LUÍS RICARDO MARTINHÃO SOUTO

Modelo de pele humana (Derme + Epiderme) Reconstruída In Vitro

CAMPINAS

2005

LUÍS RICARDO MARTINHÃO SOUTO

Modelo de pele humana (Derme + Epiderme) Reconstruída In Vitro

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, na área de concentração de Patologia Clínica

Orientadora: *Profa. Dra. Maria Beatriz Puzzi*

Co-orientadora: *Profa. Dra. Maria Helena Stangler Kraemer*

CAMPINAS

2005

BC
ADA T UNICAMP
So89m
EX
BC/ 63719
6.P00086.05
D ☒
11.00
13/05/05

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS UNICAMP

So89m

Souto, Luís Ricardo Martinhão
Modelo de pele humana (derme + epiderme) reconstruída *in vitro* / Luís Ricardo Martinhão Souto. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientadores : Maria Beatriz Puzzi, Maria Helena Stangler Kraemer
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Colágeno. 2. Cultura de células. 3. Enxertia. 4. Epiderme. 5. Fibroblastos. I. Maria Beatriz Puzzi. II. Maria Helena Stangler Kraemer. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a).
Maria Beatriz Puzzi

Membros:

1. Prof. Dr. André Luiz Vergnanini

2. Profa. Dra. Maria Beatriz Puzzi

3. Prof. Dr. Ney Romiti

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 01/02/2005

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Constância e Luiz, pelo apoio e dedicação ao longo de toda minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Beatriz Puzzi, pelo apoio à pesquisa e pela confiança em mim depositada.

À Jussara Rehder, pelo auxílio e colaboração nos experimentos em laboratório.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Maria Helena Stangler Kraemer, pelo apoio e otimismo.

Ao Prof. Dr. Antonio Condino Neto, pela acolhida em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. José Vassallo, pelo apoio na realização da parte histológica deste trabalho, pelo auxílio na compreensão dos resultados e pela revisão de partes do texto.

À Profa. Dra. Maria Letícia Cintra, pelo auxílio na interpretação de dados histológicos e pela revisão de partes do texto.

Ao Dr. Marco Antonio de Camargo Bueno, pela amizade, apoio e ensinamentos.

Ao Dr. Paulo Henrique Facchina Nunes, pela amizade, apoio e ensinamentos.

À Sra. Lea de Magalhães e à Priscila Duarte, pela realização técnica (confecção) de lâminas histológicas com alto padrão de qualidade.

Ao Departamento de Patologia Clínica, pela minha aceitação junto ao seu corpo discente.

Ao Sr. Ronei Luciano Mamoni, pelo auxílio na obtenção de fotografias microscópicas de boa qualidade.

Ao Sr. Adilson Abilio Piaza, pela montagem dos quadros fotográficos (“plates”) apresentados neste trabalho.

A todos aqueles que, porventura, não tenham sido citados nominalmente, e que tenham, de alguma forma, contribuído para este trabalho.

"Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados; capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo só depende de nossa vontade e perseverança."

Albert Einstein

SUMÁRIO

Pág

RESUMO..... *xvi*

ABSTRACT..... *xviii*

1- INTRODUÇÃO..... 20

2- OBJETIVOS..... 25

2.1- Objetivo geral..... 26

2.2- Objetivos específicos..... 26

3- REVISÃO DE LITERATURA..... 27

4- MATERIAL E MÉTODOS..... 42

4.1- Coleta de material e aspectos éticos..... 43

4.2- Preparação das amostras de pele para culturas celulares..... 43

4.3- Culturas celulares..... 45

4.3.1- Cultura de queratinócitos..... 45

4.3.2- Cultura de melanócitos..... 46

4.3.3- Cultura de fibroblastos..... 47

4.4- Passagem celular..... 48

4.5- Estudos com diferentes matrizes biológicas para obtenção de derme humana reconstruída *in vitro*..... 49

4.6- Técnica para obtenção de pele humana reconstruída *in vitro* contendo derme e epiderme associadas..... 50

4.7- Experimento controle..... 51

4.8- Estudos histológicos dos equivalentes de derme humana reconstruída *in vitro* obtidos com utilização das matrizes biológicas e do experimento controle..... 53

4.9- Estudos histológicos da pele humana (derme + epiderme) reconstruída *in vitro* e do experimento controle..... 53

5- RESULTADOS..... 54

5.1- Resultados dos estudos dos equivalentes dérmicos obtidos *in vitro* com as diferntes matrizes biológicas (Matrizes 1, 2, 3 e 4) e do experimento controle..... 55

5.1.1- Resultados dos estudos histológicos dos experimentos realizados com as matrizes biológicas 1, 2 e 3..... 55

5.1.2- Resultados dos estudos histológicos do experimento realizado com a matriz biológica 4..... 57

5.1.3- Resultados do estudo histológico do experimento controle 57

5.2- Resultados dos estudos da pele humana (derme + epiderme) reconstruída *in vitro* e do experimento controle..... 58

5.2.1- Resultados dos estudos histológicos com a pele humana reconstruída *in vitro* contendo derme e epiderme associadas..... 58

5.2.2- Resultados dos estudos histológicos com o experimento controle.. 59

6- DISCUSSÃO..... 63

7- CONCLUSÕES..... 73

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 75

9- BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR..... 87

10- ANEXO..... 90

m^2	metro(s) quadrado(s)
Kg	quilograma(s)
HE	coloração histológica por hematoxilina e eosina
PAS	ácido periódico-reagente de Schiff
PERLS	coloração histológica por azul da Prússia
a.C.	antes de Cristo
mm	milímetro(s)
DED	derme humana morta desepidermizada
mM	milimolar(es)
UVB	radiação ultra-violeta do tipo B
GM-CSF	fator estimulante de colônias de macrófagos
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
®	marca registrada
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
RNAm	ácido ribonucléico "mensageiro"
DSPGII	dermatan sulfato proteoglicano II
cm	centímetro(s)
%	porcentagem

EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ºC	grau(s) Celsius
CO_2	gás carbônico
µm	micrômetro(s)
rpm	rotações por minuto
cm^2	centímetro(s) quadrado(s)
ml	mililitro(s)
UI	unidades internacionais
mg	miligrama(s)
µg	micrograma(s)
DMSO	dimetil-sulfóxido
cm^3	centímetro(s) cúbico(s)
IMDM	Iscove's Modified Dulbeccos Médium
Ca^{2+}	íons cálcio
pH	escala logarítmica que demonstra a concentração real de íons H^+ (e portanto OH^-) em qualquer solução aquosa no intervalo de acidez entre 1,0 M (molar) de H^+ e 1,0 M (molar) de OH^-; pH = log 1/ $[H^+]$ = -log $[H^+]$
IgE	imunoglobulina tipo E
g	grama(s)

LISTA DE TABELAS

Pág

Tabela 1- Crescimento das culturas celulares..... 67

LISTA DE QUADROS

Pág

Quadro 1- Figuras A, B, C e D..... 49

Quadro 2- Figuras A, B, C e D..... 52

LISTA DE FIGURAS

Pág

Figura 1- Esquema de preparação das amostras de pele para culturas celulares..... 44

Figura 2- Esquema de preparação das amostras de pele para culturas celulares..... 44

Figura 3- Esquema de cultura de queratinócitos 45

Figura 4- Esquema de cultura de melanócitos 46

Figura 5- Esquema de cultura de fibroblastos..... 47

Figura 6- Esquema da técnica para obtenção de pele humana derme + epiderme reconstruída *in vitro*..... 51

Figura 7- Matriz orgânica de osso bovino liofilizado esponjoso pura..... 56

Figura 8- Matriz orgânica de osso bovino liofilizado esponjoso após cultura de fibroblastos 56

Figura 9- Membrana biológica de pericárdio bovino pura..... 56

Figura 10- Membrana biológica de pericárdio bovino após cultura de fibroblastos..... 56

Figura 11- Derme humana reconstruída *in vitro* com utilização de colágeno bovino..... 57

Figura 12- Experimento controle sem utilização de colágeno bovino..... 57

Figura 13- Pele humana reconstruída *in vitro* 59

Figura 14- Experimento controle..... 59

Figura 15- Pele humana reconstruída *in vitro* 60

Figura 16- Experimento controle 60

Figura 17- Experimento controle..... 60

Figura 18- Pele humana reconstruída *in vitro*..... 60

Figura 19- Experimento controle..... 61

Figura 20- Pele humana reconstruída *in vitro*..... 61

Figura 21- Pele humana reconstruída *in vitro*..... 61

Figura 22- Experimento controle..... 61

Figura 23- Pele humana reconstruída *in vitro* 62

Figura 24- Experimento controle..... 62

Figura 25- Pele humana reconstruída *in vitro*..... 62

Figura 26- Experimento controle..... 62

LISTA DE GRÁFICOS

Pág

Gráfico 1- Crescimento das culturas celulares 68

Gráfico 2- Curva de crescimento da cultura de melanócitos..... 68

Gráfico 3- Curva de crescimento da cultura de fibroblastos..... 69

Gráfico 4- Crescimento das culturas dos diferentes tipos celulares..... 69

RESUMO

MODELO DE PELE HUMANA (DERME + EPIDERME) RECONSTRUÍDA *IN VITRO*

A obtenção de uma pele humana que apresente derme e epiderme, reconstruída a partir de células isoladas de pacientes, possibilita a realização de enxertos autólogos de pele reconstruída em laboratório (*in vitro*) em pacientes com áreas doadoras escassas além de permitir ensaios com substâncias químicas e drogas *in vitro* e não mais *in vivo*.

A partir da cultura de fibroblastos humanos, é possível obter um número suficiente de células que podem ser injetadas em uma matriz de colágeno bovino tipo I que, mantida imersa em meio de cultura, específico para fibroblastos, permite a formação de uma derme humana reconstruída *in vitro*. Sobre essa derme, através de cultura de queratinócitos e melanócitos humanos, forma-se uma epiderme diferenciada levando à formação de uma pele humana reconstruída *in vitro,* constituída de derme e epiderme associadas.

Essa pele humana formada é, histologicamente, semelhante à pele humana *in vivo*. Na derme, identifica-se o tecido colágeno, com suas células, e a matriz extracelular organizados paralelamente à epiderme. Esta se desenvolve em várias camadas.

Não há distinção entre derme e epiderme no experimento controle, onde não foi utilizado o colágeno bovino tipo I.

Palavras-chave: Cultura de células; Colágeno; Fibroblastos; Pele humana reconstruída; Queratinócitos; Substitutos de pele.

ABSTRACT

MODEL OF HUMAN SKIN (DERMIS + EPIDERMIS) RECONSTRUCTED *IN VITRO*

The technique to obtain human skin presenting dermis and epidermis reconstructed from cells isolated from patients allows the performance of autologous grafts of skin reconstructed in laboratory (*in vitro*) on patients with scarce donor sites, in addition to permitting trials with chemical substances and drugs no more *in vivo*, but *in vitro*.

It is possible to obtain a sufficient number of cells from human fibroblast culture that can be injected in bovine collagen type I matrix and kept submerged in a specific culture medium for fibroblasts. This will permit the formation of human dermis reconstructed *in vitro*. On this dermis, through culture of human keratinocytes and melanocytes, a differentiated epidermis is formed, leading to the creation of human skin reconstructed *in vitro,* composed of associated dermis and epidermis.

This human skin is histologically formed in the same way as human skin *in vivo*. Collagen tissue can be identified in the dermis, with its cells and extracellular matrix organized in parallel to the epidermis, which is developed in several layers.

There is no distinction between dermis and epidermis in the control experiment where no bovine collagen type I was used.

Key words: Cell culture; Collagen; Fibroblasts; Reconstructed human skin; Keratinocytes; Skin substitutes.

1- INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano, com dimensões que variam, no adulto, de 1,5 a 2,0 m^2 e peso que oscila entre 8,0 e 10,0 Kg. Tem cerca de 1,0 X 10^{11} células de origem epitelial, mesenquimatosa e neural. É composta por três camadas distintas: a tela subcutânea, a derme e a epiderme (BORANIC et al., 1999; STERNBERG, 1997).

A derme é composta por uma densa malha de fibras colágenas e elásticas (matriz extracelular), produzidas pelos fibroblastos cutâneos, cujas características e distribuição garantem-lhe a consistência física (textura e elasticidade) (HUANG et al., 1998). A epiderme contém, junto à camada germinativa ("camada basal"), os queratinócitos, que garantem a sua renovação, e os melanócitos, células responsáveis pela pigmentação da pele, os quais sintetizam a melanina, que é progressivamente transferida aos queratinócitos (WATT, 1988). Durante a diferenciação epidérmica, os queratinócitos sofrem modificações morfológicas e biológicas. A partir da camada basal, eles movem-se através das camadas espinhosa e granulosa e fixam-se na camada mais superficial (córnea), constituindo então estruturas multilamelares de corneócitos anucleados, circundados por lipídeos extracelulares (TAUBE et al., 2000; BORANIC et al., 1999; WATT, 1988; ECKERT et al., 1997).

Quanto à função, a derme, com seus componentes mesenquimais, fornece o suporte mecânico, rigidez e espessura da pele. Tem ainda células dendríticas e macrófagos, com funções imunológicas. Os mastócitos reagem a estímulos inflamatórios e participam da cicatrização de feridas. Os vasos sanguíneos dérmicos, além de fornecerem nutrientes para a pele, estão envolvidos na termorregulação, função que é compartilhada com as glândulas sudoríparas. Pequenos e grandes plexos nervosos participam da inervação de diferentes órgãos cutâneos que são responsáveis pela detecção de dor, pressão e variações de temperatura. Já a epiderme serve como barreira mecânica contra agentes externos. As células de Langerhans apresentam função imunológica reconhecendo antígenos e os apresentando aos linfócitos T. Os melanócitos, através da produção da melanina, são protetores naturais contra os efeitos nocivos da luz ultravioleta. Os queratinócitos são responsáveis pelo processo de queratinização; a formação de filamentos de queratina, em associação com desmossomos, hemidesmossomos e a membrana basal possibilitam a integridade estrutural da epiderme (URMACHER, 1997).

Quando lesada, a pele se repara através da proliferação e crescimento das células da derme (fibroblastos e outras células estromatosas) e/ou epiderme (queratinócitos e melanócitos) remanescentes (JANSSON et. al., 2001).

Em lesões extensas e profundas da pele e mucosas pode ocorrer destruição da derme e dos elementos epidérmicos, resultando num processo de reparo lento e sujeito a complicações. Nestes casos podem ser utilizados transplantes autólogos de pele, mas seu uso é limitado pelo tamanho da área doadora e pelas condições clínicas do paciente. Alotransplantes de cadáveres ou voluntários são rejeitados após 1 ou 2 semanas e fornecem somente cobertura temporária. Enxertos de pele humana ou animal, desvitalizados, liofilizados ou refrigerados em glicerol acomodam o tecido conjuntivo e estimulam o crescimento de vasos sanguíneos, mas, em geral, são degradados precocemente (BORANIC et al., 1999).

Visando solucionar o problema da necessidade de grande quantidade de pele para enxertia em casos de queimaduras e úlceras crônicas de pele, com áreas doadoras escassas, inicialmente foi tentada a utilização de células cultivadas *in vitro*, autólogas (BOSS et al., 2000; TERSKIKH et al., 1999) ou não (BOLÍVAR-FLORES et al., 1999), de forma isolada, sobre essas áreas. Foram desenvolvidos modelos de epiderme humana reconstruída *in vitro* (RÉGNIER et al, 1998; PRUNIÉRAS et al., 1983), mas a utilização clínica de alguns desses modelos obteve sucesso parcial, em grande parte devido a problemas de retração do enxerto, decorrentes da falta de um leito dérmico (tecido conjuntivo) adequado (EL-SHEEMY et al., 2001) ou da espessura fina do enxerto (CARSIN et al., 2000). Mais recentemente, tem sido estudado o uso de células cultivadas *in vitro* associadas a meios de aderência (fixação) na pele (HORCH et al., 2001; HORCH et al., 1998; RONFARD et al., 1991) e o uso de substitutos ou equivalentes dérmicos, contendo colágeno, associados a células autólogas cultivadas *in vitro*, com melhores resultados (JANSSON et al., 2001; KREMER et al., 2000; KIM et al., 1999).

A obtenção de uma pele contendo derme e epiderme associadas, reconstruída com células obtidas a partir de um pequeno fragmento de pele e multiplicadas em laboratório, e que possa ser utilizada como enxerto, ainda é um objeto de investigação. A utilização de matrizes acelulares ou matrizes contendo colágeno para crescimento

simultâneo de células dérmicas e epidérmicas tem mostrado resultados promissores (HOELLER et al., 2001; AUGER et al., 1998; ARCHAMBAULT et al., 1995). O tecido colágeno empregado como matriz para crescimento em cultura (*in vitro*) de fibroblastos fornece um equivalente dérmico com características muito semelhantes àquelas encontradas na derme humana, com boas perspectivas de aplicação clínica (VAISSIERE et al., 2000; BOYCE, 1998).

Observam-se, na revisão de literatura, diferentes estudos com a constante preocupação, não só de descreverem técnicas para se obter equivalentes de pele contendo elementos dérmicos e epidérmicos associados, mas também de demonstrarem a viabilidade clínica desses substitutos. Com a finalidade de correlacionar um modelo de pele e sua utilização clínica, as técnicas para obtenção *in vitro* devem ser padronizadas.

A grande quantidade de substitutos de pele que surgiu nos últimos dez anos forneceu uma ampla variedade de tratamentos à disposição de médicos e pacientes. Muitos deles apresentaram resultados clínicos insatisfatórios, o que acabou por torná-los de uso limitado. Na revisão da literatura, não se observou comparação dos métodos apresentados com estudos controle.

Estudos têm demonstrado que a cultura simultânea de queratinócitos e fibroblastos é uma abordagem mais adequada para reproduzir as características da pele humana *in vivo* do que monoculturas dessas células (AUGER et al., 1998; MOLL et al., 1998; COULOMB et al., 1989).

Para se comparar modelos de pele obtidos *in vitro* com a pele humana *in vivo*, lança-se mão de estudos histológicos, com técnicas de coloração específicas. A coloração por hematoxilina-eosina (HE) cora as células epidérmicas em vermelho, com núcleos em roxo, a camada córnea em vermelho vivo e as células dérmicas em roxo. A coloração por tricrômio de Masson cora o colágeno e o muco em azul e outras estruturas (citoplasma, queratina, fibras musculares e intercelulares) em vermelho, enquanto a coloração por ácido periódico-reagente de Schiff (PAS), cora carboidratos (glicogênio) e a membrana basal em vermelho magenta e núcleos em azul escuro. A coloração de Weigert-Van Gieson cora fibras elásticas em vermelho-púrpura. O método de Fontana-Masson cora grânulos argentafins (melanina) em preto e o azul da Prússia cora grânulos de hemossiderina (depósitos de ferro) em azul (BANCROFT e GAMBLE, 2002).

No presente estudo é apresentado um modelo de pele humana reconstruída *in vitro*, composta de derme e epiderme associadas, utilizando-se uma matriz biológica de colágeno bovino tipo I e um experimento controle, sem a utilização de nenhum tipo de matriz biológica. São relatados os resultados com experimentos utilizando outros tipos de matrizes biológicas: matriz orgânica de osso bovino liofilizado esponjoso, membrana biológica de pericárdio bovino e colágeno bovino tipo I em grânulos.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

Apresentar uma técnica reprodutível (modelo) para obtenção de pele humana reconstruída *in vitro*, contendo derme e epiderme associadas, baseada no crescimento de fibroblastos no interior de uma matriz biológica, e no crescimento seqüencial de queratinócitos e melanócitos sobre essa matriz com fibroblastos cultivados em seu interior. Avaliar a semelhança dessa pele humana reconstruída *in vitro* com o experimento controle, realizado sem a utilização de matriz biológica.

2.2- Objetivos específicos

Responder às seguintes questões:

- É possível obter uma pele humana reconstruída *in vitro*, contendo derme e epiderme associadas, utilizando diferentes tipos de matrizes biológicas ?
- É possível obter uma pele humana reconstruída *in vitro*, contendo derme e epiderme associadas, sem a utilização de nenhum tipo de matriz biológica ?
- Qual(is) o(s) melhor(es) tipo(s) de matriz(es) para obtenção de uma derme humana reconstruída *in vitro*, entre as utilizadas neste estudo ?
- Há semelhança (compatibilidade) entre a pele humana reconstruída *in vitro* obtida com a pele humana *in vivo*?
- Qual o tempo necesário para se obter uma pele humana reconstruída *in vitro* e em quais dimensões?

