



Pele artificial no
Laboratório de Biologia
da Pele da USP:
reconstruída a partir
de células humanas

Pele de laboratório

Pesquisadores brasileiros criam modelos de tecido humano para estudar doenças e substituir testes de cosméticos e medicamentos em animais

Yuri Vasconcelos

Atrês anos de entrar em vigor uma resolução do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea) que obriga fabricantes de cosméticos e laboratórios farmacêuticos a adotarem métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa, o Brasil fez avanços significativos no desenvolvimento de pele reconstruída em laboratório. Esse material biológico é chamado também de pele artificial, 3D ou equivalente, e tem morfologia e fisiologia similares ao tecido humano. Poderá ser usado em testes de avaliação de novos cosméticos e produtos de higiene pessoal em substituição a animais, no estudo de doenças, como melanoma e câncer de colo uterino, e no tratamento de úlceras dermatológicas crônicas e queimaduras. Empresas, institutos de pesquisa e universidades do país correm contra o tempo para desenvolver modelos nacionais de pele humana *in vitro*.

A pele artificial é reconstruída a partir de células humanas e demora de 10 a 30 dias para ser desenvolvida (ver *infográfico na página 17*). O tecido dura por volta de sete a 10 dias, período

em que está pronto para ser usado. No caso dos testes de cosméticos, a nova substância deve ser aplicada sobre a pele. Em creme ou pó, o material é espalhado com auxílio de uma espátula ou uma haste flexível; se for um líquido, é pingado sobre o tecido. Depois de algumas horas, a pele *in vitro* é lavada para remoção da substância. No dia seguinte, os pesquisadores fazem em laboratório a contagem da quantidade de células vivas e mortas a fim de verificar o potencial corrosivo irritante do novo produto. Cada fragmento de pele reconstruída, com 1,5 centímetro (cm) a 3 cm de diâmetro, só pode ser usado uma vez.

Atualmente, o mercado de pele artificial é liderado pela multinacional francesa L'Oréal, uma das gigantes do setor de cosméticos. A empresa é proprietária dos modelos Episkin e Skinethic, distribuídos em países da Europa em kits formados por 24 unidades de tecidos de pele artificial humana reconstruídos em laboratório. Além da pele completa, formada pela epiderme (camada externa) e a derme (camada logo abaixo da epiderme), a L'Oréal comercializa no exterior outros seis modelos de tecidos, entre eles uma



Preparação de amostra de pele desenvolvida pela professora Silvy Maria-Engler, da USP

epiderme humana reconstruída, uma epiderme pigmentada, mimetizando diferentes cores de pele, e vários tipos de epitélio, como os que compõem as mucosas da boca, gengiva, vagina e córnea. Outra grande participante desse mercado é a norte-americana MatTek, que vende vários modelos de pele equivalente, não muito distintos dos feitos pela L'Oréal. Os preços nas empresas, de amostras individuais, variam de US\$ 50 a US\$ 80. Na Alemanha, o Instituto Fraunhofer IGB criou um sistema automatizado capaz de produzir 12 mil fragmentos de pele a partir de uma única amostra de tecido humano. Desde 2014, o instituto alemão vende o sistema às empresas que querem certificar-se de que seus produtos de beleza não causam alergia ou irritação.

Embora a legislação brasileira permita a importação de pele artificial fabricada no exterior, isso nem sempre é viável – daí a importância do desenvolvimento do tecido no país. “Por ser material vivo e, portanto, perecível, os fragmentos de pele contidos nos kits têm validade de poucos dias. É muito comum enfrentarmos problemas na alfândega, o que na prática inviabiliza a importação”, diz a bióloga Silvy Stuchi Maria-Engler, professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP), referência nas pesquisas envolvendo pele equivalente. “Com a proibição do uso de animais em testes de cosméticos e insumos a partir de 2019, é muito importante que os kits passem a ser produzidos no país.” (ver *boxe na página 20*)

No fim de 2015, o Grupo Boticário, controlador das unidades de negócio O Boticário, Eudora e Quem disse, Berenice?, anunciou ter conseguido criar um material equivalente à pele humana no seu Centro de Pesquisa e Desenvolvimento, em

As estruturas celulares produzidas em laboratório têm características muito similares à pele humana

