CASAGRANDE PAIM	Aceito
Outros	Formulario_Cadastro_Projetos_Unidade_Pesquisa.pdf	16/08/2018 16:02:38	Samirai Vedovatto	Aceito
Outros	Declaracao_de_autorizacao_da_chefe_responsavel.pdf	16/08/2018 15:56:09	Samirai Vedovatto	Aceito
Outros	Formulario_Inscricao_Projetos_pesquisa.pdf	16/08/2018 15:52:48	Samirai Vedovatto	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaracao_utilizacao_dados_material_biologico.pdf	16/08/2018 15:48:11	Samirai Vedovatto	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 21 de Março de 2019

Assinado por:
Fernanda Bordignon Nunes
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245
 Bairro: Sarmiento CEP: 90.050-170
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (51)3303-8804 E-mail: cep@ufcspa.edu.br

APÊNDICE C - Parecer CEP ISCMPA

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Isolamento de células a partir de material de descarte humano para estudos em medicina regenerativa

Pesquisador: Marcia Rosângela Wink

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 98290318.5.0000.5335

Instituição Proponente: ISCMPA

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.734.612

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa a ser realizado em parceria com o Laboratório de Biologia Celular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre e as Unidades de Obstetrícia, Oftalmologia e Cirurgia Plástica da Santa Casa de Porto Alegre, utilizando material de descarte hospitalar como lipoaspirado, pele, limbo esclero-corneal, membrana amniótica e cordão umbilical, serão extraídos diferentes tipos celulares humanos (queratinócitos, melanócitos, células estromais mesenquimais e células endoteliais) para o desenvolvimento de novas terapias celulares para medicina regenerativa, como a aplicação de células estromais mesenquimais em sítios lesionados e também para a verificação da biocompatibilidade de materiais propostos para uso clínico, tais como filmes de quitosana e colágeno, stents cardíacos de ferro e geopolímeros.

Objetivo da Pesquisa:

Já referido em parecer anteriormente emitido.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Já referido em parecer anteriormente emitido

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Já referido em parecer anteriormente emitido

Endereço: R. Prof. Annes Dias, 295 Hosp. Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro **CEP:** 90.020-090
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 **Fax:** (51)3214-8571 **E-mail:** cep@santacasa.ische.br

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Continuação do Parecer: 3.734.612

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_MATERIAIS_DE_DESCARTE.pdf	12/11/2018 16:50:59	Samirai Vedovatto	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO.pdf	12/11/2018 16:49:40	Samirai Vedovatto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEs_materiais_descarte_e_justificativas.pdf	12/09/2018 17:57:45	THAIS CASAGRANDE PAIM	Aceito
Outros	Formulario_Cadastro_Projetos_Unidade_Pesquisa.pdf	16/08/2018 16:02:38	Samirai Vedovatto	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_responsavel_setor_onda_realiza_da_pesquisa.pdf	16/08/2018 16:00:56	Samirai Vedovatto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_entrega_relatorios.pdf	16/08/2018 15:59:54	Samirai Vedovatto	Aceito
Outros	Declaracao_de_autorizacao_da_chefe_responsavel.pdf	16/08/2018 15:56:09	Samirai Vedovatto	Aceito
Outros	Formulario_Inscricao_Projetos_pesquisa.pdf	16/08/2018 15:52:48	Samirai Vedovatto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_utilizacao_dados_prontuario.pdf	16/08/2018 15:51:29	Samirai Vedovatto	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_isencao_onus_instituicao.pdf	16/08/2018 15:50:45	Samirai Vedovatto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_confidencialidade_sujeito_estudo.pdf	16/08/2018 15:49:41	Samirai Vedovatto	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaracao_utilizacao_dados_material_biologico.pdf	16/08/2018 15:48:11	Samirai Vedovatto	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 29 de Novembro de 2019

Assinado por:
Claudio Marcel Berdún Stadnik
(Coordenador(a))

Endereço: R. Profª Annes Dias, 295 Hosp. Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro CEP: 90.020-090
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 Fax: (51)3214-8571 E-mail: cep@santacasa.iche.br