3- REVISÃO DE LITERATURA

Desde o inicio da história da civilização há relatos de tentativas para se curar feridas abertas na pele. O homem de Neanderthal da região do Iraque já tratava de queimaduras com extratos de plantas, cerca de 60.000 anos a.C. (SCARBOROUGH, 1983). Os egípcios fizeram uso de encantamentos e de uma mistura de látex, leite de cabra e leite humano. Nos papiros Smith, que datam de 1.500 anos a.C., há relatos de misturas de vários tipos de cascas de limão molhadas em preparações oleosas. Os chineses, entre o sexto e quinto séculos a.C., usaram tinturas e extratos feitos de folhas de chá. Na velha Roma, foram utilizados estranhos métodos, entre os quais um, descrito por Celsus, que consistia em uma mistura de mel e farelo e, mais tarde, cortiça e cinzas; Plínio acreditava que era melhor deixar as queimaduras expostas ao ar do que cobri-las com pomadas, e Galeno sugeriu o uso de vinagre ou vinho. No século IX, Rhases, um famoso médico árabe, recomendou o uso de água fria para o alívio da dor (ARTZ, 1980). Ambroise Paré (1517-1590) recomendava o uso de diversos tipos de pomadas, conforme relatado em um dos primeiros livros dirigidos às queimaduras, publicado por William Clowes, de Londres, em 1596, e, depois, por Vander Elst, em 1964 (VANDER ELST, 1964). O uso de curativos feitos de algodão e lã foi descrito por Syme, em 1827. Muitos medicamentos locais foram usados em feridas no início do século XX. Edward Clark Davidson (1894-1933) iniciou o uso de spray de ácido tânico em 1925; ele acreditava que esta técnica diminuía a perda de líquidos, aliviava a dor e produzia uma cicatriz mais limpa. Em 1944, após ser constatado que o ácido tânico era tóxico para o fígado, seu uso foi abandonado (ARTZ, 1980). Aldridge, em 1933, sugeriu o uso de violeta de genciana como agente esclerosante, sendo posteriormente adicionado nitrato de prata a cinco por cento como um esclerosante adicional. Em Chicago, em 1942, Harvey Allen popularizou o uso de gaze petrolada nos curativos, combinada à imobilização (ALLEN e KOCH, 1942). Na Grã-Bretanha, em 1949, Wallace, de Edinburgh, reintroduziu o método aberto para o tratamento de queimaduras (WALLACE, 1949). Douglas Lindsey, após a Guerra da Coréia, baseado em estudos de Liedberg, Ress e Artz, que relatavam infecções locais e septicemia por estafilococos em queimaduras, julgou que um dos melhores agentes antibacterianos locais nas feridas fosse o Sulfamylon. Charles Fox, de New York, em 1967, combinou a sulfa e a prata em um composto conhecido como sulfadiazina de prata, que é largamente utilizado até os dias atuais (ARTZ, 1980; SILVA, 1992).

Considera-se que Tilemaker, da Índia, tenha sido o primeiro a relatar enxertos de pele. Gaspare Taglicozzi (1546-1599) fez alguns enxertos em narizes. Hoffacker, no século XVIII, reimplantou 16 narizes. Bunger, em 1823, colocou retalhos da coxa no nariz, e Mason, em Boston, fez o mesmo em 1843. O primeiro enxerto de epiderme foi feito por Reverdin, cirurgião suíço, em 1869, que relatou a transferência de dois pequenos pedaços de epiderme em um paciente que havia perdido a pele do polegar. Em 1872, Ollier relatou sucesso com peças maiores e mais grossas de pele. Thiersch, em 1874, descreveu o uso de peças mais profundas da pele, contendo derme. Na Escócia, em Glasgow, em 1875, Wolfe relatou a reparação de um defeito na pálpebra inferior com um retalho livre de espessura total, proveniente do braço. Em 1914, John Staige Davis descreveu um enxerto de pele fina com uma área central de espessura total, que ficou conhecido como enxerto em tenda de campanha e foi o principal método de cobertura para queimaduras de espessura total até 1930. A partir daí, grandes enxertos em folha, de espessura parcial, passaram a serem retirados, manualmente, por inúmeros cirurgiões, que aprenderam a manusear uma lâmina longa e fina, chamada lâmina de Ferris; na Inglaterra, uma lâmina semelhante, com um cilindro na frente, passou a ser utilizada (lâmina de Humby), e seu uso foi popularizado por Blair e Brown, nos Estados unidos da América. Em 1939, o popular dermátomo do tipo tambor foi desenvolvido por Padgett e Hood, na Universidade do Kansas, o que permitiu a Harry M. Brown conceber o dermátomo elétrico, durante a segunda guerra mundial. Com o dermátomo elétrico, fragmentos extensos de pele passaram a serem obtidos de maneira fácil e rápida para enxertia. Hargest modificou o motor elétrico de Brown, em 1965, substituindo-o por um motor movido a ar, aumentando a velocidade da lâmina e possibilitando cortes mais suaves (ARTZ, 1980).

Segundo VON MANGOLDT[1] (1895), transplantes de células epiteliais, em matrizes apropriadas, demonstraram serem efetivos na cobertura de ulcerações de pele antes mesmo de 1895.

[1] VON MANGOLDT F. *apud* HORCH R. E.; BANNASCH H.; KOPP J.; ANDREE C.; STARK G. B. Single-cell suspensions of cultured human keratinocytes in fibrin-glue reconstitute the epidermis. **Cell Transplantation**, 7(3): 309-17, 1998.

CARREL[2] (1910), demonstrou que enxertos de pele em áreas com perda de pele, realizados precocemente, representavam um meio efetivo na redução da contração cicatricial do ferimento, mas forneciam resultados variáveis dependendo da espessura e do local de origem desses enxertos.

Na segunda metade do século XX, além do grande desenvolvimento de curativos e de técnicas cirúrgicas que passaram a possibilitar a realização de enxertos de pele de forma mais segura e eficaz, desenvolveu-se, de forma espetacular, o interesse pela engenharia de tecidos. A bioengenharia integra a Física, a Química e a Matemática com princípios de engenharia, direcionando-as para o estudo da Biologia, Medicina, Odontologia e Saúde de uma forma geral; ela aperfeiçoa conceitos fundamentais, traduz conceitos do nível molecular para o orgânico, e desenvolve e fabrica inovações biológicas, aperfeiçoando biomateriais, processos, implantes médicos e dentários para promover a saúde, prevenir doenças, criar e aperfeiçoar diagnósticos e tratamentos para melhorar a saúde de todas as pessoas (SLAVKIN et al., 1999).

Aos poucos, com o desenvolvimento da biologia molecular e da engenharia de tecidos foi sendo observado que, para se obter tecidos complexos em laboratório, era necessário reproduzir *in vitro* condições encontradas *in vivo*. A primeira descrição de cultura de queratinócitos foi feita por BILLINGHAM e REYNOLDS[3] (1952). Em 1975, PRUNIÉRAS (1975) publicou trabalho sobre técnicas de culturas de células de pele. Ainda em 1975, RHEINWALD e GREEN (1975) publicaram um dos primeiros trabalhos descrevendo uma técnica de cultura de queratinócitos levando à formação de um equivalente epidérmico rudimentar (queratinócitos em múltiplas camadas, com presença de queratinização discreta nas camadas superficiais). GREEN et al. (1979) levantaram a possibilidade do uso desse equivalente epidérmico obtido em laboratório a partir da cultura de queratinócitos isolados como enxerto *in vivo*.

---

[2] CARREL A. *apud* EL-SHEEMY M. A.; MUIR I. F.; WHEATLEY D. N.; EREMIN O. Inhibition of the contraction of collagen gels by extracts from human dermis. **Cell Biol Internat**, 25(7): 635-42, 2001.

[3] BILLINGHAM R. E.; REYNOLDS J. *apud* HERSON M. R.; MATHOR M. B.; ALTRAN S.; CAPELOZI V. L.; FERREIRA M. C. *In vitro* construction of a potential skin substitute trough direct human keratinocyte plating onto decellularized glycerol-preserved allodermis. **Artif Organs**, 25(11): 901-6, 2001.

O primeiro método laboratorial que sugeriu recombinar elementos dérmicos e epidérmicos *in* vitro foi descrito por FREEMAN et al. (1976). Nesse método, pequenas amostras de pele humana eram cultivadas sobre pedaços de pele porcina morta. Esses pedaços de pele de porco eram retirados como enxertos finos de pele com um dermátomo elétrico e, então, esterilizados por exposição a raios gama. Para iniciar uma cultura, uma amostra de pele porcina morta era cortada com uma tesoura e colocada sobre uma grelha metálica, com a epiderme voltada para baixo, de tal forma que a derme profunda (reticular) ficava exposta. Sobre essa derme, eram colocados pedaços de pele humana (enxertos finos) "viva", de aproximadamente 2,0 X 2,0 mm. As grelhas contendo a pele porcina morta com as amostras de pele humana sobre elas eram então colocadas em placas de Petri, com meio de cultura para crescimento celular suficiente para cobrir todas as grelhas e embeber a pele porcina, mantendo o sistema em interface ar-líquido. Com isso, as células epidérmicas humanas iniciavam seu crescimento ao redor das amostras de pele humana. Após cerca de 2 a 3 semanas, essas células epidérmicas cobriam totalmente a pele (derme) porcina morta e a pele humana inicialmente colocada sobre a pele porcina se destacava. Fibroblastos não se desenvolviam nesse tipo de cultura celular.

O sistema demonstrado por FREEMAN et al. (1976), embora bastante interessante, foi bastante criticado, uma vez que as células epidérmicas *in* vivo não crescem sobre a derme reticular (profunda) e não sofrem maturação (presença intracelular de grânulos de glicogênio) sem contato com a membrana basal.

Baseado nisso, RÉGNIER et al. (1981), modificaram e aperfeiçoaram o trabalho de FREEMAN et al. (1976), realizando culturas de queratinócitos humanos sobre uma derme porcina morta em que era mantida a lâmina basal. O cultivo, portanto, era realizado sobre a membrana basal presente na derme lamelar, simulando condições bem mais próximas àquelas encontradas *in vivo*. Com esse trabalho, RÉGNIER et al. (1981) conseguiram obter uma epiderme humana reconstruída *in vitro* com várias camadas, incluindo a camada córnea, e demonstraram a presença intracelular de glicogênio em queratinócitos nas camadas epidérmicas intermediárias (camadas espinhosa e granulosa). Demonstraram, também, que era fundamental manter as células em uma interface ar-líquido para que a síntese de queratinas fosse possível.

PRUNIÉRAS et al. (1983) descreveram um método de cultivo de queratinócitos humanos *in vitro*, expondo as células epidérmicas a uma interface ar-líquido, sobre um substituto dérmico que consideraram mais fisiológico que a derme lamelar de porcos. O substituto escolhido foi uma derme humana morta desepidermizada (DED). Para a obtenção dessa DED, pequenos fragmentos de pele humana, retirados como enxertos finos de pele, eram colocados em soro fetal bovino por cerca de 10 dias e, então, com o uso de uma pequena espátula, a epiderme era raspada mecanicamente e totalmente separada da derme.

A DED era então colocada sobre grelhas metálicas e, sobre ela eram colocadas células epidérmicas (queratinócitos) em suspensão, previamente cultivadas, e o sistema era mantido em interface ar-líquido, como descrito no método descrito por FREEMAN et al. (1976). Assim, sobre essa DED, foi possível desenvolver uma epiderme humana perfeitamente diferenciada, com maturação celular (grânulos intracelulares de glicogênio), hemidesmossomos e filamentos extracelulares de adesão ("gap junctions"), ao contrário do observado no método de FREEMAN et al. (1976).

PRUNIÉRAS et al. (1983) relataram a importância da adição de cálcio aos meios de cultura, na concentração de 1.5 mM, para que ocorresse a formação de uma epiderme completamente diferenciada (múltiplas camadas). Mais tarde, estudos desenvolvidos por BESSOU et al. (1995) e HOELLER et al. (2001) reforçaram a importância da presença de íons cálcio nos meios de cultura para a formação da epiderme, além da exposição dessa epiderme ao ar (interface ar-líquido) durante a gênese tecidual, para que ocorresse a formação da camada córnea. SUPP et al. (1999) demonstraram que a restauração funcional da epiderme *in vitro* (queratinização, fornecendo função de barreira mecânica) é estimulada por exposição tecidual ao ar (interface ar-líquido), com incubação em condições de baixa umidade.

BESSOU et al. (1995) demonstraram a possibilidade de se obter uma epiderme humana reconstruída *ex vivo*, com queratinócitos e melanócitos, que colocados sobre uma DED (similar ao demonstrado por PRUNIÉRAS et al., 1983), com uma razão de 1:20 entre melanócitos e queratinócitos, formavam uma epiderme bem diferenciada, com melanócitos normais, que mantinham seu potencial de produzir melanina sob estimulação de radiação UVB.

RÉGNIER et al. (1997) introduziram células de Langerhans no modelo proposto por BESSOU et al. (1995), durante a formação da epiderme, obtendo, assim, uma epiderme humana reconstruída *in vitro* com função imunitária. Essas células de Langerhans foram obtidas através do isolamento de células progenitoras hematopoiéticas de sangue de cordão umbilical, que depois eram induzidas a se diferenciarem em células dendríticas (Langerhans) por fator estimulante de colônias de macrófagos (GM-CSF) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α). M*odelos* de epiderme humana reconstruída *in vitro* contendo células de Langerhans também podem ser obtidos isolando-se essas células a partir de sangue periférico, conforme demonstraram RÉGNIER et al. (1998).

BOLÍVAR-FLORES e KURI-HARCUCH (1999) obtiveram sucesso ao tratarem dez pacientes portadores de ulcerações crônicas de pele em membros inferiores, decorrentes de estase venosa ou diabete, com células epidérmicas humanas alogênicas congeladas, provenientes de culturas celulares. Segundo TERSKIKH e VASILIEV (1999), em muitos casos, aloenxertos de queratinócitos provenientes de culturas celulares promovem o fechamento de ulcerações de pele através de estimulação da epitelização autógena no leito da ferida pelas células alógenas.

RONFARD et al. (1991) utilizaram cola de fibrina como suporte biológico para enxerto de queratinócitos em 2 pacientes vítimas de queimaduras, resultando em epitelização das áreas afetadas, com formação de epidermes estratificadas e bem diferenciadas. HORCH et al. (1998), utilizando uma malha de cola de fibrina com queratinócitos humanos cultivados em seu interior, compararam, em ratos, a integração e qualidade desse substituto de pele com enxertos de pele humana convencionais, demonstrando uma epitelização mais rápida do que com o uso de enxertos convencionais e com mesmo índice de contração do leito receptor. HORCH et al. (2001) aplicaram queratinócitos suspensos em cola de fibrina (Tisseel®) sobre úlceras crônicas de pele em dez pacientes, obtendo fechamento completo ou próximo disso em praticamente todos. RONFARD et al. (2000) demonstraram que uma epiderme reconstruída a partir de células autólogas (queratinócitos) associadas a uma matriz de fibrina tem a capacidade de se renovar e se auto-reparar por anos.

O conceito de uma derme artificial foi introduzido por YANNAS et al. (1977), que idealizaram uma pele artificial de estrutura bilaminar, composta por um filme de silicone denso e por uma esponja porosa de colágeno contendo condroitina-sulfato. O uso dessa pele artificial para aplicação clínica em defeitos de pele (feridas) foi inicialmente desenvolvido por YANNAS e BURKE (1980), YANNAS et al. (1980), DAGALAKIS et al. (1980) e por BURKE et al. (1981). Foi observado que a membrana densa de silicone agia como um obstáculo, prevenindo infecções bacterianas e controlando a perda de fluidos corporais, e que a esponja de colágeno e condroitina-sulfato era biodegradável e permitia o influxo de fibroblastos dérmicos a partir do leito da ferida (BURKE, 1983).

LEE et al. (2001), em um importante trabalho de revisão, discutiram as aplicações biomédicas do colágeno, lembrando a possibilidade de seu uso como lentes oftalmológicas de proteção (KAUFMAN et al., 1994), esponjas para cobertura de queimaduras / ferimentos (RAO, 1995), confecção de placas para contenção protéica (LUCAS et al., 1989), gel combinado com lipossomas para envoltório de medicamentos (FONSECA et al., 1996), meio físico de contenção de material para aplicação transdérmica (THACHARODI e RAO, 1996), e como nanopartículas para transferência de genes (ROSSLER et al., 1995). Revisaram ainda a utilização do colágeno como sutura cirúrgica (MILLER et al., 1964), como agente hemostático (CAMERON, 1978; BROWDER e LITWIN, 1986), e como material para reconstrução tecidual, incluindo matrizes básicas de colágeno para cultura de células (KEMP, 2000) e alternativas / substitutos para vasos e válvulas sanguíneos artificiais (CHVAPIL et al., 1993; AUGER et al., 1998; HUYNH et al., 1999).

Conforme relatado por JEROME & RAMSHAW (1992); RAO (1995); FRIESS (1998); FUJIOKA et al. (1998), entre as vantagens do uso do colágeno como biomaterial encontram-se:

- Estar disponível em abundância na natureza e ser facilmente purificado de organismos vivos;
- Ter baixa antigenicidade;
- Ser biodegradável e bioabsorvível;

- Não ser tóxico e ser biocompatível;
- Ter atividade sinérgica com componentes bioativos;
- Possuir propriedade hemostática (promove coagulação sanguínea);
- Pode ser fisicamente formulado de diversas maneiras;
- Ser compatível com polímeros sintéticos.

Ainda, segundo os mesmos autores (JEROME & RAMSHAW, 1992; RAO, 1995; FRIESS, 1998; FUJIOKA et al., 1998), entre as desvantagens do uso do colágeno como biomaterial encontram-se:

- Alto custo do colágeno tipo I puro;
- Grande variabilidade no tamanho das fibras e traços de impureza em diferentes amostras do mesmo tipo de colágeno;
- Hidrofilicidade que resulta em rápida degradação;
- Efeitos adversos, como encefalopatia bovina e mineralização.

KIM et al. (1999) sintetizaram um substituto artificial de pele utilizando uma esponja de colágeno com duas superfícies de diferentes densidades e com poros de diferentes diâmetros. Na camada mais profunda da esponja foram injetados fibroblastos e na superfície foram semeados queratinócitos. O sistema foi então mantido em interface ar-líquido e aproximadamente cinco dias após havia cerca de 10 camadas de queratinócitos e os fibroblastos ocuparam todo o interior da esponja de colágeno.

KREMER et al. (2000) realizaram estudo demonstrando que um substituto dérmico constituído de colágeno bovino, condroitina-6-sulfato e uma membrana de silicone manufaturada (Integra®), com queratinócitos humanos semeados em sua superfície, induziu a formação de um substituto de pele que, quando enxertado em ratos, levou à formação de uma epiderme perfeitamente diferenciada, com pouca contração do enxerto. A aplicação do

Integra®, previamente à realização de um enxerto de pele autógeno, para correção de contratura cervical anterior em pacientes vítimas de queimadura, induziu a formação de uma neoderme, com características histológicas e biomecânicas semelhantes às da derme humana normal, fornecendo resultados cosméticos superiores ao uso de enxertos autólogos isolados, segundo HUNT et al. (2000).

GALASSI et al. (2000), realizaram cultivo de fibroblastos *in vitro* dentro de uma matriz dérmica composta de benzil-éster de ácido hialurônico (HYAFF®) e, posteriormente, enxertaram esse substituto dérmico obtido em dois pacientes (um com uma ferida cirúrgica pós-ressecção de epitelioma em escalpo e outro com uma úlcera sacral de decúbito), com formação de nova derme e fechamento completo das feridas, no primeiro caso após enxertia de epiderme sobre a neoderme e no segundo caso por epitelização a partir das bordas da derme neoformada.