São José dos Pinhais, no Paraná. O tecido é empregado em testes de matérias-primas e produtos acabados, como maquiagens, loções e cremes, e em ensaios de segurança e toxicidade, no lugar de animais. “Para fazer nossa pele 3D, usamos células isoladas de tecidos cutâneos descartados de cirurgias plásticas, com o consentimento dos doadores e a aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa de nosso Centro de P&D”, informa Márcio Lorencini, gerente de Pesquisa Biomolecular da companhia. Em laboratório, o novo tecido é formado célula a célula, camada por camada, tal como a pele humana. O resultado é um fragmento de até 3 centímetros de diâmetro pronto para realização de testes.

Na recriação *in vitro*, a epiderme, a camada mais externa da pele, é obtida por meio da cultura de queratinócitos, células que realizam a síntese da queratina e respondem pelos fatores de barreira e proteção, e dos melanócitos, responsáveis pela produção de melanina, que confere pigmentação à pele. A derme é reconstituída a partir da cultura de fibroblastos humanos cultivados em gel de colágeno. Os fibroblastos são responsáveis pela produção de proteínas capazes de sintetizar fibras de colágeno e elastina.

Todas essas estruturas celulares produzidas em laboratório têm características de cresci-


Tecido reconstruído

Método permite testes de novos cosméticos e fármacos e reduz o número de ensaios em seres humanos

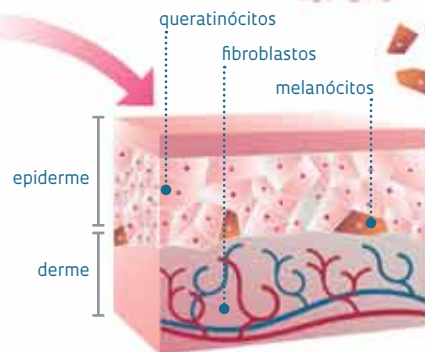
FONTE: GRUPO BOTICÁRIO E SILVYA STUCHI MARIA-ENGLER, PROFESSORA E PESQUISADORA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA USP



1 TECIDO DE ORIGEM
A pele artificial é reconstituída a partir de células humanas descartadas de cirurgias plásticas ou de amostras do prepúcio (camada de pele que cobre a glândula do pênis) de recém-nascidos



2 ESTERILIZAÇÃO E LIMPEZA
Os fragmentos de pele (5 a 8 cm²) passam por um processo de esterilização e por testes de controle microbiológico para garantia de que estão puros e sem infecções virais ou bacterianas




3 ISOLAMENTO CELULAR
Em seguida, isolam-se as principais células cutâneas: fibroblastos, responsáveis pela produção de proteínas que dão firmeza à pele; queratinócitos, que respondem pela proteção; e melanócitos, que dão pigmentação

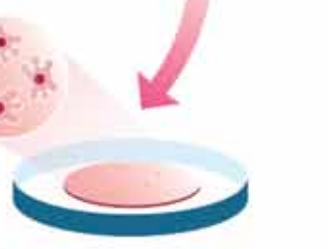
A pele artificial permite maior assertividade nos testes ao ser elaborada por um pool de células de vários indivíduos



6 TEMPO DE CRESCIMENTO
São necessários 10 dias para desenvolver peles em tamanhos menores (1,5 cm de diâmetro). Para fragmentos maiores (3 cm), 30 dias. A pele reconstituída dura até sete dias





5 RECONSTITUIÇÃO DA EPIDERME
Sobre a derme reconstruída é feita a cultura de queratinócitos e melanócitos. O cultivo pode ser desenvolvido também em uma membrana de policarbonato

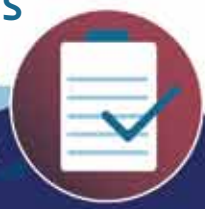


4 CONSTRUÇÃO DA DERME
O primeiro passo para a reconstituição total da pele (derme + epiderme) é a síntese da derme. Em uma matriz de colágeno, os cientistas induzem o crescimento dos fibroblastos humanos


VANTAGENS




Reduz ou evita testes com animais na indústria cosmética e de medicamentos



Eleva a confiabilidade dos testes, já que a pele reconstruída é mais parecida com o tecido humano do que a pele de animais de laboratório



Permite testar várias formulações identificando aquelas mais seguras e eficazes



Possibilita a redução de testes clínicos em humanos

mento muito similares à pele humana, o que aumenta a uniformidade e a reprodutibilidade dos testes. E guardam muito mais semelhança com a pele humana do que a dos camundongos normalmente usados na avaliação de novos produtos. A pele completa formada por derme e epiderme é ideal para o estudo de doenças e a avaliação de novos medicamentos, enquanto a estrutura formada apenas pela epiderme é suficiente para ensaios de corrosão e irritação feitos pela indústria de cosméticos.