Em ferimentos de espessura total da pele (epiderme, derme e tecido celular subcutâneo), a utilização de uma membrana de colágeno bovino tipo I (Collatemp-Fascie®) provoca o influxo de células endoteliais e mesenquimais para dentro da membrana, de tal forma que em 7 dias ocorre a neovascularização dessa membrana e, em 42 dias está formada uma neoderme, com fibroblastos em toda sua espessura, conforme demonstrado por JANSSON et al. (2001).

Enxertos finos de pele são vascularizados (após a enxertia) por uma combinação de processos, que incluem inoculação e neovascularização. Inoculação é a anastomose de capilares do leito da ferida do receptor aos diversos vasos terminais da derme do enxerto, e esse é tido como o mecanismo da vascularização precoce do enxerto (YOUNG et al., 1996). A neovascularização é o crescimento de novos capilares do leito da ferida para dentro do enxerto de pele, e esse processo ocorre mais tardiamente; estudos indicam que células endoteliais do hospedeiro (receptor) não aparecem nos capilares dérmicos do enxerto antes de uma semana após a enxertia (YOUNG et al., 1996). A vascularização de substitutos de pele cultivados em laboratório, quando enxertados *in vivo*, ocorre somente através do processo de neovascularização, e isso contribui muito para a perda desses substitutos, uma vez que há aumento do tempo para re-perfusão, isquemia mais prolongada e conseqüente privação de nutrientes e oxigênio para as células enxertadas (BOYCE et al., 1996). SUPP et al. (2000), modificaram geneticamente queratinócitos

cultivados *in vitro*, através da utilização de um retrovírus (citomegalovírus) que promoveu a produção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) pelo ácido ribonucléico (RNAm) desses queratinócitos. O VEGF é expresso pelos queratinócitos normais durante o fechamento de uma ferida, ao longo do período de neovascularização da pele (FRANK et al., 1995). Como o VEGF secretado pelos queratinócitos epidérmicos tem um efeito mitogênico nas células endoteliais da microvasculatura dérmica (DETMAR et al., 1995), a modulação dos níveis de VEGF na epiderme pode acelerar e potencializar a vascularização da pele. Baseados nesses conhecimentos, SUPP et al. (2000), idealizaram um substituto dérmico composto de fibroblastos e queratinócitos modificados, capazes de expressar VEGF, que quando enxertado em ratos atímicos, exibiu um grande número de vasos dérmicos (neovascularização) em curto período de tempo (três dias) quando comparado com controles com queratinócitos não modificados geneticamente (10 a 14 dias).

MILLER et al. (2000) demonstraram que não se justifica a realização de culturas celulares para todos os pacientes que são vítimas de queimaduras nas primeiras 24 horas, devido ao seu alto custo, sendo a indicação desse tipo de tratamento restrita.

HOELLER et al. (2001) conseguiram obter um substituto de pele contendo derme e epiderme associadas em 14 dias, partindo da polimerização de colágeno líquido com fibroblastos em seu interior e implante de folículos pilosos na superfície desse colágeno.

O dermatan sulfato proteoglicano II (DSPG II) e sua proteína central, decorina, presentes na derme humana, foram identificados por MUIR et al. (1997) e por STEWART et al. (2001), como diretamente envolvidos na inibição da proliferação dos fibroblastos em ferimentos em cicatrização, prevenindo, assim, a formação de tecidos de granulação ou cicatrizes hipertróficas. EL-SHEEMY et al. (2001) demonstraram que uma matriz de colágeno mantida em meio de cultura, com fibroblastos humanos em seu interior, sofre uma contração (causada pelo crescimento e multiplicação dos fibroblastos em seu interior) acentuadamente menor quando exposta a um extrato da derme a partir da qual esses fibroblastos foram originalmente obtidos; reforçaram, assim, a teoria de haver na própria derme humana substâncias que regulam não só a multiplicação e crescimento dos fibroblastos, mas também sua inibição.

MA et al. (2001), em trabalho utilizando fibroblastos fetais humanos, concluíram que, em engenharia de tecidos, materiais utilizando condroitina-sulfato associada a uma membrana de silicone densa apresentam vantagem sobre materiais utilizando somente colágeno quando se visa reconstrução de pele *in vitro*, uma vez que o colágeno sozinho permite maior contração de sua matriz pelos fibroblastos.

Segundo JOHNEN et al. (2001), o uso de membranas biodegradáveis é o tópico mais atual envolvendo sistemas para proliferação celular *in vitro* e a transferência dessas células para um determinado ferimento; o crescimento de queratinócitos e fibroblastos *in vitro*, originários de um mesmo espécime, apresenta vantagens para ambos os tipos celulares.

Embora os mecanismos de ação de um tecido (pele) obtido por bioengenharia e colocado sobre um ferimento não sejam perfeitamente claros, foi levantada a hipótese de que as células vivas dentro de substitutos artificiais de pele sejam "inteligentes" em termos de bioengenharia. Este conceito sugere que as células são capazes de distinguir e se adaptarem ao meio ambiente em que se encontram, e de agirem apropriadamente em relação ao reparo do tecido em que se encontram, regulando a dose e a seqüência de mediadores (interleucinas) produzidos, e o momento exato de liberação de citocinas e fatores de crescimento celulares, como sugerido por trabalhos de FALANGA et al. (1998), PHILLIPS (1998) e FALANGA (2000). FALANGA et al. (2002), utilizando um substituto dérmico (HBSS, Organogenesis, Canton, MA, USA; licenciada pela Novartis Pharmaceuticals, East Hanover, NJ, USA) contendo componentes dérmicos (fibroblastos) dentro de uma membrana de colágeno compacta sob uma epiderme corneificada, demonstraram que um substituto dérmico contendo células vivas é capaz de expressar respostas celulares e moleculares após lesões teciduais *in vitro*, comparáveis às respostas observadas *in vivo*, e sugerem que a cicatrização acelerada observada em ferimentos *in vivo*, nos quais são utilizados substitutos de pele contendo células vivas, se deva à habilidade desses substitutos em produzir citocinas e fatores de crescimento celulares.

Ainda em 1999, RADHIKA et al., utilizando diferentes tipos de matrizes de colágeno bovino, demonstraram que as células (queratinócitos e fibroblastos) que foram cultivadas no interior dessas matrizes não apresentavam alterações morfológicas e de suas propriedades bioquímicas e funcionais.

STOCK e VACANTI (2001), em um trabalho de revisão sobre engenharia de tecidos, confirmaram que a abordagem mais atual e com melhores perspectivas para se obter tecidos complexos em laboratórios é o uso de matrizes biodegradáveis para servirem de "moldes" para direcionarem o crescimento celular. Estas matrizes são normalmente preenchidas com células vivas, derivadas de biópsias ou de células pluripotentes, que se proliferam, organizam e produzem matrizes celular e extracelular. Durante a formação das matrizes celular e extracelular pelas células, a matriz artificial inicial ("molde") é degradada, absorvida ou metabolizada.

PONEC et al. (2001), concluíram que para que um equivalente de pele humana seja utilizado para propósitos científicos, entre os pré-requisitos básicos encontram-se:

- A formação, na epiderme, de um estrato córneo *in vitro*, constituindo uma barreira mecânica semelhante àquela encontrada *in vivo;*
- A produção de corpúsculos lamelares de glicogênio intracelulares, que devem estar presentes na camada granulosa da epiderme;
- Aspecto lamelar (cuticular) da epiderme.

WELSS et al. (2004), em trabalho de revisão, relataram que o parâmetro mais utilizado para se testar a toxicidade de substâncias aplicadas em equivalentes de pele *in vitro* é a medida da viabilidade celular e da integridade das membranas celulares. Entretanto, observaram que o "European Center for the Validation of Alternative Methods", órgão europeu responsável pelo desenvolvimento de novos métodos para testes de substâncias, concluiu que a citotoxicidade *in vitro*, isoladamente, não demonstra a real toxicidade de uma substância, e que, testes mais específicos, com dosagens de biomarcadores (citocinas, por exemplo), devem ser realizados. Entre esses testes, verificaram que as dosagens de interleucinas 1, 6, 8 e 10, de fator de necrose tumoral e de metabólitos do ácido aracdônico, como prostraglandinas, tromboxanos e leucotrienos, representam excelentes opções.

Segundo WELSS et al. (2004), a dermatite de contato, com manifestações clínicas que variam desde eritema local até dor e edema generalizado, é um dos efeitos adversos à exposição de substâncias tópicas mais observados em humanos. Em virtude disso, novos produtos químicos, de uso tópico, são inicialmente avaliados quanto aos seus potenciais alergênicos, através da aplicação em animais. Ainda, segundo os mesmos autores (WELSS et al., 2004), como esses testes em animais podem causar-lhes desconforto e dor, tem sido cada vez mais freqüente a proibição de pesquisas envolvendo seres vivos, o que tem estimulado muito o uso de equivalentes de pele *in vitro* para a realização desses testes.

POUMAY et al. (2004), descreveram um método para obtenção de uma epiderme humana reconstruída *in vitro*, a partir da cultura de queratinócitos de diferentes doadores sobre uma membrana de policarbonato, sem a presença de substitutos e/ou elementos dérmicos. Relataram a utilização dessa epiderme, constituída somente de queratinócitos, para estudos *in vitro* da toxicologia de duas substâncias, uma irritante (benzalcônio cloridro) e outra sensibilizante (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno). A toxicidade dessas substâncias foi medida através da viabilidade celular e da dosagem de interleucinas 1 e 8 (ELISA) após a aplicação dessas substâncias, na camada córnea da epiderme.

EHRLICH (2004) relatou bons resultados no fechamento de ferimentos de pele em ratos, utilizando uma matriz de colágeno com fibroblastos cultivados em seu interior e queratinócitos depositados sobre essa matriz. Concluiu haver grande facilidade na integração do equivalente de pele enxertado no leito receptor em ratos, o que não é observado em humanos, mas não conseguiu elucidar o porquê dessa diferença.

MARGULIS et al. (2004) descreveram método para obtenção de um equivalente de pele que apresentou arquitetura tecidual semelhante à observada *in vivo*; relataram como realizar culturas isoladas de queratinócitos e fibroblastos e como formar um equivalente de pele a partir da cultura simultânea de fibroblastos dentro de um gel de colágeno e de queratinócitos sobre esse gel.

Em 2004, NAVSARIA et al. publicaram descrição de uma técnica de reepitelização completa, com formação de folículos pilosos, utilizada em um paciente com queimadura de escalpo. Tal técnica baseou-se na colocação de uma matriz de colágeno

(Integra®) sobre o leito da queimadura, e posterior enxertia de folículos pilosos sobre a neoderme formada, 12 dias após, utilizando-se técnica de micro-enxertos para folículos pilosos. A epitelização completa de metade do escalpo ocorreu 28 dias após a queimadura. Os autores acreditam que a epitelização ocorreu a partir das células pluripotentes presentes nos folículos pilosos, resultando em um epitélio que expressou citoqueratinas 1 e 10 (marcadores para epiderme maturada presentes em pele normal) e não expressou citoqueratinas 6 e 16 (marcadores para hiperproliferação epitelial presentes em ferimentos mas não na pele normal) após 1 ano de enxertia (NAVSARIA et al., 2004).

REHDER et. al (2004) publicaram um trabalho em que descreveram técnica para obtenção de uma epiderme humana reconstruída *in vitro* perfeitamente diferenciada, a partir da cultura de queratinócitos e melanócitos sobre uma derme humana morta desepidermizada.

4- MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho de pesquisa foi realizado no Laboratório de Cultura de Células da Pele e Epiderme Reconstruída da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM/UNICAMP – Campinas, São Paulo, Brasil).

4.1- Coleta de material e aspectos éticos

As peles foram obtidas de pacientes submetidas a mamoplastia ou abdominoplastia atendidas pela Disciplina de Cirurgia Plástica da FCM/UNICAMP. Este procedimento foi aprovado e está em conformidade com as normas do Comitê de Ética da FCM/UNICAMP e com a Declaração de Helsinki de 1975, aperfeiçoada em 1983 (item 10. ANEXO).

4.2- Preparação das amostras de pele para culturas celulares

Os fragmentos de pele, de aproximadamente 2,0 por 1,0 cm, após serem coletados, foram acondicionados em frasco estéril e conservados em soro fisiológico 0,9% a 4^{o}C, não ultrapassando 12 horas até sua manipulação.

Os fragmentos foram separados do tecido adiposo e colocados em frascos com solução de Hanks (Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS), GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA, cat. 14025-092) + antibiótico e antimicótico (penicilina G sódica, estreptomicina e anfotericina B – GIBCO cat. 15240-062). Cortou-se a pele em pequenos fragmentos de 1 a 2 mm.

Colocaram-se os fragmentos de pele em placas de Petri com tripsina 0,25% (Trypsin EDTA – GIBCO cat. 25200-056) e foram mantidos em incubadora, a 37ºC, com 5% de tensão de CO_2, por 4 horas, separando-se, então, a derme da epiderme.

Neutralizou-se a tripsina com soro fetal bovino (GIBCO cat. 10437-028) (Figura 1). O sobrenadante (contendo as células dérmicas e epidérmicas) foi recuperado, passado em filtro de nylon (Falcon) de 40 μm e centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos.

O precipitado (células) foi lavado com solução de Hanks + antibiótico e antimicótico, e novamente centrifugado.

Retirou-se uma alíquota para contagem manual das células em câmara de Neubauer pelo método de exclusão com azul de trypan (Figura 2).

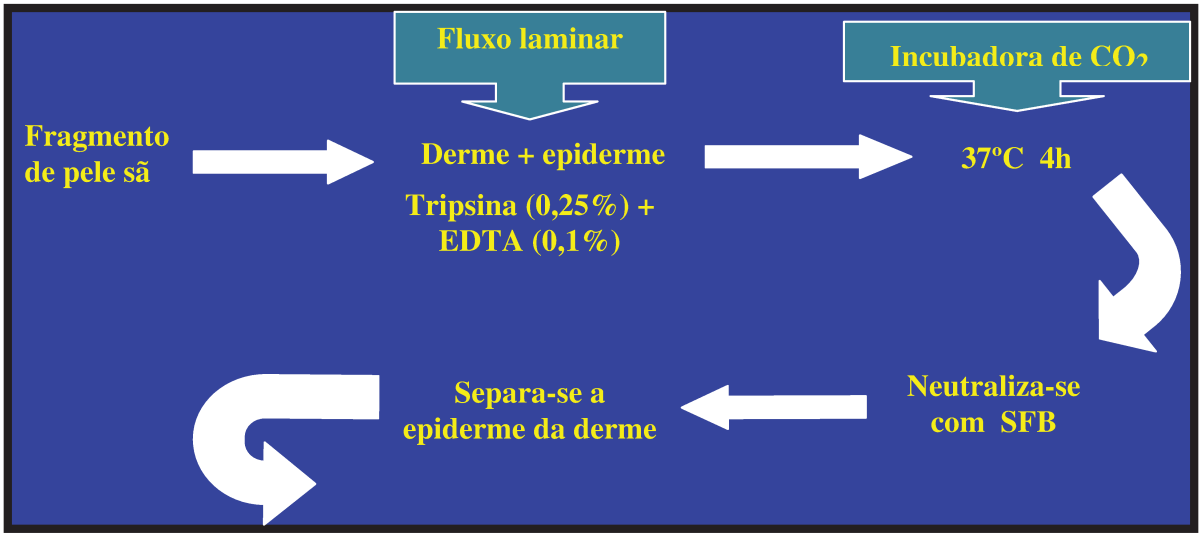


Figura 1 – Esquema de preparação das amostras de pele para culturas celulares (Parte I)

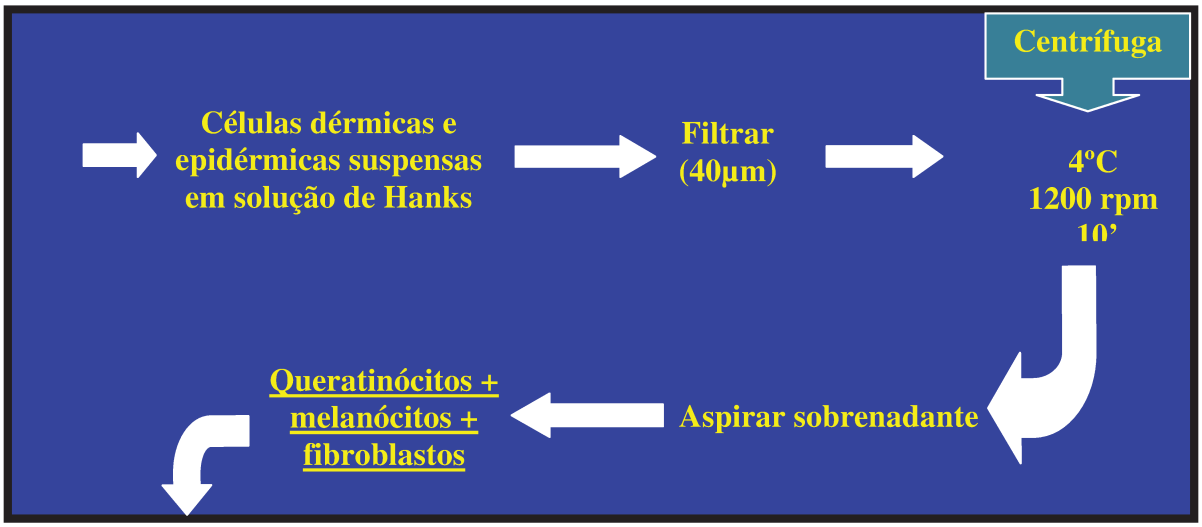


Figura 2 - Esquema de preparação das amostras de pele para culturas celulares (Parte II - continuação)

4.3- Culturas celulares

Após a contagem, as células foram distribuídas em frascos de cultura, com 1,0 X 10^5 células por cm^2 e, então, incubadas a 37ºC, com tensão de 5% de CO_2, em meios de crescimento específicos para cada tipo celular (queratinócitos, melanócitos e fibroblastos).

4.3.1- Cultura de queratinócitos (QUADRO 1 – Figura A)

Utilizou-se meio de cultura para queratinócitos (GIBCO cat. 10785-012), suplementado com L-Glutamina 2 mM/ml, penicilina 100 UI/ml, estreptomicina 0,1 mg/ml (GIBCO cat. 10378-016) e soro fetal bovino 10% (Figura 3).

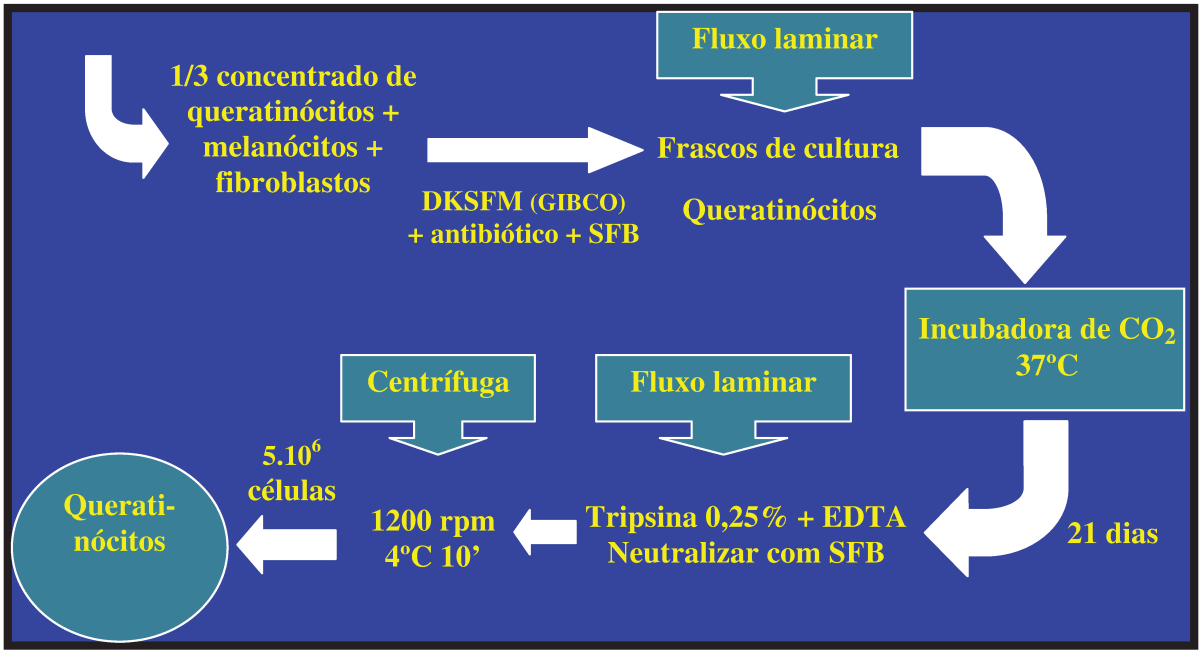


Figura 3 – Esquema de cultura de queratinócitos

4.3.2- Cultura de melanócitos (QUADRO 1 – Figura B)

Utilizou-se meio de cultura para melanócitos MCDB 153 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA, M-7403) suplementado com L-Glutamina 2 mM/ml, penicilina 100 UI/ml, estreptomicina 0,1 mg/ml (GIBCO cat. 10378-016), soro fetal bovino 10%, extrato de pituitária bovina 50 µg/ml (GIBCO cat. 13028-014), hidrocortisona 0,6 µg/ml (Sigma H-0888) e insulina bovina 3 µg/ml (GIBCO cat. 13007-018) (Figura 4).

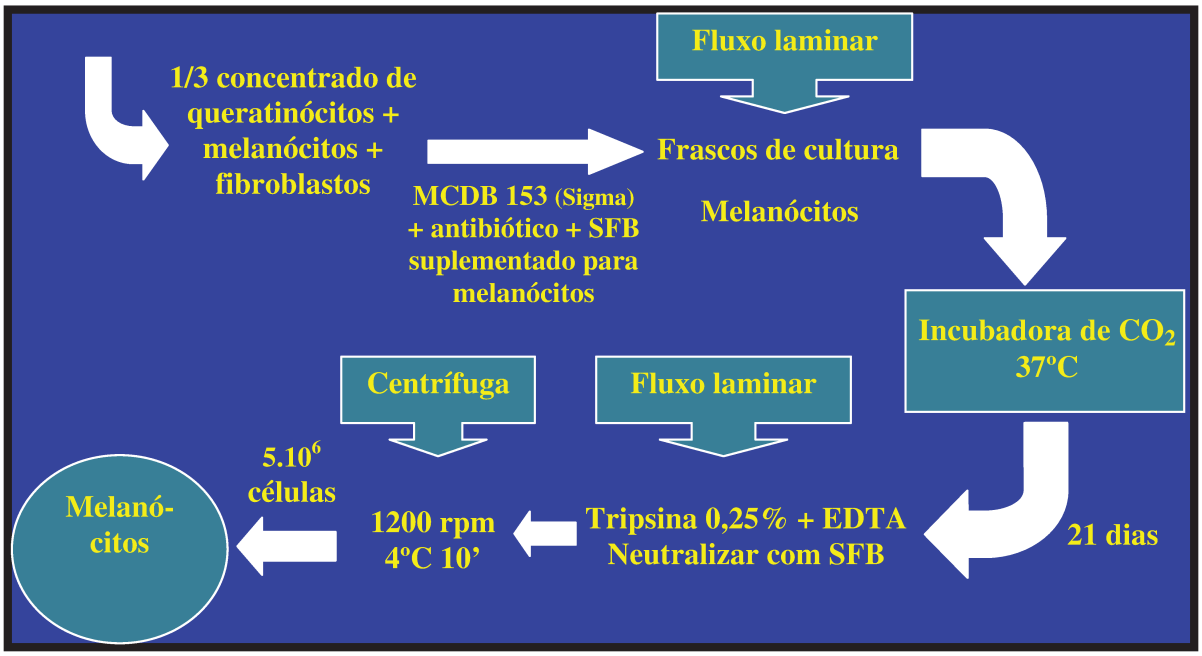


Figura 4 – Esquema de cultura de melanócitos

4.3.3- Cultura de fibroblastos (Quadro 1 – Figuras C e D)

Utilizou-se meio de cultura para fibroblastos M199 (GIBCO cat. 31100-035), suplementado com L-Glutamina 2 mM/ml, penicilina 100 UI/ml, estreptomicina 0,1 mg/ml e soro fetal bovino 10% (Figura 5).

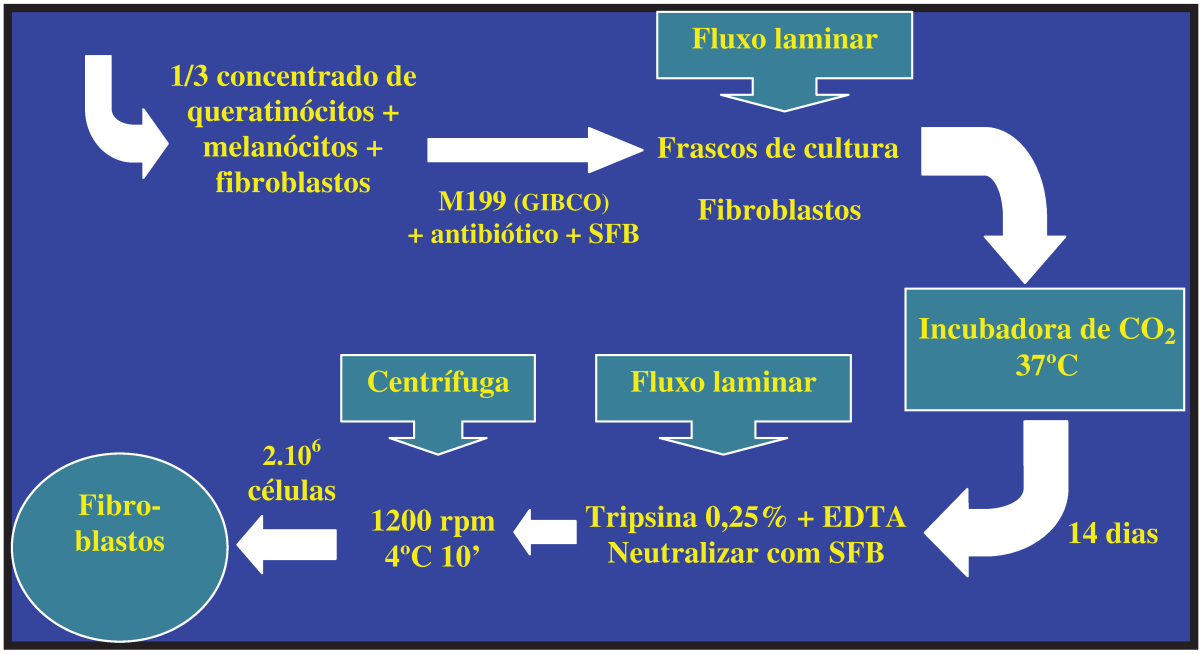


Figura 5 – Esquema de cultura de fibroblastos

Todos os meio de cultura tiveram o pH mantido ao redor de 7,8.

Os frascos foram colocados em incubadora, a 37^{o}C, com 5% de tensão de CO_2. Trocaram-se os meios de cultura 3 vezes por semana. Quando as células estavam confluentes (QUADRO 1 – Figura D), realizou-se a passagem.

4.4- Passagem celular

Realizou-se a sucção dos meios de cultura dos frascos. Adicionou-se tripsina 0,25% (Trypsin EDTA) em cada frasco de cultura. Colocou-se em incubadora, a 37^{o}C, com tensão de CO_2 de 5%, por 10 minutos.

A tripsina foi neutralizada com soro fetal bovino e colocou-se o líquido dos frascos com as células em tubo cônico de 50 ml (Falcon) para centrifugar por 10 minutos, a 1200 rpm. O meio foi aspirado e ressuspenderam-se as células na concentração desejada, já nos meios de cultura específicos. Colocaram-se as células nos frascos de cultura, em incubadora, a 37^{o}C, com tensão de CO_2 de 5%.

Em média, foram necessários 14 dias para se obterem quantidades suficientes de células (maior que 2,0 X 10^6) em cada linhagem. Em cerca de 21 dias obteve-se uma quantidade de queratinócitos e melanócitos ao redor de 5,0 X 10^6 (cada lihagem) e de 10 X 10^6 de fibroblastos (item 6. Discussão - Tabela 1).

As células podem ser congeladas em soro fetal bovino, com 10% de dimetil-sulfóxido (DMSO – Sigma), em nitrogênio líquido, e mantidas assim por tempo indeterminado. Ao serem descongeladas, apresentam viabilidade entre 70 e 80%.

QUADRO 1

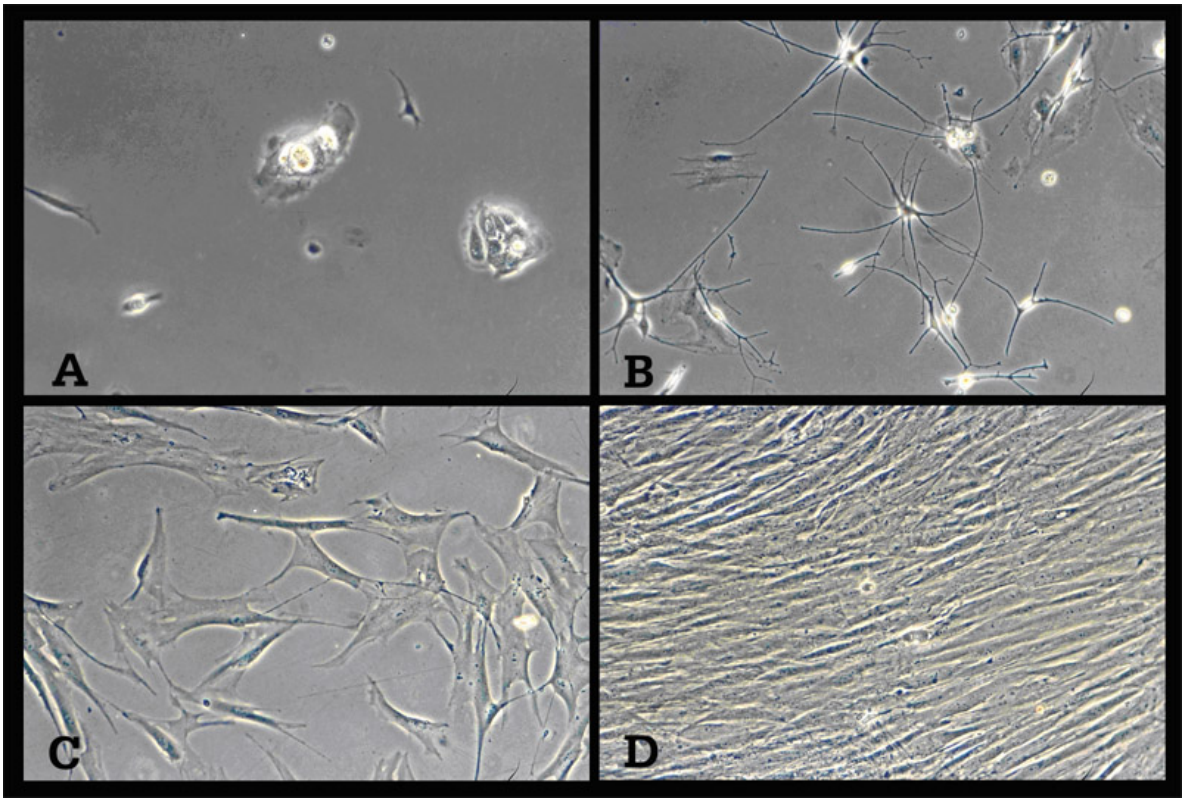


Figura A – Cultura de queratinócitos. Microscopia invertida – aumento original 200X.

Figura B – Cultura de melanócitos. Microscopia invertida – aumento original 200X.

Figura C – Cultura de fibroblastos. Microscopia invertida – aumento original 200X.

Figura D – Cultura de Fibroblastos (confluente). Microscopia invertida – aumento original 200X.

4.5- Estudos com diferentes matrizes biológicas para obtenção de derme humana reconstruída *in vitro*

Foram escolhidas diferentes matrizes para multiplicação e crescimento de fibroblastos em seus interiores, na tentativa de se obter um equivalente dérmico similar à derme humana *in vivo*. As matrizes escolhidas pertenciam todas à linha Genius, BAUMER – Divisão de Biomateriais, Mogi Mirim, São Paulo, Brasil, e foram as seguintes:

1- Matriz orgânica de osso bovino liofilizado esponjoso (Gen-ox – bloco, código 932.25), de aproximadamente 10 X 15 X 25 mm (Matriz 1);

2- Membrana biológica de pericárdio bovino (Gen-derm – código 980.S), de aproximadamente 20 X 20 mm (Matriz 2);

3- Colágeno bovino tipo I em grânulos (Gen-col, colágeno – grânulos, código 960.5), com aproximadamente 5 cm^3 (Matriz 3);

4- Colágeno bovino tipo I em bloco (Gen-col, colágeno bloco, código 961.25), de aproximadamente 10 X 15 X 25 mm (Matriz 4).

Com uma seringa, dentro de cada uma das matrizes (1, 2, 3 e 4), injetaram-se fibroblastos, na quantidade de 2,0 X 10^6, em meio de cultura M199, suplementado com L-Glutamina 2 mM/ml, penicilina 100 UI/ml, estreptomicina 0,1 mg/ml e soro fetal bovino 10% (QUADRO 2 – Figura A).

As matrizes 1, 2, 3 e 4, contendo fibroblastos em seu interior, foram colocadas, separadamente, em placas de Petri, de aproximadamente 10,0 cm^2, e submersas em meio de cultura para fibroblastos (M199), suplementado com L-Glutamina 2 mM/ml, penicilina 100 UI/ml, estreptomicina 0,1 mg/ml e soro fetal bovino 10%, e colocadas em incubadora, a 37^oC, com tensão de CO_2 de 5% (QUADRO 2 – Figura C).

O meio de cultura foi trocado 3 vezes por semana. Obteve-se uma derme humana reconstruída *in vitro* em 7 dias, com a utilização da matriz de colágeno bovino tipo I em bloco (Matriz 4).

4.6- Técnica para obtenção de pele humana reconstruída *in vitro* contendo derme e epiderme associadas

Sobre a derme humana reconstruída *in vitro* obtida com a utilização de colágeno bovino tipo I em bloco (Matriz 4), em uma placa de Petri (Corning), semearam-se células epidérmicas (relação entre melanócitos e queratinócitos 1:4) com 5,0 X 10^6 células (aproximadamente 1,0 X 10^6 melanócitos e 4,0 X 10^6 queratinócitos). O sistema foi imerso em meio de cultura constituído de 3 partes de IMDM (Iscove's Modified Dulbeccos

Medium – GIBCO cat. 12200-036) + 1 parte de meio de cultura para queratinócitos (Defined Keratinocyte Medium Serum Free– GIBCO cat. 10785-012), 10% de soro fetal bovino, e suplementado com L-Glutamina 2 mM/ml, penicilina 100 UI/ml, estreptomicina 0,1 mg/ml e Ca^{2+} 1.5 mM (QUADRO 2 – Figura B).

O meio de cultura foi trocado 3 vezes por semana. Obteve-se uma pele humana reconstruída *in vitro* contendo derme e epiderme associadas em 7 dias (já partindo da derme humana reconstruída *in vitro*) (QUADRO 2 – Figura D) (Figura 6).

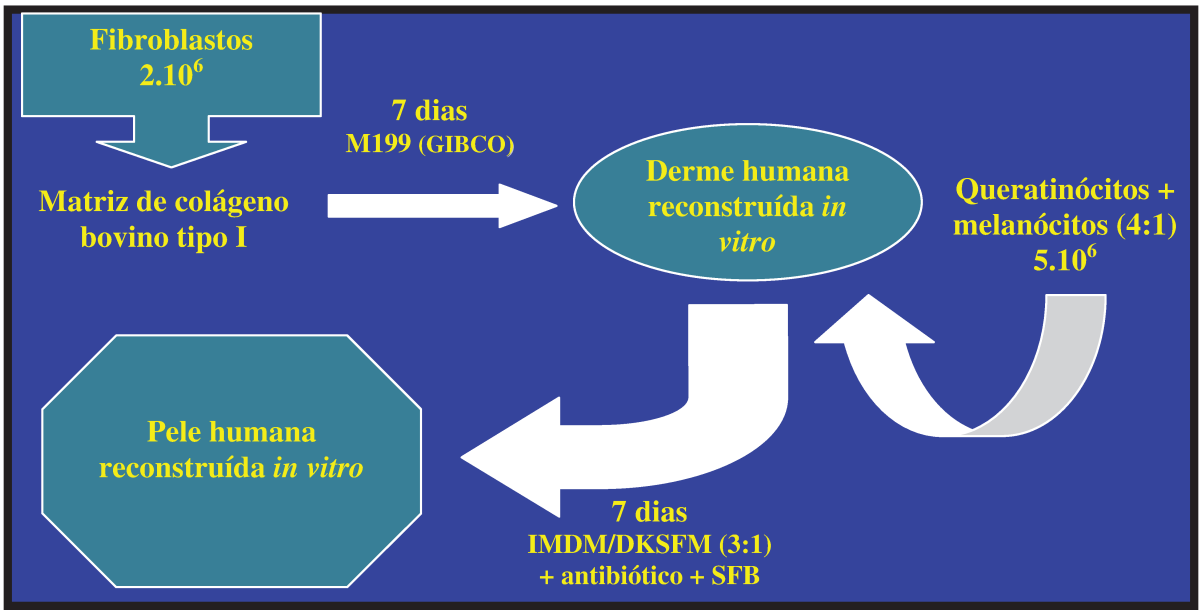


Figura 6 – Esquema da técnica para obtenção de pele humana (derme + epiderme) reconstruída *in vitro*

4.7- Experimento controle

Dentro de uma placa de Petri, de aproximadamente 10,0 cm^2, colocaram-se fibroblastos, na quantidade de 2,0 X 10^6, em meio de cultura M199, suplementado com L-Glutamina 2 mM/ml, penicilina 100 UI/ml, estreptomicina 0,1 mg/ml e soro fetal bovino 10% (QUADRO 2 – Figura A). O meio de cultura foi trocado 3 vezes por semana.

Após 7 dias, semearam-se células epidérmicas (relação entre melanócitos e queratinócitos 1:4) com 5,0 X 10^6 células na placa de Petri. Foi colocado meio de cultura para pele, constituído de 3 partes de IMDM + 1 parte de meio de cultura para queratinócitos, 10% de soro fetal bovino, suplementado com L-Glutamina 2 mM/ml, penicilina 100 UI/ml, estreptomicina 0,1 mg/ml e Ca^{2+} 1.5 mM (QUADRO 2 – Figura B). O meio de cultura foi trocado 3 vezes por semana.

Após outros 7 dias, o experimento controle foi retirado do meio de cultura (QUADRO 2 – Figura D).