PELE 3D

A tecnologia do Grupo Boticário, segundo Márcio Lorencini, começou a ser desenvolvida em 2009. Com ela é possível realizar vários testes em uma mesma unidade de pele reconstituída. “A pele 3D permite maior amplitude e assertividade nos testes, por ser elaborada a partir de um conjunto de células de vários indivíduos [prática comum nas técnicas atuais de todos os grupos que pesquisam e produzem peles artificiais]. Utilizando um *pool* de células diminuímos a variabilidade individual. Caso empregássemos células derivadas de uma única pessoa poderíamos ter respostas variáveis de um indivíduo para outro, o que não é ideal para avaliação de parâmetros toxicológicos e de eficácia de produtos e matérias-primas cosméticas”, afirma Lorencini. Além dos ensaios de toxicidade, corrosão e irritação cutânea, a empresa usa a pele artificial para avaliação de eficácia da produção de melanina, análise de expressão gênica e proteica de diversos marcadores teciduais, como colágenos, elastinas e queratinas, e estudo de citocinas, que são biomarcadores de inflamação.

O Grupo Boticário desenvolveu o modelo com recursos próprios, sem o auxílio de parceiros na academia, mas contou em sua equipe com a participação da bióloga Carla Abdo Brohem, que fez sua formação no Laboratório de Biologia da Pele da USP, com bolsa de doutorado da FAPESP. Também com auxílio da Fundação, Carla realizou um pós-doutorado entre 2010 e 2011, ocasião em que estagiou no laboratório da pesquisadora australiana Pritinder Kaur, do Peter MacCallum Cancer Centre, instituição médica de Melbourne especializada na pesquisa e no tratamento de câncer. Pritinder é considerada uma grande especialista no estudo de células-tronco epiteliais e colabora com o grupo da professora Silvy Maria-Engler. Atualmente, Carla coordena o Núcleo de Avaliação de Segurança e Eficácia do Centro de P&D da companhia.

Em São Paulo, Silvy, coordenadora do Laboratório de Biologia da Pele da USP, finalizou seu primeiro modelo de pele humana reconstituída *in vitro* em 2006. Entre os trabalhos mais recentes, destacam-se o desenvolvimento de uma pele



envelhecida para uso em testes de cosméticos antienvhecimento, a criação de uma epiderme semelhante aos modelos comerciais e a produção de uma pele 3D voltada a estudos sobre câncer de pele. Essa linha de pesquisa já rendeu 45 artigos científicos publicados pelo grupo de Silvy.

“É fundamental que o Brasil domine a tecnologia de produção de pele humana reconstruída, ganhando autonomia nesse campo de pesquisa”, afirma a cientista. “Os modelos de pele completa e epiderme que criamos são idênticos aos produzidos no exterior. Estamos transferindo esse conhecimento para a sociedade por meio da Fundação Instituto de Pesquisas Farmacêuticas da USP, a FipFarma. Já fomos procurados por vários fabricantes de cosméticos interessados em receber treinamento para aprender a construir esses tecidos em laboratório”, diz ela.