QUADRO 2

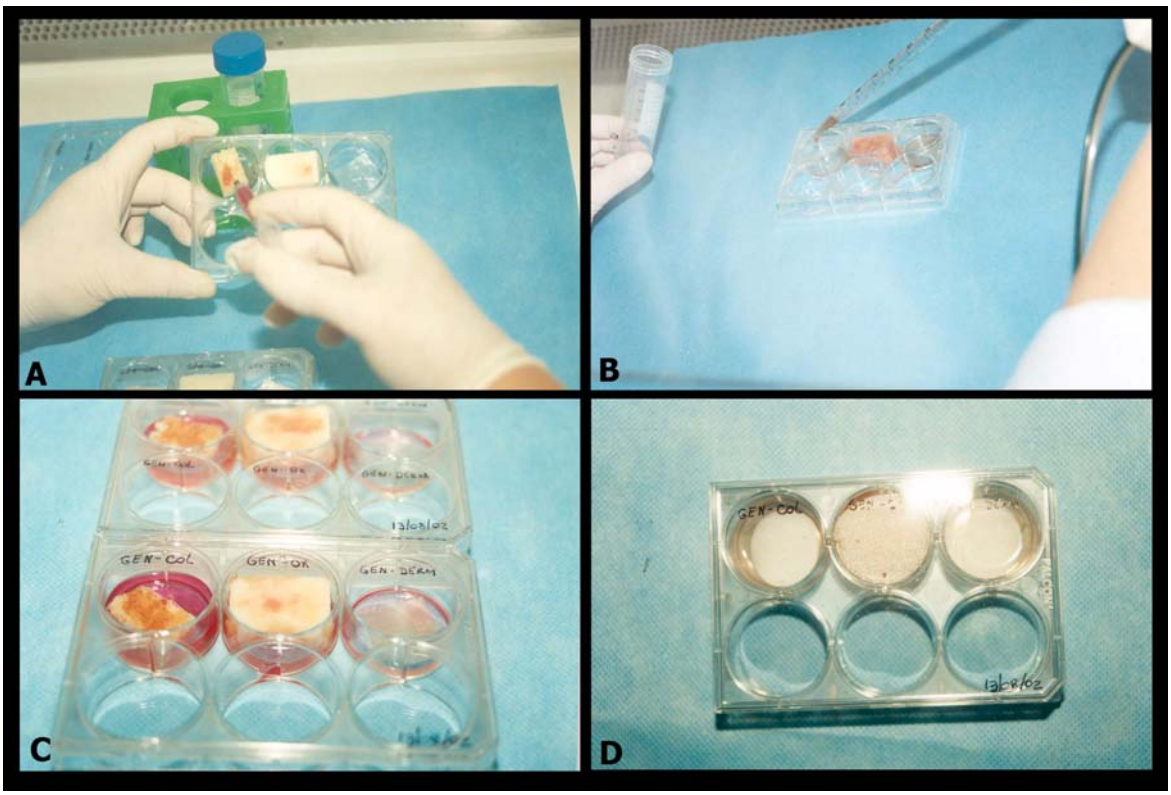


Figura A – Injeção de fibroblastos dentro de matriz de colágeno bovino tipo I.

Figura B – Semeadura de células epidérmicas (queratinócitos e melanócitos) sobre derme humana reconstruída *in vitro* e experimento controle.

Figura C – Membrana de colágeno bovino tipo I contendo fibroblastos em seu interior e fibroblastos imersos em meio de cultura M199 (GIBCO).

Figura D – Aspecto macroscópico da pele humana reconstruída *in vitro* e do experimento controle.

4.8- Estudos histológicos dos equivalentes de derme humana reconstruída *in vitro* obtidos com utilização das matrizes biológicas e do experimento comtrole

Os equivalentes dérmicos obtidos nos experimentos com utilização das Matrizes 1, 2, 3 e 4, e o experimento controle foram fixados em formalina a 10% e incluídos em parafina histológica. Foram realizados cortes histológicos com 4 μm de espessura e corados com hematoxilina-eosina (HE).

4.9- Estudos histológicos da pele humana (derme + epiderme) reconstruída *in vitro* e do experimento controle

A pele humana contendo reconstruída *in vitro*, contendo derme e epiderme associadas, com utilização da matriz de colágeno bovino tipo I (Matriz 4) e a "pele" obtida no experimento controle foram fixadas em formalina a 10% e incluídas em parafina histológica. Foram realizados cortes histológicos com 4 μm de espessura e corados com HE, tricrômio de Masson (método que cora o colágeno em azul e outras estruturas, como o músculo, em vermelho), PAS (ácido periódico-reagente de Schiff; este método cora em vermelho-magenta carboidratos e alguns tipos de mucina, além de ressaltar a membrana basal), Weigert-Van Gieson (este método cora as fibras elásticas em vermelho-púrpura), Fontana-Masson (impregnação argêntica para melanina) e azul da Prússia (reação que cora depósitos de hemossiderina em azul). Todos os métodos histológicos utilizados seguiram os protocolos vigentes no Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

5- RESULTADOS

Todos os experimentos foram triplicados, com sucesso, para validar a técnica.

5.1- Resultados dos estudos dos equivalentes dérmicos obtidos *in vitro* com as diferentes matrizes biológicas (Matrizes 1, 2, 3 e 4) e do experimento controle

Macroscopicamente, foi possível observar a formação de uma delgada película em todos os 4 diferentes experimentos para obtenção de derme humana reconstruída *in vitro*, envolvendo: 1- Matriz orgânica de osso bovino liofilizado esponjoso; 2- Membrana biológica de pericárdio bovino; 3- Colágeno bovino tipo I em grânulos e 4- Colágeno bovino tipo I em bloco. O mesmo foi observado no experimento controle.

5.1.1- Resultados dos estudos histológicos dos experimentos realizados com as matrizes biológicas 1, 2 e 3

Nos cortes histológicos observou-se, de acordo com a matriz utilizada para obtenção do equivalente dérmico:

1- Matriz orgânica de osso bovino liofilizado esponjoso (Figura 7);

- Hematoxilina-eosina: Visualizada apenas a matriz óssea bovina (medular), sem presença de fibroblastos em seu interior (Figura 8).

2- Membrana biológica de pericárdio bovino (Figura 9);

- Hematoxilina-eosina: Visualizada fina membrana de pericárdio bovino, com uma única camada de células (fibroblastos), adjacente, mas não aderida à membrana (Figura 10).

3- Colágeno bovino tipo I em grânulos.

- Hematoxilina-eosina: Houve necrose celular intensa, sem formação de nenhum tipo de equivalente epitelial (sem material para cortes histológicos).

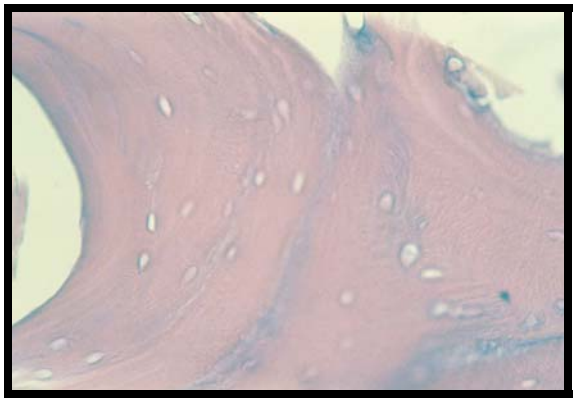


Figura 7 - Matriz orgânica de osso bovino liofilizado esponjoso pura. Microscopia óptica. HE. Aumento original 400X.

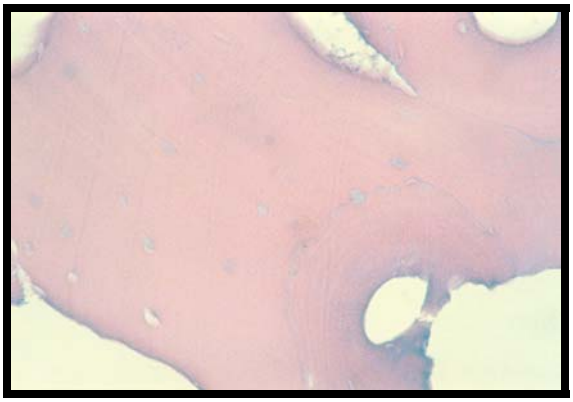


Figura 8 - Matriz orgânica de osso bovino liofilizado esponjoso após cultura de fibroblastos. Microscopia óptica. HE. Aumento original 400X.

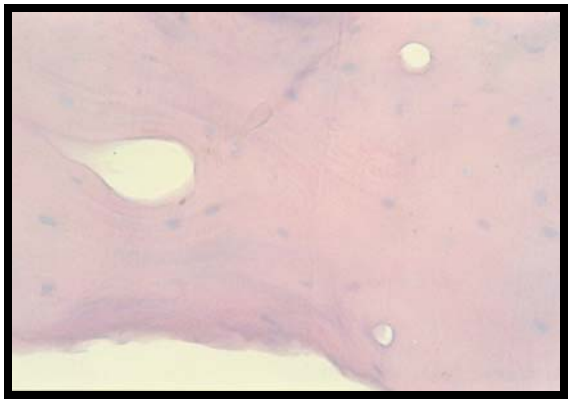


Figura 9 – Membrana biológica de pericárdio bovino pura. Microscopia óptica. HE. Aumento original 400X.

Figura 10 – Membrana biológica de pericárdio bovino após cultura de fibroblastos. Microscopia óptica. HE. Aumento original 400X.

5.1.2- Resultados do estudo histológico do experimento realizado com a matriz biológica 4

Nos cortes histológicos observou-se:

4- Colágeno bovino tipo I em bloco.

- Hematoxilina-eosina: Presença de grande quantidade de fibroblastos, organizados em múltiplas camadas e dispostos paralelamente entre si. Ausência de sinais de necrose celular (Figura 11).

5.1.3- Resultados do estudo histológico do experimento controle

Nos cortes histológicos observou-se:

Experimento controle, sem uso de nenhum tipo de matriz biológica.

- Hematoxilina-eosina: Presença de grande quantidade de fibroblastos, organizados em múltiplas camadas e dispostos paralelamente entre si. Ausência de sinais de necrose celular (Figura 12).

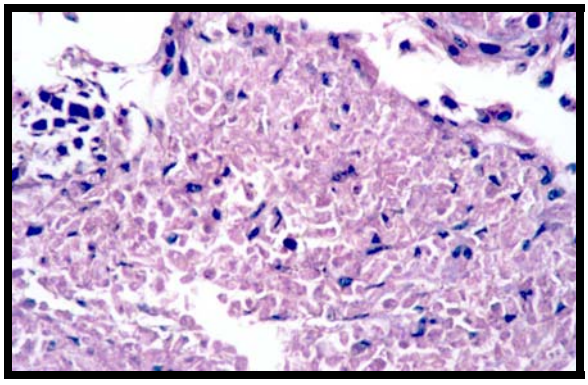


Figura 11 – Derme humana reconstruída *in vitro* com utilização de colágeno bovino tipo I. Microscopia óptica HE. Aumento original 400X.
Fibroblastos organizados em múltiplas camadas e dispostos paralelamente uns aos outros.

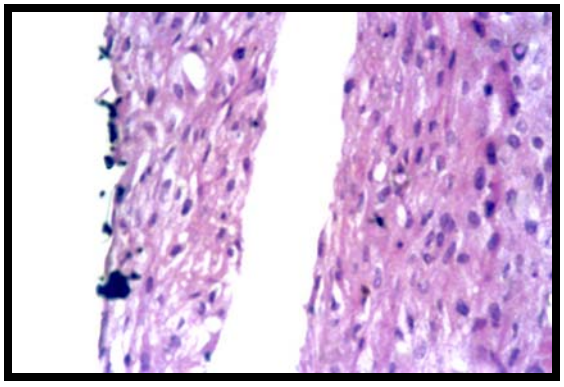


Figura 12 – Experimento controle sem utilização de colágeno bovino tipo I. Microscopia óptica HE. Aumento original 400X.
Fibroblastos organizados em múltiplas camadas e dispostos paralelamente uns aos outros

5.2- Resultados dos estudos da pele humana (derme + epiderme) reconstruída *in vitro* e do experimento controle

Macroscopicamente, tanto no experimento para obtenção da pele humana reconstruída *in vitro*, contendo derme e epiderme associadas, com utilização de colágeno bovino tipo I, quanto no experimento controle, foi possível observar a formação de uma delgada película translúcida, comparável, a olho nu, a um enxerto de pele parcial muito fino (QUADRO 2 – Figura D).

5.2.1- Resultados dos estudos histológicos com a pele humana reconstruída *in vitro* contendo derme e epiderme associadas

Nos cortes histológicos da pele humana reconstruída *in vitro*, contendo derme e epiderme, com utilização de colágeno, observou-se:

- Hematoxilina-eosina: Nítida distinção entre derme e epiderme. Formação de epiderme com 3 a 4 camadas de queratinócitos. Estas células apresentavam-se cubóides na base e mais planas nos estratos mais altos. Ausência de camada córnea, porém presença de relevo superficial ondulado de aparência cuticular (Figuras 13 e 15).
- Tricrômio de Masson: Limite dermoepidérmico nítido. Matriz extracelular fibrilar (coloração azulada) e fibroblastos na derme, organizados paralelamente à epiderme (Figura 17).
- PAS: Presença de material fucsinófilo (glicogênio) no citoplasma dos queratinócitos. Presença de delgada membrana basal (Figura 19).
- Weigert-Van Gieson: Presença de pequena quantidade de fibras elásticas na derme e epiderme (Figura 21).
- Fontana-Masson: Presença de poucas células melanocíticas contendo melanina no tecido epitelial (Figura 23).
- Azul da Prússia: Presença de esparsas células com hemossiderina em seu interior no tecido epitelial e derme (Figura 25).

5.2.2- sultados dos estudos histológicos com o experimento controle

Nos cortes histológicos da “pele” obtida no experimento controle observou-se:

- Hematoxilina-eosina: Presença de células dérmicas e epidérmicas misturadas, com predomínio de fibroblastos. Ausência de organização arquitetural (Figuras 14 e 16).

- Tricrômio de Masson: A derme não se distingue da epiderme. Não se observa matriz extracelular (coloração azulada - Figura 18).

- PAS: Não foi observado material fucsinófilo (glicogênio) no citoplasma dos queratinócitos (Figura 20).

- Weigert-Van Gieson: Ausência de fibras elásticas (Figura 22).

- Fontana-Masson: Ausência de células contendo melanina em seu interior (impregnação argêntica – Figura 24).

- Azul da Prússia: Ausência de células com hemossiderina em seu interior (Figura 26).

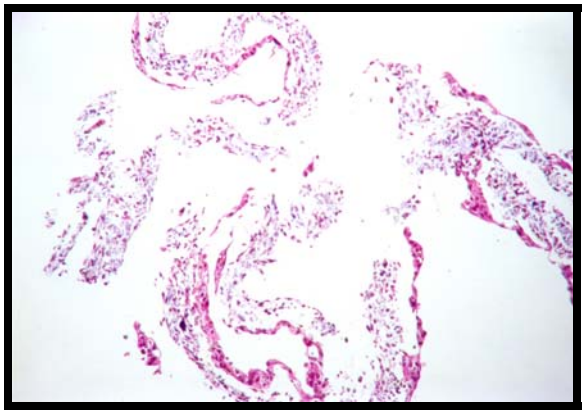


Figura 13 – Pele humana reconstruída *in vitro*. Microscopia óptica. HE. Aumento original 100X. Nota-se nítida distinção entre derme e epiderme.

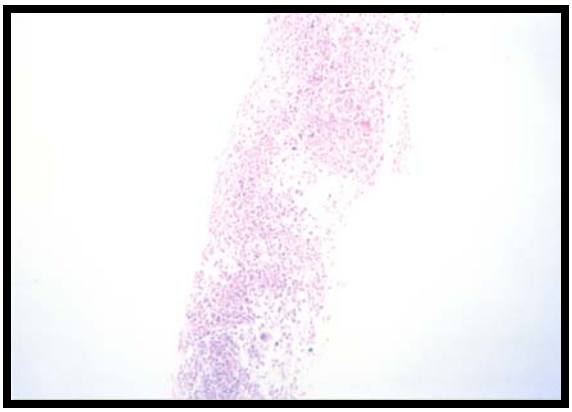


Figura 14 – Experimento controle. Microscopia óptica. HE. Aumento original 100X.
Ausência de distinção entre derme e epiderme.

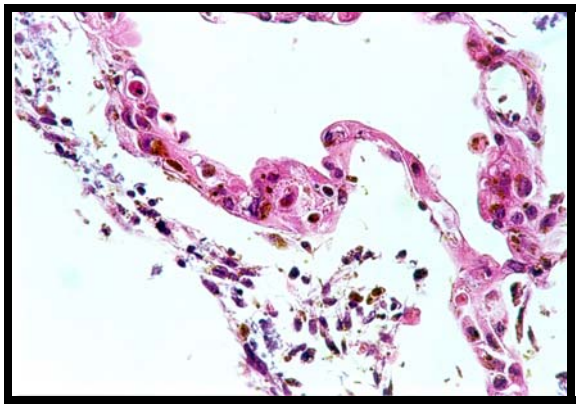


Figura 15 – Pele humana reconstruída *in vitro*. Microscopia óptica. HE. Aumento original 400X.
Nota-se nítida distinção entre derme e epiderme. Epiderme composta de 3 a 4 camadas de queratinócitos, com fibroblastos na derme organizados paralelamente à epiderme.

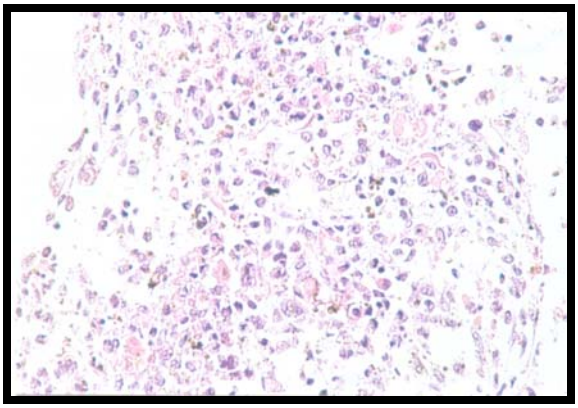


Figura 16 – Experimento controle. Microscopia óptica. HE. Aumento original 400X.
Ausência de distinção entre derme e epiderme. Predomínio de células mesenquimais (fibroblastos) em todo o tecido.

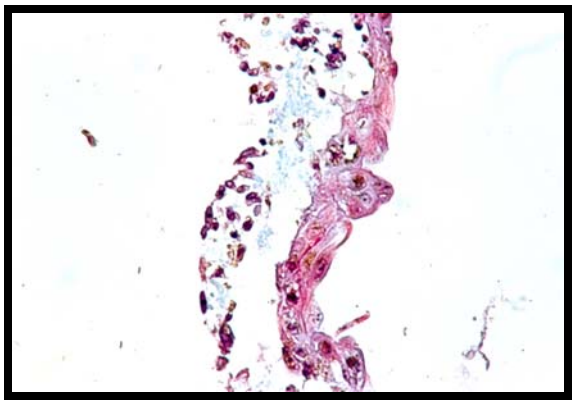


Figura 17 – Pele humana reconstruída *in vitro*. Microscopia óptica. Tricrômio de Masson. Aumento original 400X.
Limite dermoepidérmico nítido. Matriz extracelular fibrilar (coloração azulada) e fibroblastos na derme, organizados paralelamente à epiderme.

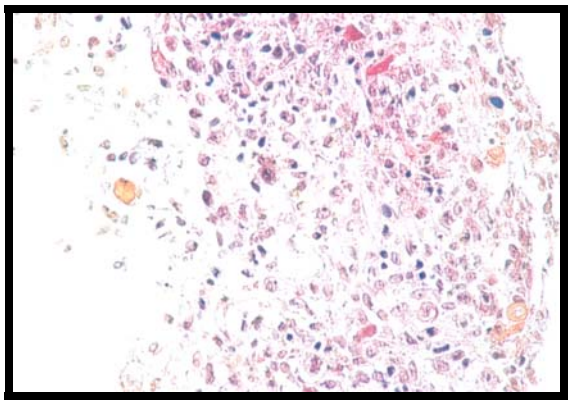


Figura 18 – Experimento controle. Microscopia óptica. Tricrômio de Masson. Aumento original 400X.
A derme não se distingue da epiderme. Não se observa matriz extracelular (coloração azulada).

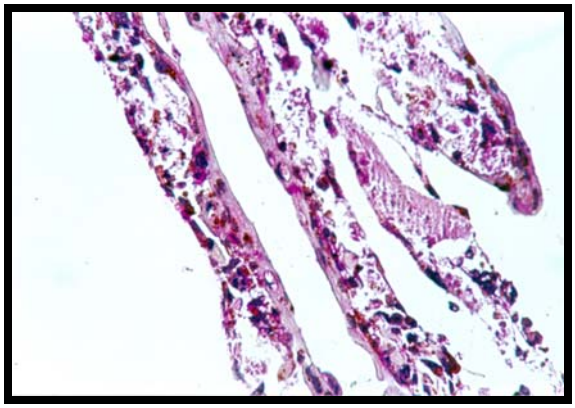


Figura 19 – Pele humana reconstruída *in vitro*. Microscopia óptica. PAS. Aumento original 400X.

Presença de material fucsinófilo (glicogênio) no citoplasma dos queratinócitos. Presença de delgada membrana basal.

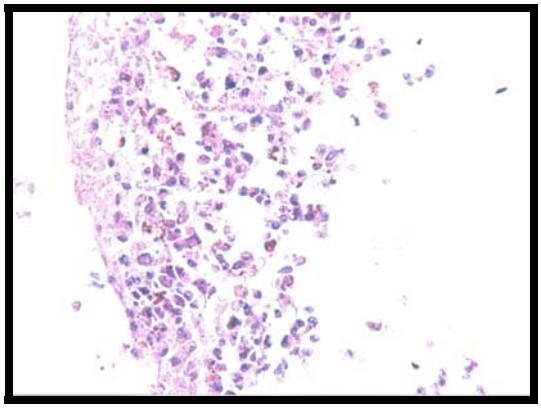


Figura 20 – Experimento controle. Microscopia óptica. PAS. Aumento original 400X.

Não se observa material fucsinófilo no interior das células.

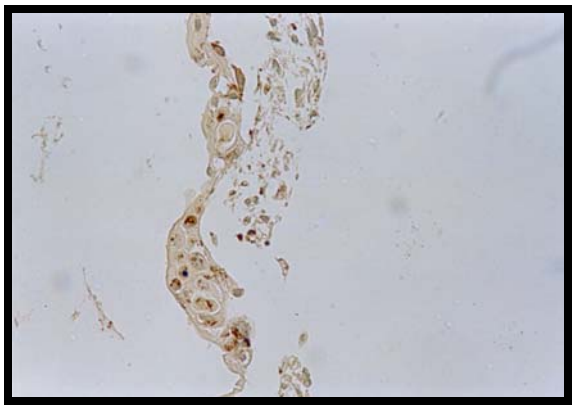


Figura 21 – Pele humana reconstruída *in vitro*. Microscopia óptica. Weigert–Van Gieson. Aumento original 400X.

Presença de pequena quantidade de fibras elásticas na derme e epiderme.

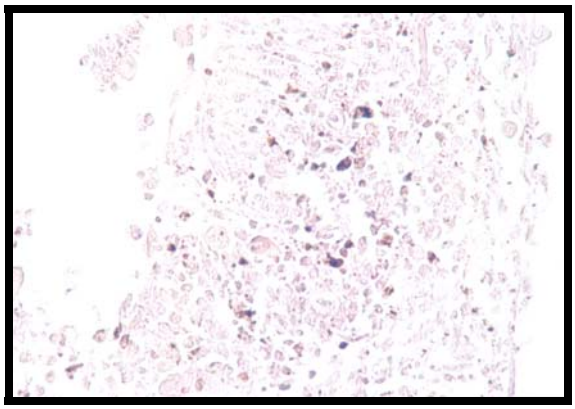


Figura 22 – Experimento controle. Microscopia óptica. Weigert-Van Gieson. Aumento original 400X.

Não se observa fibras elásticas.

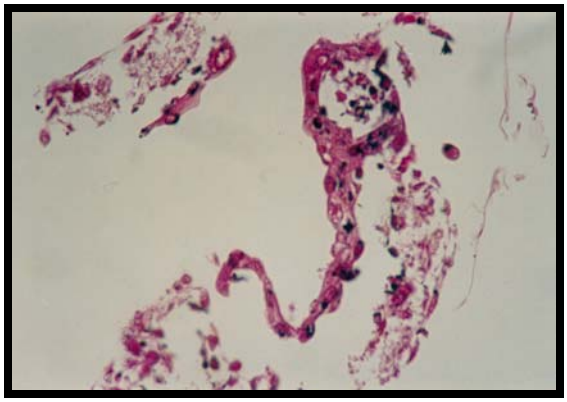


Figura 23 – Pele humana reconstruída *in vitro*. Microscopia óptica. Fontana–Masson. Aumento original 400X.
Presença de esparsas células melanocíticas contendo melanina no tecido epitelial.

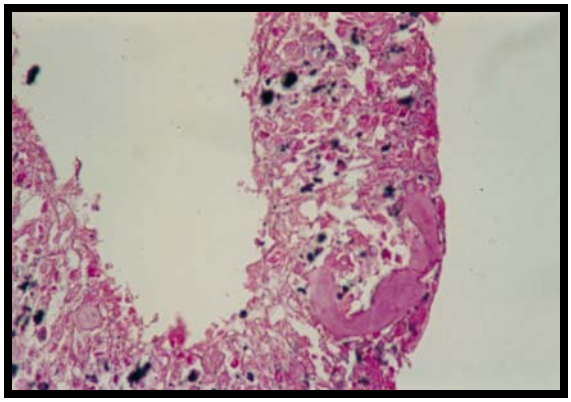


Figura 24 – Experimento controle. Microscopia óptica. Fontana-Masson. Aumento original 400X. Ausência de células contendo melanina em seu interior.

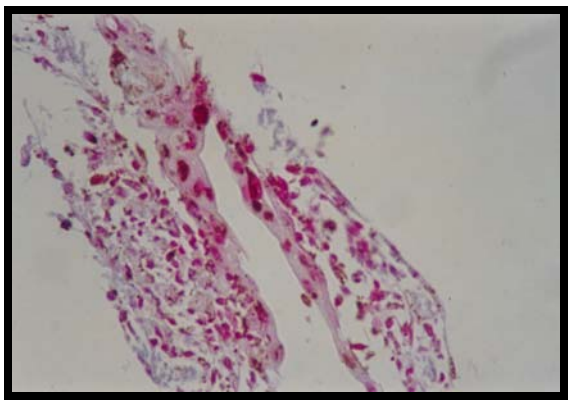


Figura 25 – Pele humana reconstruída *in vitro*. Microscopia óptica. Azul da Prússia. Aumento original 400X.
Presença de esparsas células com hemossiderina em seu interior no tecido epitelial e derme. derme e epiderme.

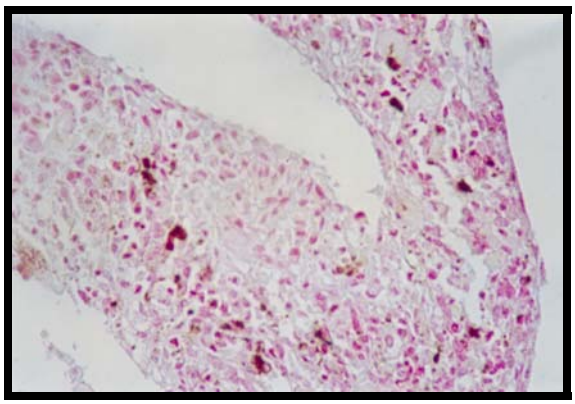


Figura 26 - Experimento controle. Microscopia óptica. Azul da Prússia. Aumento original 400X. Ausência de células com hemossiderina em seu interior.

6- DISCUSSÃO

A utilização de uma matriz orgânica de osso bovino liofilizado esponjoso (Matriz 1), de aproximadamente 10 X 15 X 25mm, mostrou-se ineficaz na obtenção de uma derme humana reconstruída *in vitro*, uma vez que não houve crescimento e/ou, mais provavelmente, adesão dos fibroblastos à sua superfície quando o sistema foi mantido em meio de cultura específico para fibroblastos.

A membrana biológica de pericárdio bovino (Matriz 2), de aproximadamente 20 X 20 mm, mostrou-se capaz de possibilitar o crescimento e organização de fibroblastos em sua superfície quando o sistema foi mantido em meio de cultura específico. Entretanto, a formação de uma única camada celular (fibroblastos) e a não adesão destas à superfície da membrana biológica de pericárdio bovino, inviabiliza a sua utilização para obtenção de uma derme humana reconstruída *in vitro*, e conseqüentemente, também de uma pele humana reconstruída *in vitro* contendo derme e epiderme associadas.

O colágeno bovino tipo I em grânulos (Matriz 3), com aproximadamente 5 cm^3, possibilitou o crescimento de pequena quantidade de fibroblastos nas camadas mais superficiais com o sistema mantido imerso em meio de cultura específico para crescimento de fibroblastos. Porém, a não organização arquitetural e a não disposição em paralelo desses fibroblastos nos frascos de cultura, além da necrose celular que ocorreu nas camadas celulares mais profundas, tornam essa matriz celular inadequada para uso. Durante a realização do experimento para obtenção de derme humana reconstruída *in vitro* utilizando o colágeno em grânulos, ocorreu acidificação dos meios para cultura de células (fibroblastos) quando estes entraram em contato com o colágeno. Embora o pH dos meios tenha sido mantido ao redor de 7.8, com utilização de bicarbonato de sódio, é provável que essa acidificação inicial dos meios de cultura ao contato com o colágeno tenha sido responsável pela necrose celular observada. Embora o colágeno tipo I em grânulos seja, na teoria, quimicamente semelhante ao colágeno em blocos, utilizado com sucesso, só havendo diferença física (grânulos e bloco), não foi possível determinar (nem mesmo pelo fabricante / fornecedor) o que levou à acidificação dos meios de cultura com a utilização de somente um dos tipos de colágeno.

Com a utilização de matrizes de colágeno bovino tipo I em bloco (Matriz 4), para crescimento de fibroblastos em meio seletivo de cultura, foi obtida uma derme humana reconstruída *in vitro*, semelhante à derme humana *in vivo*, com as células (fibroblastos) organizadas paralelamente, umas em relação às outras, dentro de uma estrutura tridimensional (colágeno).

Reproduziu-se, a partir da cultura de queratinócitos e melanócitos, em meio de cultura adequado para pele, sobre essa derme humana reconstruída *in vitro*, uma epiderme humana reconstruída *in vitro*, nitidamente diferenciada.

Logo, através da cultura seqüencial de células dérmicas (fibroblastos) dentro de uma matriz de colágeno bovino tipo I em bloco, e de células epidérmicas (queratinócitos e melanócitos), sobre essa matriz, foi obtido um modelo de pele humana reconstruída *in vitro*, composta de derme e epiderme associadas, apresentando colágeno na derme, e com fibroblastos, queratinócitos e melanócitos posicionados de forma análoga à pele humana, histologicamente equivalente, respeitando-se as devidas proporções de espessura, à pele humana *in vivo*. A estratificação da epiderme na pele humana contendo derme e epiderme reconstruída *in vitro* apresentou características semelhantes daquela encontrada *in vivo*. A pele humana contendo derme e epiderme reconstruída *in vitro* foi obtida em 14 dias, partindo-se das células dérmicas (fibroblastos) e epidérmicas (melanócitos e queratinócitos) já em número suficiente ($2,0 \times 10^6$ fibroblastos, $5,0 \times 10^6$ queratinócitos e $5,0 \times 10^6$ melanócitos).

O equivalente de pele humana reconstruída *in vitro* obtido no experimento controle apresentou, em cortes histológicos, células dérmicas (fibroblastos) e epidérmicas (queratinócitos e melanócitos) sem nenhuma organização arquitetural, com predomínio de células dérmicas, e sem qualquer evidência de derme e epiderme constituídas.

A não obtenção de uma pele humana reconstruída *in vitro* com organização estrutural, e contendo derme e epiderme associadas, no experimento controle, confirma a importância da utilização da matriz de colágeno bovino tipo I (em bloco) para a obtenção de uma pele humana reconstruída *in vitro* histologicamente equivalente à pele humana *in vivo*. Geralmente, em culturas celulares simultâneas, em que é realizada a simples adição de

um tipo celular a outro, uma das espécies celulares acaba, mais cedo ou mais tarde, eliminando a outra (COULOMB et al., 1986). Em sistemas que visam reconstruir pele humana contendo derme e epiderme e que utilizam fibroblastos, estes requerem serem embebidos em matrizes tridimensionais de colágeno, para poderem formar um equivalente dérmico sem que os fibroblastos invadam os limites da epiderme (MAUCH et al., 1989).

A presença de uma matriz extracelular adequadamente constituída na pele humana reconstruída *in vitro* obtida com sucesso com a utilização de colágeno bovino tipo I em bloco, observada nos cortes histológicos corados pela técnica de Masson (azul), indica que, provavelmente, o colágeno bovino foi inicialmente utilizado pelos fibroblastos como fonte de nutrição e para regular e orientar seu crescimento; em uma segunda etapa foi substituído por colágeno produzido pelos próprios fibroblastos. Esta possibilidade já havia sido aventada anteriormente em outros estudos (KIM et al., 1999; HOELLER et al., 2001; JANSSON et al., 2001).

O colágeno está disponível em abundância e é facilmente purificado de organismos vivos. É biodegradável e bioabsorvível. Não é tóxico, tem baixa antigenicidade e uma excelente biocompatibilidade, quando comparado com outros polímeros naturais, como albumina e gelatina. Dentre as principais aplicações do colágeno na área médica estão o uso em próteses oftalmológicas e como esponjas (curativos biológicos) para queimaduras e úlceras de pele. Em engenharia de tecidos é utilizado como matriz básica para desenvolvimento de sistemas celulares e na composição de substitutos artificiais de vasos e válvulas (LEE et al., 2001).

O colágeno tipo I puro apresenta um custo relativamente alto. Porém, o alto custo no tratamento de lesões de pele em que as áreas doadoras para enxertia são escassas é perfeitamente justificável pela diminuição do tempo de tratamento (HORCH et al., 2000; MILLER et al., 2000) e pelos melhores índices de sobrevivência e melhor qualidade do resultado final (CHALUMEAU et al., 1999). Reações clínicas ao colágeno são raras, mas dois casos de alergia (mediada por IgE) ao colágeno bovino foram relatados, tendo os pacientes, em ambos os casos, desenvolvido edema conjuntival em resposta à aplicação tópica de colágeno bovino altamente purificado nos olhos durante cirurgias oftalmológicas (MULLINS et al., 1996).

A utilização de uma membrana de colágeno bovino tipo I, sobre uma área de perda cutânea, pode induzir a formação de uma neoderme, através da migração de fibroblastos do próprio paciente para o interior da membrana, seguida de multiplicação e maturação celular. Pode ocorrer epitelização espontânea sobre a neoderme, por crescimento epitelial a partir da região lateral da ferida, ou epitelização induzida, pela colocação de queratinócitos autólogos cultivados *in vitro* sobre a neoderme (JANSSON et al., 2001). A possibilidade de utilização clínica de uma pele humana contendo derme e epiderme completamente reconstruída *in vitro*, autóloga, é muito mais vantajosa do que os métodos até então empregados.

No nosso estudo, retiramos dos pacientes fragmentos de pele de 2,0 X 1,0 cm. Em relação ao crescimento das culturas celulares (Gráficos 1, 2 e 3), em cerca de 2 semanas temos quantidades de queratinócitos, melanócitos e fibroblastos ao redor de 2,0 X 10^6 em cada linhagem. Em 3 semanas, temos quantidades de fibroblastos pouco acima de 5,0 X 10^6, e de melanócitos e queratinócitos por volta de 5,0 X 10^6 cada. Em 4 semanas, temos queratinócitos e melanócitos em número de 20,0 X 10^6 cada e 40,0 X 10^6 de fibroblastos (Tabela 1 e Gráfico 4). Necessitamos de 2,0 X 10^6 fibroblastos e de 5,0 X 10^6 queratinócitos e melanócitos na proporção de 4:1 (4,0 X 10^6 queratinócitos e 1,0 X 10^6 melanócitos), para obtermos, após 2 semanas, fragmentos de pele humana total reconstruída *in vitro* de 2,0 X 2,0 cm. Portanto, o método aqui apresentado fornece, através de culturas celulares convencionais, a possibilidade de se obter uma pele humana reconstruída *in vitro*, contendo derme e epiderme, no dobro do tamanho da pele original retirada do paciente em 4 semanas e cinco fragmentos no dobro do tamanho original em 5 semanas.

Tabela 1 – Crescimento das culturas celulares

	14 dias	**21 dias**	**28 dias**
Queratinócitos	2,0 X 10^6	5,0 X 10^6	20,0 X 10^6
Melanócitos	2,0 X 10^6	5,0 X 10^6	20,0 X 10^6
Fibroblastos	2,0 X 10^6	10,0 X 10^6	40,0 X 10^6

Gráfico 1

Curva de crescimento da cultura de queratinócitos

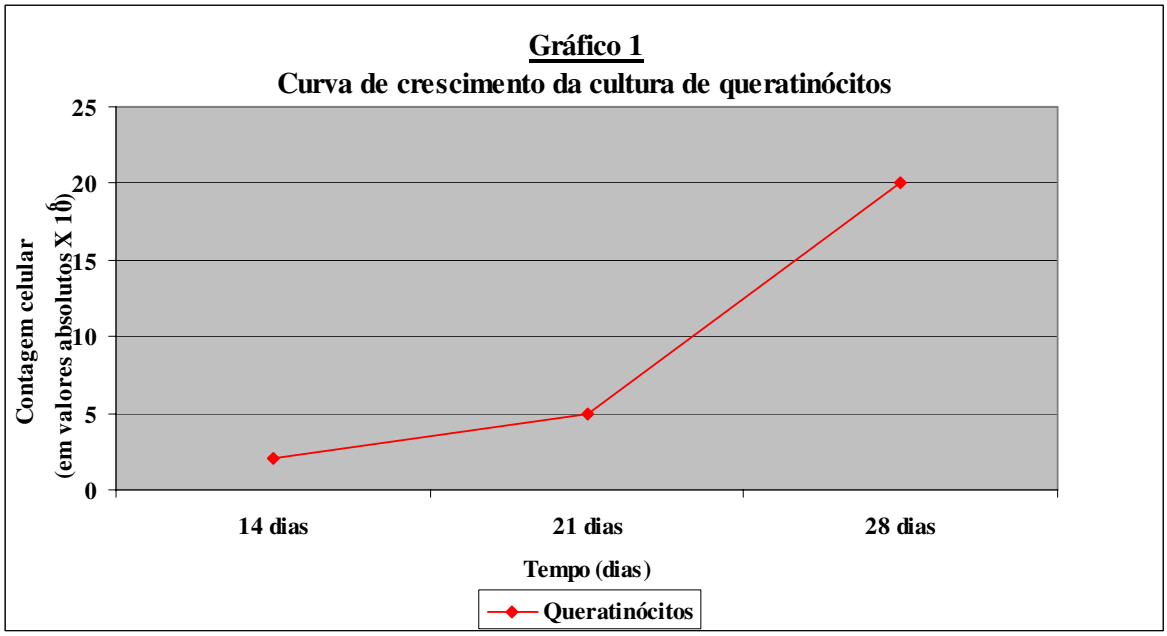
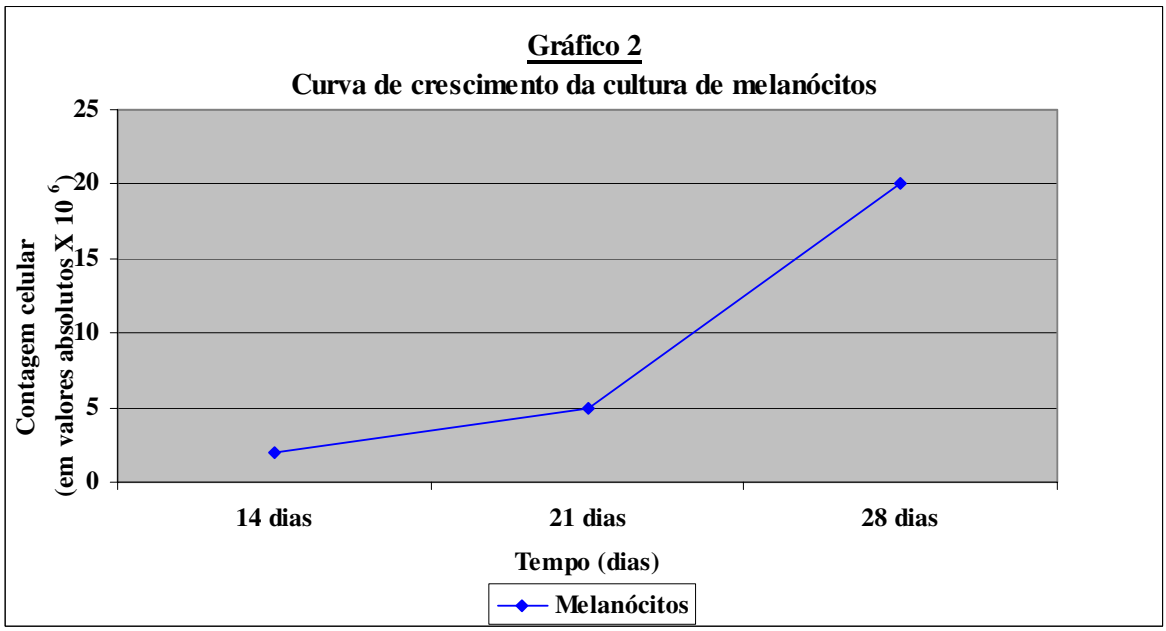