A primeira empresa a fazer o curso de capacitação da USP foi a OneSkin Technologies, startup de biotecnologia especializada em engenharia de tecidos criada por três pesquisadoras brasileiras e sediada em São Francisco, na Califórnia. “Com o treinamento recebido na USP, conseguimos construir nosso modelo de epiderme humana *in vitro*. Agora, estamos trabalhando no desenvolvimento da pele completa”, conta a bioquímica Carolina

Teste de cosmético líquido sobre pele artificial na USP. Cada fragmento só pode ser usado uma vez



A primeira amostra de pele humana reconstruída na USP foi finalizada em 2006

Reis de Oliveira, sócia-fundadora da OneSkin. Incubada desde março deste ano na IndieBio, uma das maiores aceleradoras de biotecnologia dos Estados Unidos, a OneSkin quer dominar a tecnologia de construção de pele 3D para atuar no mercado de cosméticos antienvhecimento. “Nosso próximo desafio é desenvolver um tipo de pele envelhecida que nos permita estudar mecanismos para prevenir o envelhecimento”, diz Carolina. Quando este objetivo for atingido, a OneSkin vai se dedicar à busca de moléculas com potencial antienvhecimento. “Nossa ideia é licenciar moléculas relevantes ou produzir novos cosméticos com elas.” A OneSkin foi convidada a instalar-se na IndieBio após participar de um evento para startups no Brasil e chamar a atenção de investidores estrangeiros.

No Laboratório de Biologia da Pele da USP, a bióloga Paula Comune Pennacchi trabalha em uma linha de pesquisa similar à da OneSkin. Ela criou um modelo de pele humana que simula o envelhecimento cutâneo fisiológico e as alterações de pele observadas em pacientes diabéticos. O trabalho foi sua tese de doutorado, defendida em fevereiro deste ano. “Recriamos um modelo capaz de responder à ação de cosméticos e fármacos com ação sobre o envelhecimento cutâneo. Nossa pele reconstruída também contribuiu pa-

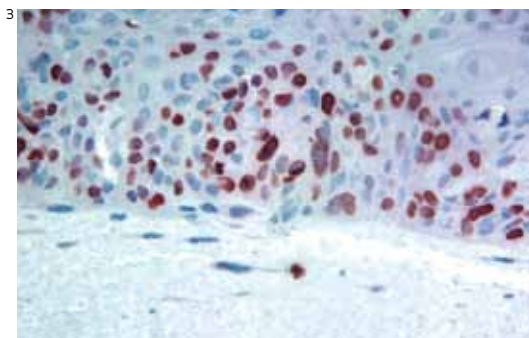
ra o entendimento de fenômenos relacionados à deficiência de cicatrização e maior intensidade inflamatória em pele de pacientes diabéticos”, explica a pesquisadora.

AGUARDA REGULAMENTAÇÃO

O Grupo Boticário não vai compartilhar a pele 3D construída em seus laboratórios enquanto não existir no Brasil a validação para esse tipo de produto. A francesa L’Oréal tomou a decisão de investir no Brasil nessa área e também aguarda a regulamentação para poder disponibilizar no país tecidos da linha Episkin, como já ocorre na Europa e na Ásia. “Enquanto não houver regulamentação clara para a distribuição dos tecidos, estamos no Brasil somente para fins de pesquisa. Por ano, produzimos na França aproximadamente 150 mil unidades de pele reconstruída, enquanto na China fabricamos outros 30 mil tecidos de pele pigmentada”, conta Rodrigo De Vecchi, gerente de Pesquisa Avançada da L’Oréal no Brasil. A princípio, a empresa implementa aqui apenas o modelo de epiderme humana reconstruída, conhecido pela sigla RHE, que usa em sua constituição queratinócitos humanos, o principal tipo celular epitelial. O RHE é um tecido aprovado pelo Comitê Europeu para Validação de Métodos Alternativos (Ecvam), para aplicação em testes de segurança em produtos cosméticos em substituição aos testes em animais. “Quando o modelo RHE estiver disponível no Brasil, contaremos com uma ferramenta para uso em cosméticos e também em áreas de pesquisa, como biomedicina, medicina regenerativa e avaliação toxicológica”, afirma De Vecchi.

Com a finalidade de refinar seu modelo de epiderme reconstruída, a L’Oréal fechou recentemente uma parceria com o Instituto D’Or de Pesquisa e Educação (IDor), do Rio de Janeiro. “Nossa proposta é reinventar o modelo de epiderme humana reconstruída com neurônios criados por nós, aproximando-a ainda mais da pele humana original”, conta o neurocientista Stevens Rehen, coordenador de pesquisas do IDor. Trata-se de uma pesquisa com enorme potencial biotecnológico, segundo o pesquisador, que também é professor do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro (ICB-

Microscopia de infecção por papiloma vírus (HPV), à esquerda, e a pele artificial normal, em experimentos no Instituto de Ciências Biomédicas (ICB)





Pele reconstruída da L'Oréal: pesquisas avançam para inserir neurônios no produto

-UFRJ). A área de interesse de Rehen é o estudo da biologia de células-tronco reprogramadas. “Desde 2014 firmamos a parceria com a L'Oréal voltada ao uso de células-tronco para a criação de modelos celulares humanos em laboratório”, diz. “Acreditamos que ao inervar a epiderme humana reconstruída com neurônios iremos aumentar a capacidade preditiva do modelo.”

Além de poder ser usada como plataforma para testes de cosméticos e produtos de higiene pessoal, a pele cultivada também é uma ferramenta para validação de novos medicamentos e estudo de doenças, entre elas papilomavírus humano (HPV) e melanoma. Na USP, estudos nessa linha são desenvolvidos no laboratório da professora

Silvy e no Instituto de Ciências Biomédicas. Lá, o professor Enrique Boccardo desenvolveu um modelo de pele humana *in vitro* para investigar os mecanismos de transformação celular associados ao HPV e aprofundar pesquisas sobre o câncer de colo uterino causado pelo microrganismo. “Com apoio da FAPESP, eu trouxe essa tecnologia dos Estados Unidos em 2001, quando trabalhava no Instituto Ludwig de Pesquisas sobre o Câncer, em São Paulo”, conta Boccardo.

“Para estudar a fundo a biologia do vírus, introduzimos no Brasil um sistema de cultura de células *in vitro* que permite reproduzir o ambiente no qual o microrganismo cumpre seu ciclo. Esse tecido, semelhante à pele, é composto por que-

Métodos alternativos à experimentação animal

Uso de tecidos reconstruídos no Brasil depende de um custoso processo de validação

O Brasil é o quarto maior mercado global de produtos de beleza, superado por Estados Unidos, China e Japão. As cerca de 2,5 mil empresas do segmento faturaram R\$ 42,6 bilhões em 2015, de acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (Abihpec). A partir de 2019, qualquer novo produto de beleza deverá obrigatoriamente passar por testes dermatológicos em peles humanas reconstruídas, no Brasil ou no exterior. “Não existem estudos que

apontem o tamanho do mercado de pele equivalente no Brasil, mas teoricamente ele deve ser expressivo, já que muitos lançamentos de cosméticos ocorrem todos os anos”, afirma a professora Silvy Maria-Engler, da USP, que integra o Conselho Científico da Abihpec.

A obrigatoriedade de substituição de testes em animais por modelos de pele equivalente foi determinada há dois anos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea), órgão integrante do Ministério da Ciência,

Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC), responsável por estabelecer normas para experimentação animal no Brasil. A entidade reconheceu 17 métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa, dos quais dois preveem o uso de epiderme humana equivalente para validação de cosméticos. “Um destina-se à verificação do potencial de irritação dos novos produtos e o outro serve para avaliação da corrosão das substâncias testadas”, destaca



Produção de pele no Boticário: testes para toxicidade, corrosão e irritação cutânea

“ratinócitos humanos, colágeno e fibroblastos”, explica Boccardo. “Temos utilizado o modelo para analisar os mecanismos moleculares empregados pelo vírus para escapar da resposta imune do organismo e entender como o HPV manipula a célula a fim de sintetizar seu material genético e reproduzir novas partículas virais.”

Na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, a pesquisadora pós-doutoranda Fernanda Faião Flores recorre ao tecido artificial desenvolvido pelo grupo da professora Silvy Maria-Engler para estudar os mecanismos de resistência ao melanoma, a forma mais letal de câncer de pele. “Utilizamos linhagens celulares, amostras de pacientes e um modelo de pele humana reconstituída *in vitro* que mimetize a invasão e a disseminação das células de melanoma”, conta. “Com isso, testamos compostos e conseguimos caracterizar o fenômeno de resistência a um me-

o ex-coordenador do Conceia, José Mauro Granjeiro. Esses dois métodos alternativos foram referendados pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), entidade que aprovou os métodos empregados na Europa e que serviram de base para elaboração da norma brasileira.

“A pele 3D que desenvolvemos na USP foi criada para estudos científicos, mas pode ser usada comercialmente, desde que passe por um processo de validação”, conta Silvy. Nesse processo, amostras da pele cultivada *in vitro* devem ser submetidas a uma extensa bateria de

testes, a um custo aproximado de R\$ 1 milhão. Em geral, de um a três laboratórios independentes participam da validação, que é coordenada pelo Centro Brasileiro para Validação de Métodos Alternativos (Bracvam) com apoio da Rede Nacional de Métodos Alternativos (Renama), criada em 2012 pelo governo federal. “Por causa do alto custo, ele só é viável com apoio de empresas e laboratórios privados”, ressalta a farmacêutica-bioquímica Sílvia Berlanga Barros, professora da FCF-USP. Ela participou da criação da pele artificial no grupo de Silvy Engler.

dicamento, chamado vemurafenibe, que inibe a atividade proliferativa do tumor.” A pele reconstituída com melanoma serviu para avaliar o composto como possível agente quimioterápico.

TRATAMENTO DE QUEIMADOS

Na área médica, outra opção é o emprego de pele humana reconstituída e terapia celular com transplante de células cutâneas para o tratamento de úlceras de pele e queimaduras em pacientes. Em Campinas, a dermatologista Maria Beatriz Puzzi, coordenadora do Laboratório de Cultura de Células de Pele da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM-Unicamp), estuda a recriação do tecido celular em laboratório para enxerto feito a partir de células isoladas do próprio paciente, o que faz com que ambos os tecidos – a pele natural e a reconstituída – tenham estrutura muito semelhante, possibilitando a realização de transplantes autólogos (em que se utiliza tecido de um mesmo indivíduo) com menor risco de rejeição. “O problema dessa metodologia é que a recriação de pele em laboratório leva em torno de 45 a 60 dias – e os pacientes queimados precisam do tratamento imediatamente”, explica Maria Beatriz.

Para contornar esse problema, no lugar do implante da pele reconstituída, o grupo decidiu empregar a terapia celular com células da pele. “Tiramos um pedacinho da pele do paciente, isolamos os queratinócitos e os fibroblastos e fazemos o cultivo dessas células em laboratório. Em 15 dias, elas são misturadas a um gel e aplicadas no paciente. Em pouco tempo, espalham-se nas lesões reconstruindo a pele”, conta. “Temos resultados muito positivos com essa rota, que acelera a cicatrização, encurta o tempo de hospitalização e reduz a morbidade dos pacientes.” ■

Projetos

1. Desenvolvimento de pele artificial contendo equivalente dérmico glicado na avaliação da eficácia e toxicidade de compostos antiglicação (nº 2011/14327-6); **Modalidade** Auxílio à Pesquisa – Regular; **Pesquisadora responsável** Silvy Stuchi Maria-Engler (USP); **Investimento** R\$ 85.925,35.
2. Geração de peles artificiais humanas e melanomas invasivos como plataforma para testes farmacológicos (2008/58817-4); **Modalidade** Auxílio à Pesquisa – Regular; **Pesquisadora responsável** Silvy Stuchi Maria-Engler (USP); **Investimento** R\$ 165.075,55.
3. Impacto da expressão de reck no controle da invasão de melanoma: Estudo em monocamadas e pele artificial (nº 2010/50157-5); **Modalidade** Bolsa no País – Pós-doutorado; **Pesquisadora responsável** Silvy Stuchi Maria-Engler (USP); **Bolsista** Carla Abdo Brohem (USP); **Investimento** R\$ 32.690,51.
4. Estudo da possível implicação de p53 nos efeitos do fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa) sobre células imortalizadas por papilomavírus humano (HPV) (nº 1998/07087-2); **Modalidade** Bolsa no País – Regular; **Pesquisadora responsável** Luisa Lina Villa/USP; **Bolsista** Enrique Mario Boccardo Pierulivo (USP); **Investimento** R\$ 104.861,71.
5. Análise da expressão de proteínas de polaridade em processos neoplásicos associados ao papilomavírus humano utilizando culturas organotípicas. (FAPESP-Conicet) (nº 2012/51017-8); **Modalidade** Auxílio à Pesquisa – Regular; **Pesquisador responsável** Enrique Mario Boccardo Pierulivo (USP); **Investimento** R\$ 22.988,33.