Gráfico 2

Curva de crescimento da cultura de melanócitos



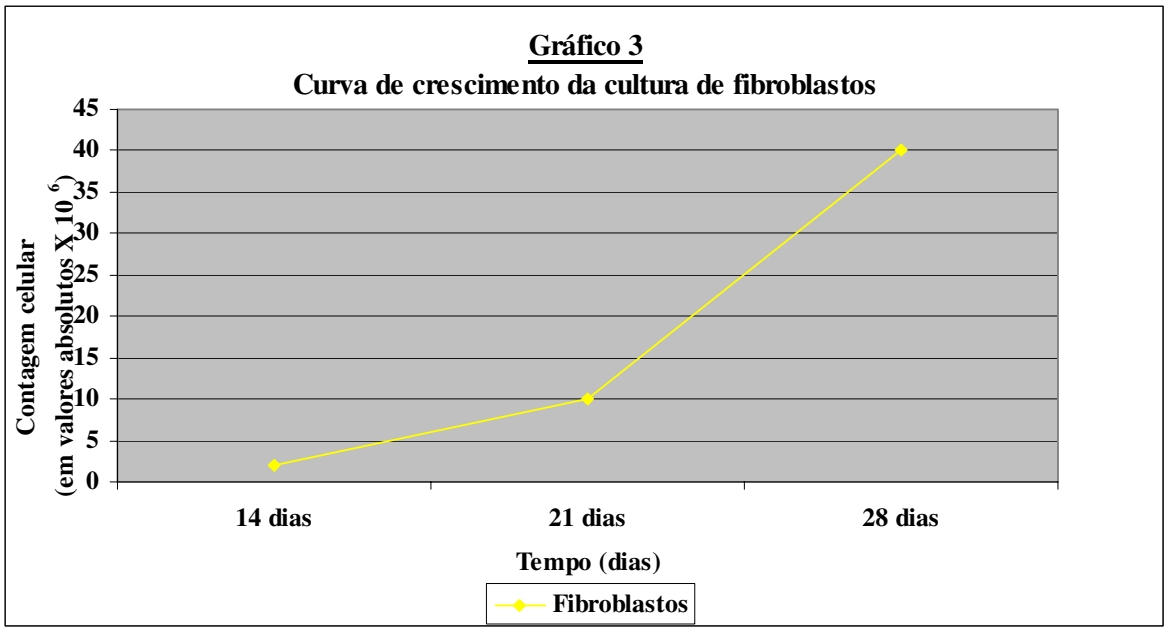


Gráfico 3
Curva de crescimento da cultura de fibroblastos
Contagem celular
(em valores absolutos X 10 6)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
14 dias
21 dias
28 dias
Tempo (dias)
Fibroblastos

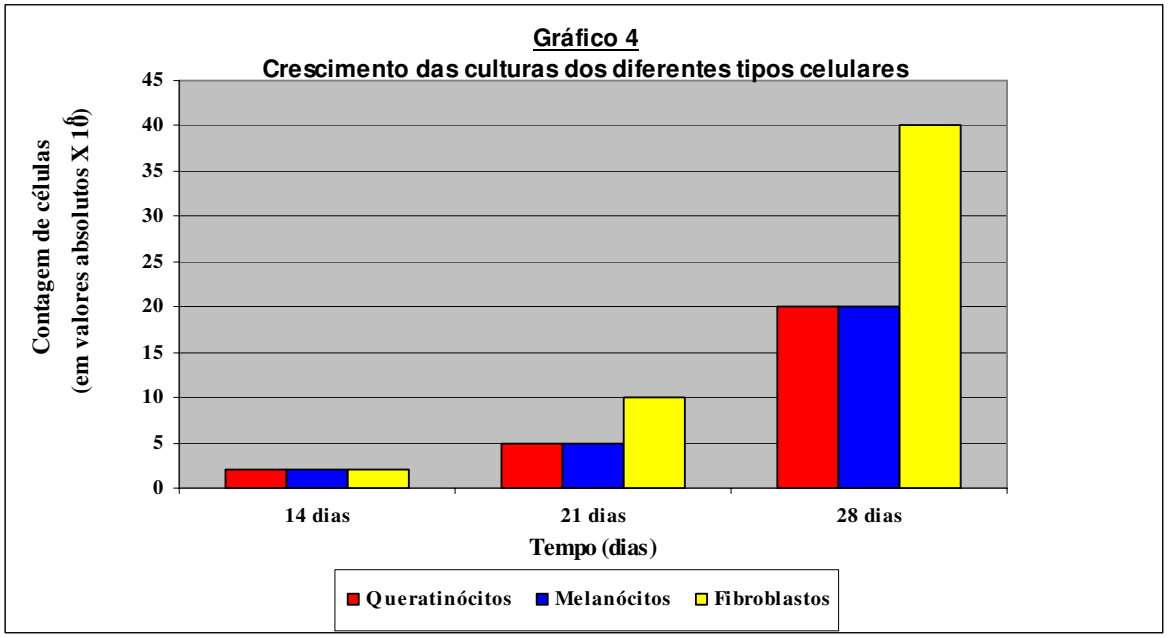


Gráfico 4
Crescimento das culturas dos diferentes tipos celulares
Contagem de células
(em valores absolutos X 10)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
14 dias
21 dias
28 dias
Tempo (dias)
Queratinócitos
Melanócitos
Fibroblastos

A utilização de métodos de aceleração de culturas celulares (PRENOSIL e KINO-OKA, 1999) pode fornecer quantidade suficiente de células para semeadura, no interior da matriz de colágeno bovino tipo I em tempo menor, sendo reduzido também o tempo até a obtenção da pele humana reconstruída *in vitro*.

O congelamento de células, com manutenção da viabilidade, por longos períodos, fornece um meio de se obter células para cultura, e consequentemente, para reconstituição de pele humana *in vitro*, contendo derme e epiderme autóloga, em casos em que haja insucesso inicial no tratamento clínico de úlceras cutâneas e queimaduras, sem necessidade de novas coletas de pele. O DMSO é adicionado ao soro fetal bovino na concentração de 10%, durante a congelação, para evitar a cristalização das organelas intracelulares.

Durante a formação da epiderme em meio de cultura para pele sobre a matriz de colágeno bovino tipo I é essencial a adição de íons Ca^{2+} na concentração de 1.5 mM ao meio de cultura para que ocorra formação de uma epiderme com múltiplas camadas, como demonstrado em estudos anteriores para obtenção de epiderme humana reconstruída *in vitro* (PRUNIÉRAS et al., 1983; RÉGNIER et al., 1992). A película formada durante a obtenção da pele humana total reconstruída *in vitro*, onde se localizaria a camada córnea (Figura 9), é extremamente delgada, mas pode tornar-se espessa se essa pele for exposta ao ar (mantida em interface ar-líquido) por um período maior, constituindo uma camada córnea verdadeira.

Este modelo de pele humana preenche os requisitos básicos descritos por PONEC et al. (2001), para que um equivalente de pele humana possa ser utilizado para propósitos científicos, pois apresenta formação de queratina no estrato córneo (barreira mecânica), corpúsculos de glicogênio intracelulares nos queratinócitos em abundância (indicando maturação do epitélio) e aspecto cuticular da epiderme.

O modelo de pele humana reconstruída *in vitro* contendo derme e epiderme associadas, descrito neste trabalho, pode fornecer um excelente sistema para estudos, notadamente para testes de eficácia e toxicologia de novos produtos químicos e drogas *in vitro*, com a vantagem de apresentar componentes dérmicos, quando comparado com sistemas de estudos que utilizam apenas epiderme (REHDER et al., 2004; RÉGNIER et al., 1992; RÉGNIER et al., 1990). O modelo de pele humana reconstruída *in vitro* aqui

apresentado provavelmente não permite estudar os efeitos imunológicos das reações mediadas pelas células de Langerhans ou pelos macrófagos UV-induzidos, como demonstrado em estudos utilizando epiderme reconstruída *in vitro* de forma isolada (BESSOU et al., 1995). Entretanto, isto pode ser perfeitamente realizado pelo cultivo das células de Langerhans de forma isolada (FRANSSON et al., 1998) e introdução dessas células, juntamente com a semeadura de queratinócitos e melanócitos, sobre a derme humana reconstruída *in vitro*, obtendo assim uma pele humana reconstruída *in vitro* com função imunitária, conforme também já demonstrado em estudos anteriores envolvendo somente epiderme humana reconstruída (RÉGNIER et al., 1998; PONEC et al., 2002).

Este modelo pode permitir, ainda, estudar a fisiopatologia e eventuais opções terapêuticas de afecções pigmentares ainda não determinadas, como o vitiligo, melasma e a formação de nevus melanocíticos. Diversos outros modelos de pele humana reconstruída *in vitro*, com variadas aplicações laboratoriais, experimentais e clínicas, deverão surgir e serem estudados nos próximos anos. Acreditamos ser o modelo de pele humana reconstruída *in vitro* contendo derme e epiderme associadas aqui apresentado compatível e semelhante a uma pele humana *in vivo*, com vantagens sobre modelos de substitutos artificiais de pele (BOYCE, 1998; NANCHAHAL et al., 2002; VAN ZUIJLEN et al., 2001; HUNT et al., 2000) e modelos de epiderme reconstruída *in vitro* (HORCH et al., 2001, RONFARD et al., 1991; CARSIN et al., 2000; REHDER et al., 2004) anteriormente estudados.

A semelhança entre a pele humana reconstruída *in vitro* utilizando-se a matriz de colágeno bovino tipo I em bloco com a pele humana *in vivo* é nítida, conforme demonstraram os estudos histológicos realizados. Segue abaixo descrição das semelhanças encontradas e que sustentam essas afirmações:

- Estudos histológicos:

1. Coloração pelo método de hematoxilina-eosina: Nítida distinção entre derme e epiderme. Presença de queratinócitos mais arredondados próximos à camada basal e mais achatados nas camadas mais superficiais. Melanócitos presentes próximos à camada basal da epiderme e melanina corada em castanho claro distribuída em toda a epiderme.

2. Coloração pelo método de tricrômio de Masson: Nítida distinção entre derme e epiderme, com fibroblastos organizados paralelamente uns aos outros e em relação à epiderme. Presença de matriz extracelular corada em azul.

3. Coloração pelo método de PAS: Presença de grânulos de glicogênio no interior dos queratinócitos, demonstrando maturidade do epitélio, e de delgada membrana basal.

4. Coloração pelo método de Fontana-Masson: Presença de células epidérmicas contendo melanina (corada em preto) em seu interior.

7- CONCLUSÕES

Com base nos objetivos propostos e quesitos formulados anteriormente (Itens 2.1. Objetivo geral e 2.2. Objetivos específicos), nos estudos realizados e nos resultados observados, pode-se concluir:

- É possível obter uma pele humana reconstruída *in vitro* contendo derme e epiderme associadas utilizando-se uma matriz de colágeno bovino tipo I em bloco, através do crescimento de fibroblastos em seu interior e do crescimento seqüencial de células epidérmicas (queratinócitos e melanócitos), depositados sobre essa matriz de colágeno contendo fibroblastos em seu interior e mantidos em meio de cultura específico;

- Não foi possível obter uma pele humana reconstruída *in vitro*, contendo derme e epiderme associadas, sem a utilização de nenhum tipo de matriz biológica.

- O melhor tipo de matriz biológica, entre aquelas estudadas neste trabalho, para obtenção de uma derme humana reconstruída *in vitro* é o colágeno bovino tipo I em bloco;

- Respeitando-se as devidas proporções, há nítida semelhança entre a pele humana reconstruída *in vitro* obtida e a pele humana *in vivo*, conforme demonstrado pelo estudo histológico realizado;

- Para se obter uma pele humana reconstruída *in vitro* do dobro do tamanho da pele original (*in vivo*) retirada do paciente são necessárias 4 semanas, e para se ter cinco fragmentos de pele humana reconstruída *in vitro* do dobro do tamanho da pele original são necessárias 5 semanas.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN H. S.; KOCH S. L. The treatment of patients with severe burns. **Surg Gynec Obstet**, 79: 914, 1942.

ARCHAMBAULT M.; YAAR M.; GILCHREST B. A. Keratinocytes and fibroblasts in a human skin equivalent model enhance melanocyte survival and melanin synthesis after ultraviolet irradiation. **J Invest Dermatol**, 104(5): 859-67, 1985.

ARTZ C. P. História das Queimaduras. In: ARTZ C. P.; MONCRIEF J. A.; PRUITT JR B. A. **Queimaduras.** Rio de Janeiro: Interamericana, 1980. p.1-13.

AUGER F. A.; ROUABHIA M.; GOULET F.; BERTHOD F.; MOULIN V.; GERMAIN L. Tissue-engineered human skin substitutes developed from collagen-populated hydrated gels: clinical and fundamental applications. **Med Biol Eng Comput**, 36(6): 801-12, 1998.

BANCROFT J. D.; GAMBLE M. (Eds.). **Theory and Practice of Histological Techniques**. 5th Ed. Edinburg: Churchill Livingstone, 2002.

BESSOU S.; SURLÈVE-BAZEILLE J. E.; SORBIER E.; TAÏEB A. *Ex vivo* reconstruction of the epidermis with melanocytes and the influence of UVB. **Pigment Cell Res**, 8(5): 241-9, 1995.

BESSOU S.; PAIN C.; TAÏEB A. Use of human reconstructs in the study of pigment modifiers. **Arch Dermatol**, 133: 331-6, 1997.

BOLÍVAR-FLORES Y. J.; KURI-HARCUCH W. Frozen allogeneic epidermal cultured sheets for the cure of complicated leg ulcers. **Dermatol Surg**, 25(8): 610-7, 1999.

BORANIC M.; JAKIC-RAZUMOVIC J.; STANOVIC S.; KLJENAK A.; FATTORINI I. Skin cell culture: utilization in plastic surgery and laboratory studies. **Lijec Vjesn**, 121 (4-5): 137-43, 1999.

BOSS W. K.; USAL H.; FODOR P. B.; CHERNOFF G. Autologous cultured fibroblasts: a protein repair system. **Ann Plast Surg**, 44(5): 536-42, 2000.

BOYCE S. T. Cultured skin substitutes: a review. **Tissue Eng**, 2: 255-66, 1996.

BOYCE S. T. Skin substitutes from cultured cells and collagen-GAG polymers. **Med Biol Eng Comput**, 36(6): 791-800, 1998.

BROWDER I. W.; LITWIN M. S. Use of absorbable collagen for hemostasis in general surgical patients. **Am Surg**, 52: 492-4, 1986.

BURKE J. F.; YANNAS I. V.; QUINBY W. C. Jr., BONDOC C. C; JUNG W. K.. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. **Ann Surg**, 194(4): 413-28, 1981.

BURKE J. F. Observation on the development of artificial skin. **J Trauma**, 23: 543-51, 1983.

CAMERON W. J. A new topical hemostatic agent in gynecological surgery. **Obstet Gynecol**, 51: 118-22, 1978.

CARSIN H.; AINAUD P.; LE BEVER H.; RIVES J.; LAKHEL A.; STEPHANAZZI J. et al. Cultured epithelial autografts in extensive burn coverage of severely traumatized patients: a five year single-center experience with 30 patients. **Burns**, 26(4): 379-87, 2000.

CHALUMEAU M.; SAULNIER J.P.; AINAUD P.; LEBEVER H.; STEPHANAZZI J.; LECOADOU A. et al. Initial general management and surgery of six extensively burned children treated with cultured epidermal autografts. **J Pediatr Surg**, 34(4): 602-5, 1999.

CHVAPIL M.; SPEER D. P.; HOLUBEC H.; CHVAPIL T. A.; KING D. H. Collagen fibers as a temporary scaffold for replacement of ACL in goats. **J Biomad Mater Res**, 27(3): 313-25, 1993.

COULOMB B.; LEBRETON C.; DUBERTRET L. Influence of dermal fibroblasts on epidermalization. **J Invest Dermatol**, 92: 122-5, 1989.

COULOMB B.; SAIAG P.; BELL E.; BREITBURD F.; LEBRETON C.; HESLAN M. et al. A new method for studying epidermalization *in vitro*. **Br J Dermatol**, 114(1): 91-101, 1986.

DAGALAKIS N.; FLINK J.; STASIKELIS P.; BURKE J. F.; YANNAS I. V. Design of an artificial skin: III. Control of pore structure. **J Biomed Mater Res**, 14(4): 511-28, 1980.

DETMAR M.; YEO K. T.; NAGY J. A.; VAN DE WATER L.; BROWN L. F.; BERSE B. et al. Keratinocyte-derived vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) is a potent mitogen for dermal microvascular endothelial cells. **J Invest Dermatol**, 105: 44-50, 1995.

ECKERT R. L.; CRISH J. F.; ROBINSON N. A. The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation. **Physiol Rev**, 77: 397-424, 1997.

EHRLICH H. P. Understanding experimental biology of skin equivalent: from laboratory to clinical use in patients with burns and chronic wounds. **Am J Surg,** 187(5A): 29s-33s, 2004.

EL-SHEEMY M. A.; MUIR I. F.; WHEATLEY D. N.; EREMIN O. Inhibition of the contraction of collagen gels by extracts from human dermis. **Cell Biol Int**, 25(7): 635-42, 2001.

FALANGA V.; MARGOLIS D.; ALVAREZ O.; AULETTA M.; MAGGIACOMO F.; ALTMAN M. et al. Healing of venous ulcers and lack of clinical rejection with an allogeneic cultured human skin equivalent. **Arch Dermatol**, 134: 293-300, 1998.

FALANGA V. Tissue engineering in wound repair. **Adv Skin Wound Care**, 13: 15-29, 2000.

FALANGA V.; ISAACS C.; PAQUETTE D.; DOWNING G.; KOUTTAB N.; BUTMARC J. et al. Wounding of bioengineered skin: cellular and molecular aspects after injury. **J Invest Dermatol**, 119(3): 653-60, 2002.

FONSECA M. J.; ALSINA M. A.; REIG F. Coating liposomes with collagen (Mr 50000) increases uptake into liver. **Biochim Biophys Acta**, 1279(2): 259-65, 1996.

FRANK S.; HÜBNER G.; BREIER G.; LONGAKER M. T.; GREENHALGH D. G.; WERNER S. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes: implications for normal and impaired wound healing. **J Biol Chem**, 270: 12607-613, 1995.

FRANSSON J.; HEFFLER L.C.; TENGVALL L. M.; SCHEYNIUS A. Culture of human epidermal Langerhans cells in a skin equivalent. **Br J Dermatol**, 139(4): 598-604, 1998.

FREEMAN A. E.; IGEL U. J.; HERMANN B. J.; KLEINFELD K. L. Growth and Characterization of human skin epithelial cell cultures. **In Vitro**, 12: 352-62, 1976.

FRIESS W. Collagen-biomaterial for drug delivery. **Eur J Pharm Biopharm**, 45: 113-36, 1998.

FUJIOKA K.; MAEDA M.; HOJO T.; SANO A. Protein release from collagen matrices. **Adv Drug Del Rev**, 31: 247-66, 1998.

GALASSI G.; BRUN P.; RADICE M.; CORTIVO R.; ZANON G. F.; GENOVESE P. et al. Degradation studies of the HA-based supporting scaffold. **Biomaterials**, 21: 2183-91, 2000.

GREEN H.; KEHINDE O.; THOMAS J. Growth of cultured epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. **Proc Natl Acad Sci USA**, 76(11): 5665-8, 1979.

HERSON M. R.; MATHOR M. B.; ALTRAN S.; CAPELOZI V. L.; FERREIRA M. C. *In vitro* construction of a potential skin substitute trough direct human keratinocyte plating onto decellularized glycerol-preserved allodermis. **Artif Organs**, 25(11): 901-6, 2001.

HOELLER D.; HUPPERTZ B.; ROOS T. C.; GUTIÉRREZ P. P.; MERK H. F.; FRANK J. et al. An improved and rapid method to reconstruct skin equivalents from human hair follicles and fibroblasts. **Exp Dermatol**, 10(4): 264-71, 2001.

HORCH R. E.; BANNASCH H.; KOPP J.; ANDREE C.; STARK G. B. Single-cell suspensions of cultured human keratinocytes in fibrin-glue reconstitute the epidermis. **Cell Transplant**, 7(3): 309-17, 1998.

HORCH R. E.; DEBUS M.; WAGNER G.; STARK G. B. Cultured human keratinocytes on type I collagen membranes to reconstitute the epidermis. **Tissue Eng**, 6(1): 53-67, 2000.

HORCH R. E.; BANNASCH H.; STARK G. B. Transplantation of cultured autologous keratinocytes in fibrin sealant biomatrix to resurface chronic wounds. **Transplant Proc,** 33(1-2): 642-4, 2001.

HUANG Y.; REN L.; QIN Y. Observation of cicatricial fibroblasts in culture and its biological properties. **Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi**, 12(6): 332-5, 1998.

HUNT J. A.; MOISIDIS E.; HAERTSCH P. Initial experience of Integra in the treatment of post-burn anterior cervical neck contracture. **Br J Plast Surg**, 53(8): 652-8, 2000.

HUYNH T.; ABRAHAM G.; MURRAY J.; BROCKBANK K.; HAGEN P. O.; SULLIVAN S. Remodeling of an acellular collagen graft into a physiologically responsive neovessel. **Nat Biotechnol**, 17: 1083-6, 1999.

JANSSON K.; HAEGERSTRAND A.; KRATZ G. A biodegradable bovine collagen membrane as a dermal template for human *in vivo* wound healing. **Scand J Plast Reconstr Hand Surg**, 35(4): 369-75, 2001.

JEROME A.; RAMSHAW J.A. Editorial: collagen-based. **Biomaterals**, 9: 137-8, 1992.

JOHNEN C.; KAGE A.; OECHEL A.; NEUHAUS P.; GERLACH J. C. Investigation on reconstruction of skin for autologous transplantation. **Transplant Proceed**, 33: 618-9, 2001.

KAUFMAN H. E.; STEINEMANN T. L.; LEHMAN E.; THOMPSON H. W.; VARNELL E. D.; JACOB-LA BARRE J. T. et al. Collagen based drug delivery and artificial tears. **J Ocul Pharmacol**, 10(1): 17-27, 1994.

KEMP P. D. Tissue engineering and cell populated collagen matrices. In: Streuli C.; Grant M. **Methods in molecular biology,** 2000. p.287-93. v.139.

KIM B. M.; SUZUKI S.; NISHIMURA Y.; UM S. C.; MOROTA K.; MARUGUCHI T. et al. Cellular artificial skin substitute produced by short period simultaneous culture of fibroblasts and keratinocytes. **Br J Plast Surg**, 52(7): 573-8, 1999.

KREMER M.; LANG E.; BERGER A. C. Evaluation of dermal-epidermal skin equivalents (composite-skin) of human keratinocytes in a collagen-glycosaminoglycan matrix (Integra^{TM} Artificial Skin). **Br J Plast Surg**, 53(6): 459-65, 2000.

LEE C. H.; SINGLA A.; LEE Y. Biomedical applications of collagen. **Int J Pharm**, 221 (1-2): 1-22, 2001.

LUCAS P. A.; SYFTESTAD G. T.; GOLDBERG V. M.; CAPLAN A. I. Ectopic induction of cartilage and bone by water soluble proteins from bovine bone using a collagenous delivery vehicle. **J Biomed Mater Res**, 23: 23-39, 1989.

MA J.; WANG H.; HE B.; CHEN J. A preliminary *in vitro* study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neofetal dermal fibroblasts. **Biomaterials**, 22: 331-6, 2001.

MARGULIS A.; ZHANG W.; GARLICK J. A. *In vitro* fabrication of engineered human skin. **Methods Mol Biol,** 289: 61-70, 2004.

MAUCH C.; ADELMANN-GRILL B.; HATAMOCHI A.; KRIEG T. Collagenase gene expression in fibroblasts is regulated by a three-dimensional contacto with collagen. **FEBBS Lett**, 250: 301-5, 1989.

MILLER J. M.; ZOLL D. R.; BROWN E. O. Clinical observation on use of an extrude collagen suture. **Arch Surg**, 88: 164-174, 1964.

MILLER P. L.; MATTHEY F. C. A cost-benefit analysis of initial burn cultures in the management of acute burns. **J Burn Care Rehab**, 21(4): 300-3, 2000.

MOLL I.; HOUDEK P.; SCHMIDT H.; MOLL R. Characterization of epidermal wound healing in a human skin organ culture model: acceleration by transplanted keratinocytes. **J Invest Dermatol**, 111: 251-8, 1998.

MUIR I. F.; PADILLA-LAMB A.; STEWART J. E.; EHWTLEY D. N. Growth inhibition of culture fibroblasts by extracts from human dermis. **Br J Plast Surg**, 50: 186-93, 1997.

MULLINS R. J.; RICHARDS C.; WALKER T. Allergic reactions to oral, surgical and topical bovine collagen. Anaphylactic risk for surgeons. **Austr N Z J Ophthalmol**, 24(3): 257-60, 1996.

NANCHAHAL J.; DOVER R.; OTTO W. R. Allogeneic skin substitutes applied to burns patients. **Burns**, 28(3): 254-7, 2002.

NAVSARIA H. A.; OJEH N. O.; MOIEMEN N.; GRIFFITHS M. A.; FRAME J. D. Reepithelialization of a full-thickness burn from stem cells of hair follicles micrografted into a tissue-engineered dermal template (Integra). **Plast Reconstr Surg**, 113(3): 978-81, 2004.

PHILLIPS T. J. New skin for old; developments in biological skin substitutes. **Arch Dermatol**, 134: 344-9, 1998.

PONEC M.; GIBBS S.; PILGRAM G.; BOELSMA E.; KOERTEN H.; BOUWSTRA J. et al. Barrier function in reconstructed epidermis and its resemblance to native human skin. **Skin Pharmacol Appl Skin Physiol**, 14 (Suppl 1): 63-71, 2001.

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

POUMAY Y.; DUPONT F.; MARCOUX S.; LECLERCQ-SMEKENS M.; HERIN M.; COQUETTE A. A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in *in vitro* studies. **Arch Dermatol Res,** 296(5): 203-11, 2004.

PRENOSIL J. E.; KINO-OKA M. Computer controlled bioreactor for large-scale production of cultured skin grafts. **Ann N Y Acad Sci**, 875: 386-97, 1999.

PRUNIÉRAS M. Culture of skin: how and why. **Int J Derm**, 14: 12-22, 1975.

PRUNIÉRAS M.; RÉGNIER M.; WOODLEY D. Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. **J Invest Dermatol**, 81(1 Suppl): 28s-33s, 1983.

RADHIKA M.; BABU M.; SEHGAL P. K. Cellular proliferation on desamidated collagen matrices. **Comp Biochem Physiol**, 124(C): 131-9, 1999.

RAO K. P. Recent developments of collagen-based materials for medical applications and drug delivery systems. **J Biomater Sci**, 7(7): 623-45, 1995.

RÉGNIER M.; PRUNIÉRAS M.; WOODLEY D. Growth and differentiation of adult human epidermal cells on dermal substrates. **Front Matrix Biol**, 9: 4-35, 1981.

RÉGNIER M.; ASSELINEAU D.; LENOIR M. C. Human epidermis reconstructed on dermal substrates *in vitro*: an alternative to animals in skin pharmacology. **Skin Pharmacol**, 3(2): 70-85, 1990.

RÉGNIER M.; CARON D.; REICHERT U.; SCHAEFER H. Reconstructed human epidermis: a model to study *in vitro* the barrier function of the skin. **Skin Pharmacol**, 5(1): 49-56, 1992.

RÉGNIER M.; STAQUET M. J.; SCHMIDT D.; SCHMIDT R. Integration of Langerhans cells into a pigmented reconstructed human epidermis. **J Invest Dermatol**, 109: 510-2, 1997.

RÉGNIER M., PATWARDHAN A.; SCHEYNIUS A.; SCHIMDT R. Reconstructed human epidermis composed of keratinocytes, melanocytes and Langerhans cells. **Med Biol Eng Comput**, 36(6): 821-4, 1998.

REHDER J.; SOUTO L. R. ; ISSA C. M. ; PUZZI M.B. Model of human epidermis reconstructed *in vitro* with keratinocytes and melanocytes on dead de-epidermized human dermis. **Sao Paulo Med J**, 122(1): 22-5, 2004.

RHEINWALD J. G.; GREEN H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. **Cell**, 6(3): 331-43, 1975.

RONFARD V.; BROLY H.; MITCHELL V.; GALIZIA J.P.; HOCHART D.; CHAMBON E. et al. Use of human keratinocytes cultured on fibrin glue in the treatment of burn wounds. **Burns**, 17(3): 181-4, 1991.

RONFARD V.; RIVES J. M.; NEVEUX Y.; CARSIN H.; BARRANDON Y. Long-term regeneration of human epidermis on third degree burns transplanted with autologous cultured epithelium grown on a fibrin matrix. **Transplantation**, 70(11): 1588-98, 2000.

ROSSLER B.; KREUTER J.; SCHERER D. Collagen microparticles: preparation and properties. **J Microencapsulation**, 12: 49-57, 1995.

SCARBOROUGH J. On medications for burns in classical antiquity. **Clin Plast Surg**, 10(4): 603-10, 1983.

SILVA S. C.; SILVA JR S. C. Queimaduras: tratamento local. In: MÉLEGA J. M.; ZANINI S. A.; PSILLAKIS J. M. **Cirurgia Plástica reparadora e estética.** Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p.217-35.

SLAVKIN H. C.; PANAGIS J. S.; KOUSVELARI E. Future opportunities for bioengineering research at the National Institutes of Health. **Clin Orthop**, 367 (Suppl): S17-30, 1999.

SUPP A. P.; WICKETT R. R.; SWOPE V. B.; HARRIGER M. D.; HOATH S. B.; BOYCE S. T. Incubation of cultured skin substitute in reduced humidity promotes cornification *in vitro* and stable engrafment in athymic mice. **Wound Repair Regent**, 7(4): 226-37, 1999.

STEWART J. E.; WHEATLEY D. N.; HOLMES J. D.; MUIR I. F. Purification and identification of a human dermal extract component inhibitory to fibroblast proliferation. **Cell Biol Internat**, 25: 607-12, 2001.

STOCK U. A.; VACANTI J. P. Tissue engineering: current state and prospects. **Annu Rev Med**, 52: 443-51, 2001.

TAUBE M. B.; TAÏEB A. Lipid metabolism in cultured keratinocytes. **An Bras Dermatol**, 75(1): 75-84, 2000.

TERSKIKH V. V.; VASILIEV A. V. Cultivation and transplantation of epidermal keratinocytes. Int Rev Cytol, 188: 41-72, 1999.

THACHARODI D.; RAO K. P. Rate-controlling biopolymer membranes as transdermal delivery systems for nifedipine: development and *in vitro* evaluations. **Biomaterials**, 17: 1307-11, 1996.

URMACHER C. D. Normal Skin. In: STERNBERG S. S. **Histology for pathologists.**, 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. p.25-45.

VAISSIERE G.; CHEVALLAY B.; HERBAGE D.; DAMOUR O. Comparative analysis of different collagen-based biomaterials as scaffolds for long-term culture of human fibroblasts. **Med Biol Eng Comput**, 38(2): 205-10, 2000.

VAN ZUIJLEN P. P.; VLOEMANS J. F.; VAN TRIER A. J.; SUIJKER M. H.; VAN UNEN E.; GROENEVELT F. et al. Dermal substitution in acute burns and reconstructive surgery: a subjective and objective long-term follow-up. **Plast Reconstr Surg**, 108(7): 1938-46, 2001.

VANDER ELST E. Historical aspects of the treatment of burns. In Loshoir J. (ed.): **Physiopathology and treatment of burns.** Brussells. Presses Académiques Européennes, 1964. p.1-23.

WALLACE A. B. Treatment of burns, a return to basic principles. **Brit J Plast Surg**, 1: 232, 1949.

WATT F. M. The epidermal keratinocyte. **Bioessays**, 8(5): 163-7, 1988.

WELSS T., BASKETTER D. A.; SCHRÖDER K. R. *In vitro* skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. **Toxicol *in vitro*.** 18(3): 231-43, 2004.

YANNAS I. V.; BURKE J. F.; GORDON P. L.; HUANG C. Collagen like membranes for synthetic skin. **Ger Offen**, 263: 1909, 1977.

YANNAS I. V.; BURKE J. F. Design of an artificial skin: I. Basic design principles. **J Biomed Mater Res**, 14(1): 65-81, 1980.

YANNAS I. V.; BURKE J. F.; GORDON P. L.; HUANG C.; RUBENSTEIN R. H. Design of an artificial skin: II. Control of chemical composition. **J Biomed Mater Res**, 14(2): 107-32, 1980.

YOUNG D. M.; GREULICH K. M.; WEIER H. G. Species-specific *in situ* hybridization with fluorochrome-labeled DNA probes to study vascularization of human skin grafts on athymic mice. **J Burn Care Rehabil**, 17: 305-10, 1996.

9- REFERÊNCIA COMPLEMENTAR

BILLINGHAM R. E.; REYNOLDS J. Transplantation studies on sheet of pure epidermal epithelium and of epidermal cell suspensions. **Br J Plast Surg**, 23: 23-5, 1952.

BISSEL, M. J. The differentiated state of normal and malignant cells or how to define a "normal" cell in culture. **Int Rev Cytol**, 70: 27-100, 1981.

BRIGGAMAN R. A.; WHEELER C. E. Epidermal-dermal interactions in adult human skin: role of dermis in epidermal maintenance. **J Invest Dermatol**, 51: 454-9, 1968.

BOYCE E.; EHRLICH H. P.; BUTTLE D. J.; Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal and serum-free serial culture. **J Invest Dermatol**, 81: 33s-40s, 1983.

CARREL A. The treatment of wounds. **JAMA**, 55: 2148-54, 1910.

CLOWES W. A. A profitable and necessary book of observations for all those burned with the flame of gun powder. **London**. 1596.

COCKSHOTT W. P. The history of the treatment of burns. **Surg Gynec Obstet**, 102(1): 116-24, 1956.

COULOMB B.; DUBERTRET L.; MERRIL C.; TOURAINE R.; BELL E. The collagen lattice: a model for studying the physiology, biosynthetic function and pharmacology of the skin. **Br J Dermatol**, 3(27): 83-7, 1984.

DAVIDSON E. C. The prevention of toxemia of burns. Treatment by tannic acid solution. **Am J Surg**, 40: 114, 1926.

GALLICO G. G.; O'CONNOR N. E.; COMPTON C. C.; KEHINDE O.; GREEN H. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. **N Engl J Med**, 311(7): 448-51, 1984.

GREEN H.; KEHINDE O.; THOMAS J. Growth of cultured human epidermal cells into epithelia suitable for grafting. **Proc Natl Acad Sci**, 76(11): 5665-8, 1979.

LEARY T.; JONES L.; APPLEBY M.; BLIGFHT A.; PARKINSON K.; STANLEY M. Epidermal keratinocyte self-renewal is dependent upon dermal integrity. **J Invest Dermatol**, 99: 422-8, 1991.

MÉLEGA J. M.; ZANINI S. A.; PSILLAKIS J. M. **Cirurgia Plástica reparadora e estética.** Rio de Janeiro: MEDSI, 1992.

PADGETT E. C. **Skin grafting.** Springfield, Illinois: Ed. Charles C. Thomas, 1942.

PRUNIÉRAS M. To reconstitute skin: theme and variations. **Matrix**, 11: 302-5, 1991.

SCHULTHEISS D.; BLOOM D. A.; WEFER J.; JONAS U. Tissue engineering from Adam to the zygote: historical reflections. **World J Urol**, 18(1): 84-90, 2000.

SHEDD D. P. Historical landmarks in the treatment of burns. **Surgery**, 43(6): 1024-36, 1958.

STEWART J. E. The influence of a natural dermal extract on wound healing. Aberdeen, 1999. (Tese – Doutorado – University of Aberdeen).

SUN T. T.; EICHNER R.; NELSON W. G.; TSENG S. C.; WEISS R. A.; JARVINEN M. et al. Keratin classes: molecular markers for different types of epithelial differentiation. **J Invest Dermatol**, 81(1): 109s-115s, 1983.

VON MANGOLDT F. Die Überhäutung von Wundflächen durch Epithelaussaat; Eine neue Methode der Transplantation. **Deutsche Med Wschrift**, 27: 798-9, 1895.

10- ANEXOS

Aprovação do Comitê de Ética da FCM/UNICAMP

(Original em posse do pesquisador)

Observação: O projeto original desta pesquisa compreendia teste clínico com seres humanos, conforme consta no relatório de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/UNICAMP. Entretanto, por falta de recursos e de apoio financeiro de Órgãos Oficiais de Pesquisa, o Projeto de Pesquisa foi modificado em junho de 2003, tendo sido o teste clínico envolvendo seres humanos excluído. O nome do projeto original, "MODELO DE PELE RECONSTRUÍDA PARA ESTRUTURAÇÃO DE LABORATÓRIO DE PELE", também foi modificado em junho de 2003, para "MODELO DE PELE HUMANA (DERME + EPIDERME) RECONSTRUÍDA *IN VITRO*.

UNICAMP

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
✉ Caixa Postal 6111
13083-970 Campinas, SP
☎ (0__19) 3788-8936
fax (0__19) 3788-8925
cep@head.fcm.unicamp.br

CEP, 22/01/02
(Grupo III)

PARECER PROJETO: N° 368/2002

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: **"MODELO DE PELE RECONSTRUÍDA PARA ESTRUTURAÇÃO DE LABORATÓRIO DE PELE"**
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Maria Beatriz Puzzi Taube
INSTITUIÇÃO: Unidade de Terapia de Queimados/Santa Casa de Limeira – Laboratório de Cultura de Células da Pele e Epiderme Reconstruída (LCCP)/Departamento de Patologia Clínica/FCM/UNICAMP
APRESENTAÇÃO AO CEP: 12/12/2001

II - OBJETIVOS

1 - Implantar a técnica de cultura de fibroblastos no LCCP. 2 – Pesquisar e obter uma derme reconstruído, a partir de fibroblastos de uma matriz de colágeno, que possa ser utilizada clinicamente, isolada ou associada á epiderme. 3 – Estruturação e implantação de um laboratório de pele. 4 – Testar pele íntegra autóloga reconstruída e seus derivados em pacientes queimados.

III - SUMÁRIO

O tempo estimado para o estudo é de 24 meses, que será divido em 5 fases. A fase que envolve seres humanos é a terceira, onde serão submetidos ao tratamento de enxertia 24 pacientes com queimaduras agudas, que serão divididos em 6 subgrupos (4 pacientes cada), de acordo com o tipo de enxertia: A: epiderme isolada; B: epiderme associada a matriz de colágeno acelular; C: epiderme associada a matriz de colágeno com fibroblastos (derme reconstruída); D: queratinócitos e melanócitos em cultura sobre a matriz de colágeno com fibroblastos (derme reconstruída); E: queratinócitos e melanócitos em cultura sobre a matriz de colágeno acelular e; F: derme reconstruída isolada. Serão avaliados, em cada subgrupo de pacientes, a integração e viabilidade dos diferentes tipos de enxertos, atráves de documentação fotográfica de biópsias seriadas (os pacientes serão submetidos a 2 biópsias locais após enxertia, uma precoce, com 21 dias após enxertia, e uma tardia, 6 meses após.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O termo de Consentimento Livre e Esclarecido, adequado e eficiente no se refere às condutas adotadas na pesquisa e relacionadas aos sujeitos participantes. O Projeto estabelece uma previsão orçamentárias. A pesquisa será patrocinada pela FAPESP.

Recomendamos a aprovação deste projeto de pesquisa.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

Atenção: Projetos de Grupo I serão encaminhados à CONEP e só poderão ser iniciados após Parecer aprovatório desta.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na I Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de janeiro de 2002.

Prof. Dr. Sebastião Araújo
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP