

IPEN – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
EDITAL INTERNO INTERCENTROS - DPDE/IPEN Nº 5/2018
Chamada para Seleção de Projetos

SKIN-ON-A-CHIP: PLATAFORMA MICROFLUIDICA PARA AVALIAÇÃO DE EQUIVALENTES DERMO-EPIDERMICOS

Palavras Chaves: Tecnologias em Saúde, Ensaios Pré-Clínicos, Regulamentação e Registro.

Pesquisadora Coordenadora:

Monica Beatriz Mathor, PhD

Centro de Tecnologia das Radiações (CTR)

Pesquisadores Responsáveis:

Anderson Zanardi de Freitas, PhD, Centro de Lasers e Aplicações (CLA)

Carlos Roberto Jorge Soares, PhD, Centro de Biotecnologia (CB)

Fabiana Medeiros da Silva, PhD, Centro de Biotecnologia (CB)

Solange Kazumi Sakata, PhD, Centro de Tecnologia das Radiações (CTR)

Wagner de Rossi, PhD, Centro de Lasers e Aplicações (CLA)

Centros:

Centro de Biotecnologia (CB)

Centro de Tecnologia das Radiações (CTR)

Centro de Lasers e Aplicações (CLA)

Empresa:

Tatiana Franco da Cunha, Laboratório Biosíntesis P&D do Brasil Ltda

Atividades:

Atividade 220 - Aplicação das Radiações e dos Radioisótopos na Indústria e no Meio Ambiente

Atividade 230 - Fontes Radioativas e Aplicações das Radiações na Saúde

Atividade 820 – Biofármacos

Atividade 920 - Aplicações de Lasers

JULHO DE 2018

1. INTRODUÇÃO

Há muitos anos, ensaios que utilizam modelos animais têm servido como um meio de se determinar a eficácia e a segurança de diversas substâncias e produtos, principalmente na área farmacêutica, cosmética e de produtos para a saúde¹. Esses ensaios, conhecidos como ensaios pré-clínicos, tem a finalidade de proteger os consumidores de efeitos secundários indesejados ou mesmo de danos graves para a saúde. Assim todos os ingredientes químicos dos chamados produtos de consumo devem ser submetidos a uma avaliação toxicológica extensiva².

Recentemente, a utilização de métodos alternativos ao uso de animais tem se tornado cada vez maior e se tornou uma das maiores preocupações dos órgãos regulamentadores. Na União Europeia, desde 2009, apenas os testes *in vitro* são permitidos para demonstrar a segurança dos novos ingredientes cosméticos para a pele. No Brasil, a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA) e o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) vem adotando métodos alternativos validados por guias internacionais tais como a OECD. Segundo a resolução normativa nº18 do CONCEA de 2014, com o apoio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e outros órgãos de regulação e monitoramento, será obrigatório no Brasil a adoção dos métodos alternativos a partir de 2019^{2,3,4,5,6}.

Neste contexto, um dos desafios no estabelecimento de novos métodos de ensaio *in vitro* visa determinar parâmetros de avaliação de ingredientes, compostos ou materiais que sejam potencialmente irritantes, corrosivos ou sensibilizantes². Estes métodos de ensaio estão baseados na reconstrução *in vitro* de equivalentes dermoepidérmicos⁷. O modelo celular tridimensional *in vitro* é constituído por células do tipo queratinócitos e fibroblastos humanos não transformados que formam um extrato córneo em camadas que representam as principais classes lipídicas dos modelos *in vivo*⁸.

Na pesquisa em modelos biológicos tridimensionais, assim como para modelos de equivalentes dermoepidérmicos reconstruídos, a ciência de engenharia de tecidos vem se destacando nas últimas décadas e tem sido amplamente investigada no desenvolvimento de uma nova linha interdisciplinar chamada de “human-on-a-chip” ou “tissue-on-a-chip”, sem tradução específica

para o português, mas que refere-se a possibilidade de se avaliar o potencial tóxico de substâncias não apenas em tecidos humanos e células humanas, o que já é realizado atualmente, mas por meio de um dispositivo (“chip”) que articule diferentes cultivos celulares e teciduais em um sistema circulatório, e pelo qual seja possível simular os efeitos de uma substância sobre a pele e de sua absorção.

O futuro desta tecnologia prediz a capacidade de recriar órgãos humanos, por meio de cultura de células inseridas nestes dispositivos que simulem características do organismo humano e, por apresentar preditivo muito superior às tecnologias atuais, visa ser aplicada em testes pré-clínicos e clínicos.

A engenharia de tecidos é uma área interdisciplinar que através da combinação da cultura celular ao uso dos biomateriais se mostra uma importante ferramenta a ser utilizada na reconstituição de órgãos e tecidos^{9, 10}. O conceito de engenharia de tecidos surgiu, em 1993, quando o médico cirurgião Joseph P. Vacanti e o engenheiro químico Robert S. Langer pesquisaram diversas formas de manipular células em laboratório, a fim de construir órgãos e tecidos para transplante e desde então a engenharia de tecidos vem trazendo novos entendimentos^{11, 12, 13}.

1.1. Skin-on-a-chip

A pele é o maior órgão do corpo humano, que consiste em camadas bem organizadas, que constituem a derme e a epiderme, tendo o colágeno como principal componente de sustentação. A pele é altamente especializada, por proporcionar a função de barreira, impedindo a perda de água, resistindo a traumas mecânicos, protegendo contra agentes biológicos, o calor e a irradiação ultravioleta (UV). Desta forma, a epiderme constitui a barreira mais externa entre o corpo humano e o meio ambiente e é, portanto, exposta a várias substâncias potencialmente nocivas^{14, 15, 16}.

Quanto à sua forma estrutural a pele é composta por três camadas principais: a primeira delas é a epiderme, uma camada superficial não vascularizada formada por tecido epitelial. A segunda camada é a derme, dividida em duas diferentes partes: a primeira, bastante delgada, mas

altamente vascularizada chamada de derme papilar, e a segunda, denominada derme reticular altamente colagenosa e mais espessa, sendo as duas compostas por tecido conjuntivo. A terceira camada é a hipoderme, constituída de células adiposas e localizada abaixo das camadas da derme¹⁷.

A derme é constituída por uma espessa camada de tecido conjuntivo composto por grandes quantidades de elastina e colágeno. Na derme são encontradas células endoteliais, células musculares lisas, mastócitos, fibroblastos e demais células do sistema imunológico, assim como uma grande porção de matriz extracelular. O colágeno em conjunto com as fibras elásticas da pele são os principais componentes do tecido conjuntivo fibroso da derme e estão intimamente relacionados com a cicatrização de feridas, formação de cicatrizes e as propriedades biomecânicas da pele^{17, 18}.

Os fibroblastos são células presentes na derme, responsáveis pela produção, organização e manutenção do colágeno presente na matriz extracelular (proteína mais abundante na derme, correspondendo a 90% de sua totalidade) e das fibras elásticas que compõem a derme. A distribuição destes fibroblastos na derme garante a sua elasticidade e textura, além de ter uma participação importante na sustentação do tecido, por serem responsáveis pela síntese de diferentes macromoléculas que compõem a matriz^{18, 19}.

A epiderme é a camada mais externa da pele, compacta e praticamente impermeável, formando a primeira barreira física contra agentes externos, formada por quatro tipos celulares distintos: os queratinócitos, os melanócitos, responsáveis pela produção de melanina, as células de Langerhans, responsáveis pelo sistema de imunovigilância cutâneo e as células de Merkel, receptoras para o tato⁵.

Os queratinócitos são as células mais abundantes da epiderme, ocupando mais de 90% de sua superfície. Essas células compõem as quatro principais camadas da epiderme: camada córnea, camada granular, camada espinhosa e camada basal. A camada córnea é a região mais externa e previne contra perda de água e protege de agentes externos^{16, 18}. Ela é formada por queratinócitos achatados e mortos que são repostos continuamente por células das camadas mais profundas devido a sua perda constante. O interior das células dessa camada é constituído basicamente de queratina, filamentos que

proporcionam estabilidade mecânica¹⁷. A camada granular que se encontra na metade da epiderme, é constituída por queratinócitos achatados que sofrem apoptose e possuem queratina. Eles produzem uma secreção lipídica que tem a função de proteção à pele. A camada espinhosa é formada por células mais alongadas que se encaixam paralelamente e que fornecem força e flexibilidade para a pele. Como apresentado na figura 1, o extrato mais profundo da pele é a camada basal, constituída de uma única coluna de queratinócitos colunares, que também possui células tronco em sua estrutura, e são responsáveis pela produção contínua de queratinócitos¹⁷.

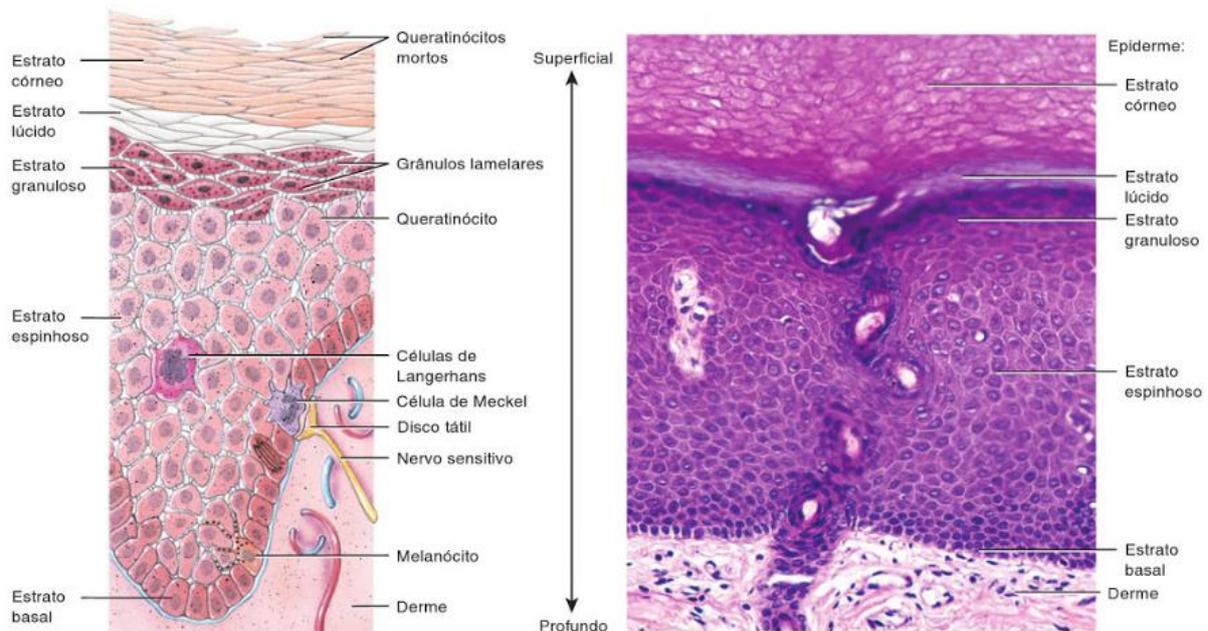


Figura 1 – Camadas da pele segundo Tortora, 2012

Os equivalentes dermo-epidérmicos apresentam as estruturas e camadas da pele normal, foram construídos pela primeira vez em 1974 por Rheinwald & Green a partir de uma tentativa de cultura de células epidérmicas, em que um pequeno fragmento de pele saudável foi cultivado até que uma lâmina de queratinócitos fosse produzida⁷. Devido a crescente necessidade da elaboração de substitutos de tecidos humanos para o tratamento de feridos, assim como, a grande demanda de pele para os ensaios de segurança de produtos das áreas farmacêutica os modelos de equivalentes dermo-epidérmicos estão sendo aprimorados. Diversas técnicas *in vitro* para

reconstrução de tecidos estão sendo aceitas pelos órgãos regulamentadores, dentre essas técnicas estão os modelos compostos de uma matriz descelularizada utilizada como suporte para desenvolvimento de células cultivadas, como queratinócitos e fibroblastos¹⁹. Muitos estudos propõem a utilização de diferentes polímeros naturais ou sintéticos associados a essas células. Os queratinócitos e os fibroblastos são muito utilizados na construção desses modelos por se tratarem de células essenciais para a estrutura e sustentação do tecido^{7, 20}.

1.2. Microfabricação da Plataforma Skin-on-a-chip

Ao longo dos últimos anos, a necessidade de tecnologias de micro-usinagem tem crescido para aplicações científicas e industriais. Segmentos das áreas de biomedicina, microeletrônica, indústria automotiva, dentre outros, demandam uma grande variedade de dispositivos, tais como circuitos microfluídicos, microválvulas, filtros de partículas, micromotores, micromoldes, etc. Este grande crescimento da micro-usinagem exigiu uma variedade de novos métodos, como a micro-usinagem mecânica, por descargas elétricas (EDM - Electrical Discharge Machining) e por feixe de elétrons (Focused Ion Beam - FIB) e Litografia.

Uma técnica de usinagem de grande precisão, e mais recente, é a usinagem por laser de pulsos ultracurtos²¹. A utilização deste tipo de laser, com pulsos de duração temporal de femtossegundos (10^{-15} s) surge como uma forte possibilidade para micro-usinagem com várias vantagens sobre os pulsos mais longos. Esta pequena duração diminui a transferência de energia para o material, resultando em ablações quase não-térmicas que minimizam a zona afetada pelo calor (ZAC) e preservam as propriedades do material circundante. Além disso, os pulsos ultracurtos criam intensidades muito elevadas que promovem uma interação altamente não-linear com a matéria, resultando em ablações extremamente localizadas que podem gravar o material com precisão nanométrica, permitindo a fabricação de estruturas diminutas. Além disso, os pulsos ultracurtos promovem ablação não-seletiva em relação à classe de material (dielétrico, metálico, etc), permitindo a usinagem de todos os tipos de materiais com o mesmo laser.

O Centro de Lasers e Aplicações – CLA – do IPEN já vem trabalhando nos últimos anos com aplicações de lasers, particularmente de lasers de pulsos ultracurtos, em pesquisa básica²²⁻²⁶, aplicações industriais²⁷, médicas²⁸, e de monitoração ambiental. Assim, com base na experiência adquirida e interesse de aplicações realizadas pelo CLA, propõe-se neste projeto o desenvolvimento de dispositivos microfluídicos específicos com a utilização desta técnica.

1.3. Diagnóstico Óptico por Tomografia por Coerência Óptica (OCT)

A tomografia de coerência óptica (OCT) fornece um método não invasivo para imagens de tecido da pele^{29, 30, 31}. Na maioria das aplicações em tomografia por coerência óptica, a variação espacial da secção de choque de espalhamento é a primeira fonte de contraste para a construção das imagens. Vários trabalhos vêm sendo publicados com diversas abordagens para o aumento do contraste nas imagens OCT, em especial a redução do “speckle”^{32, 33}. Apesar disso, o padrão de speckle também carrega uma importante informação do deslocamento dos centros espalhadores, e estes padrões serão utilizados na caracterização de micro fluxo em microestruturas.

1.4. Análises Bioquímicas por Biosensores de Óxido de Grafeno

O grafeno é um nanomaterial bidimensional à base de carbono que tem chamado atenção devido às suas propriedades mecânicas e físico-químicas únicas: alta área superficial específica, estabilidade química, a sua alta capacidade de resistência mecânica e excelente condutividade térmica e elétrica. O óxido de grafeno reduzido apresenta, além das propriedades do grafeno, grupos oxigenados que o torna biocompatível e que aumenta a sua afinidade por biomoléculas específicas, sendo neste caso o mais adequado para serem utilizados como biosensores³⁴.

No presente projeto, biosensores serão desenvolvidos para o monitoramento bioquímico associado à plataforma microfluidica Skin-on-a-chip.

O número de trabalhos publicados a partir de 2010 relacionados ao uso de compostos a base de grafeno como sensores na plataforma microfluidica foi 62 trabalhos, sendo 5 na forma de patentes, e esse numero tem aumentado a cada ano, exibindo assim o potencial ainda a ser explorado³⁵

O uso de imunossensores eletroquímicos que será empregado neste projeto tem atraído atenção por combinar a alta especificidade ensaios tradicionais com a rapidez, poucos reagentes e baixos limites de detecção das medidas eletroquímicas³⁶.

1.5. Inovação pretendida projeto

As linhas de pesquisas lideradas pela equipe executora deste projeto demonstraram individualmente o desenvolvimento de competências que possibilitará ao IPEN acompanhar o estado da arte mundial para o estabelecimento de uma linha de pesquisa interdisciplinar no tema “human-on-a-chip”/ “tissue-on-a-chip, em modelos colaborativos como os que vem sendo adotados nas principais instituições de referência: Wyss Institute , na Universidade de Harvard (<https://wyss.harvard.edu/>); Tissue Chip for Drug Screening, programa do NIH (<https://ncats.nih.gov/tissuechip/about>); Fraunhofer Institute (<https://www.igb.fraunhofer.de/en/research/competences/attract-group-organ-on-a-chip.html>).

Neste novo projeto nossa proposta de inovação é implementar esta tecnologia a partir das especialidades de cada pesquisador – cultivos de células e tecidos, estudos toxicológicos *in vitro*, microfluídica, diagnósticos ópticos e biossensores na obtenção de uma plataforma microfluídica Skin-on-a-chip e a partir desta experiência transpor a plataforma para outros sistemas biológicos, assim como a interação entre eles.

2. OBJETIVO

Este projeto abordará inovação no desenvolvimento e validação de um dispositivo Skin-on-a-Chip baseado em uma plataforma de microfluídica que permitirá a manutenção de equivalentes de pele humana compostos pelos compartimentos epidérmico e dérmico, com análises ópticas e bioquímicas em tempo real, para fins de teste de segurança de radiofármacos, fármacos, cosméticos e produtos para a saúde, avaliando os efeitos biológicos nas células e estrutura da pele, com o objetivo de se cumprir futuras exigências

regulatórias nacionais e internacionais e posicionar competitivamente o IPEN no cenário interno e externo.

3. METODOLOGIA

3.1. Cultura celular e preparo de tecidos humanos equivalentes

Pesquisadores: Dra Monica B. Mathor e Dra Fabiana Medeiros da Silva

Serão utilizadas células de tecido adiposo (células-tronco somáticas) cultivadas “in vitro” em conjunto com diferentes matrizes dérmico-epidérmicas repovoadas ou não por queratinócitos.

No Laboratório de Processamento de Tecidos Biológicos, do CTR/IPEN, o Biobanco, aprovado pela Plataforma Brasil em 25/02/2013 sob o número CAAE: 10867212.3.0000.5421, garante o armazenamento correto das células originadas de tecidos biológicos humanos, e é uma exigência do Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

O Laboratório de Estudo Biológicos *In Vitro*, do CB/IPEN possui reconhecimento em Boas Práticas de Laboratório (BPL) junto ao INMETRO e ANVISA e garante a condução de teste e estudos aceitos por organismos internacionais tais como o FDA, ISO e a OECD. As manutenções e preparos serão realizados em sala limpa Classe 10.000, com meios de cultura apropriados à 37° C com 5% de CO₂.

3.2. Testes de viabilidade celular *in vitro*

Pesquisadores: Dr Carlos R. J. Soares e Dra Fabiana Medeiros da Silva

Serão realizados ensaios avaliando-se, pelo menos 3 concentrações de cada substancia-teste. Para tanto, as células serão semeadas nos canais microfluídicos em concentrações a serem estabelecidas (3000 a 10.000 cel/canal) e incubadas a 37°C e 5% de CO₂. As células serão expostas à substância teste por períodos pré-definidos agudos (24 horas) e/ou crônicos (até 96 horas). Ao final da exposição, os fluidos serão coletados e o corante MTS/PMS será adicionado. Após um período de 2 horas de incubação será realizada leitura em leitor de placas em um comprimento de onda de 490 nm.

O cálculo da viabilidade celular em porcentagem (VC%) é efetuado conforme a fórmula:

$$VC\% = \frac{\text{Média das leituras da Densidade Ótica da substância teste}}{\text{Média das leituras da Densidade Ótica do controle de células}} * 100$$

Os tempos de exposição das culturas serão determinados em função das substancias testes previamente determinados por ensaios de outros grupos ou por informações em farmacopeias de destaque internacional.

O Laboratório de Estudo Biológicos *In Vitro*, do CB/IPEN em parceria com o Laboratório Biosíntesis P&D do Brasil Ltda, possui reconhecimento em Boas Práticas de Laboratório (BPL) junto ao INMETRO e ANVISA e garante a condução de teste e estudos aceitos por organismos internacionais tais como o FDA, ISO e a OECD. As manutenções e preparos serão realizados em sala limpa Classe 10.000, com meios de cultura apropriados à 37° C com 5% de CO₂.

3.3. Microfabricação da Plataforma Skin-on-a-chip

Pesquisador: Dr Wagner Rossi

Chips (devices-on-chips) serão fabricados a escalas micrométricas como sistemas biomiméticos em uma estrutura tridimensional (3D). Os dispositivos consistirão em canais 3D microfluídicos fabricados em vidro, os quais serão revestidos com células, com o objetivo de se controlar o fluxo de fluidos no cultivo para as células, assim como monitoramento e a coleta após a exposição a substancias testes O circuito contará com os componentes necessários ao seu funcionamento, como válvulas, reatores, misturadores, bombas e aquecedores. E, também com um sistema automático de controle de vazão de reagentes com grande precisão.

No Laboratório de Microfluídica do CLA/IPEN estão sendo desenvolvidos sistemas microfluídicos completos para diversos tipos de aplicações em química, bioquímica e processos ambientais. Alguns exemplos são circuitos para ensaios tipo ELISA; para crescimento de nanocristais; para controle de

tamanho de nanopartículas metálicas; para síntese do radiofármaco [18]FDG; para simulação de processos atmosféricos e de fluxo sanguíneo.

Os dispositivos microfluídicos serão produzidos em vidros ópticos BK7 através da usinagem com laser de pulsos ultracurtos conforme desenvolvimentos anteriores feitos nos laboratórios do CLA. As principais estruturas necessárias a um dispositivo deste tipo já foram desenvolvidas como metas de um projeto temático³⁷ em andamento e estão sendo produzidas rotineiramente neste tipo de material. Assim, microcanais, microbombas, reatores e outros elementos já podem ser produzidos de acordo com as especificações deste projeto. Sistemas de controle de fluxos de reagentes, e de aquecimento e controle de temperatura também já estão disponíveis para serem incorporados conforme a necessidade.

As estruturas são produzidas sobre a superfície de uma placa de vidro plana e vedadas com uma película fina do polímero PDMS (polydimetilsiloxano). Uma série de microcanais levam os reagentes até o local onde se pretende obter a reação, e o controle do fluxo destes reagentes é feito através de micro válvulas produzidas no próprio dispositivo, controladas com sistema pneumático acoplado a um software especialmente desenvolvido para esta aplicação. Assim, é possível obter fluxos controlados com vazão de até nanolitros por segundo, e temperaturas de até 80°C com precisão de fração de grau.

3.4. Análises Ópticas por Tomografia por Coerência Óptica (OCT)

Pesquisador: Dr Anderson Zanardi de Freitas

Características da pele equivalente cultivada no “chip” serão observadas em imagens de OCT a fim de determinar as camadas epidérmicas e possíveis alterações estruturais na plataforma microfluídica Skin-on-a-chip.

No Laboratório de Tomografia por Coerência Óptica (OCT-Optical Coherence Tomography), CLA/IPEN são desenvolvidos modelos matemáticos semi-empíricos para meios espalhadores, caracterização de tecidos biológicos quanto às suas propriedades ópticas visando o desenvolvimento de métodos de diagnósticos, abordando processamento de sinais e imagens.

3.5. Análises Bioquímicas por Biossensores de Óxido de Grafeno

Pesquisador: Dra Solange Kazumi Sakata

Para os biossensores serão utilizados como eletrodos de trabalho, o nanocompósito a base de oxido de grafeno- funcionalizado com nanopartículas de paládio ou ouro e com PEG-NH₂, que o torna mais biocompatível diminuindo a toxicidade³⁸ deste sensor e ao mesmo tempo aumenta o numero de sítios ativos para as enzimas que irão detectar as substâncias de interesse.

Os biossensores serão confeccionado no Laboratório de Nanomateriais à Base de Grafeno, do CTR/ IPEN , onde já são desenvolvidos nanocompósitos a base de grafeno com nanopartículas metálicas incorporada por radiação ionizante por um processo com a patente depositada³⁹ para a aplicação tecnológica como eletrocatalisadores e nanossensores. Posteriormente, o amino polietilenoglicol será ligado ao nanocomposito por uma reação química de amidação⁴⁰ para que seja colocado na superfície do eletrodo de trabalho de pasta de carbono e carbono vítreo.

Os estudos eletroquímicos serão realizados em parceria com o Prof. Dr. Lucio Angnes do Grupo de Pesquisa em Química Analítica Instrumental do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. A colaboração com esse grupo já foi consolidada na forma de trabalhos publicados.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Toda a análise será feita utilizando o programa GraphPad Prism (versão 5,0) para a elaboração de gráficos e tabelas. Para verificar as diferenças entre valores basais e diferentes substâncias, será utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida de pós-testes definidos de acordo com a organização dos grupos experimentais onde o valor de $p < 0,05$ será considerado estatisticamente significativo.

5. PRINCIPAIS CONTRIBUIÇÕES

- Fortalecer a infraestrutura técnica, laboratorial e de recursos humanos para o desenvolvimento de tecnologias e inovações relacionadas aos

processos de pesquisa, desenvolvimento, validação e registro das tecnologias de saúde produzidas pelo IPEN.

- Aumentar a capacidade laboratorial para avaliação de segurança de radiofármacos e produtos para a saúde, análise da qualidade e apoio ao desenvolvimento de novas tecnologias e novos produtos;
- Aprimorar os marcos regulatórios de biossegurança;
- Acompanhar o estado da arte mundial na produção de tecnologia de ponta interdisciplinar a partir das competências já desenvolvidas individualmente pelos pesquisadores do IPEN.

6. POTENCIAL DE EFETIVA INTERAÇÃO ENTRE OS CENTROS DE PESQUISA INTEGRANTES DA PROPOSTA

- Trabalhos publicados e efetiva colaboração do Dr. Anderson Zanardi de Freitas em dissertações e teses, orientadas pela Dra. Monica B. Mathor, no tema de identificação de efeitos da radiação em tecidos biológicos utilizando OCT e PS-OCT.
- Coordenação conjunta da Dra. Fabiana Medeiros da Silva e Dra. Monica B. Mathor da disciplina TNM5783 - Biomateriais - Propriedades e Avaliação, por trabalharem em temas similares utilizando cultura celular para obtenção de substitutos dermo-epidérmicos e testes “in vitro” de biocompatibilidade.
- Publicação e Coorientação, da Dra. Monica B. Mathor, de aluna de mestrado Jaqueline Jamara Souza Soares, orientada pela Dra. Solange Kazumi Sakata.
- Considerando a complementaridade dos temas de cada Centro de Pesquisa, os pesquisadores envolvidos neste projeto vem se reunindo desde dezembro de 2017, com o objetivo de discutir e planejar a efetivação desta pesquisa.

6.1. QUANTIDADE PREVISTA DE PRODUÇÃO DE C&T

- Publicações em revistas de impacto internacional: 2
- Congressos: 3 (com participação de mais de um integrante do grupo)
- Tecnologias: 2
- Patentes: pelo menos 1

7. IDENTIFICAÇÃO DOS PARTICIPANTES DO PROJETO

Nome	Função no Projeto	Qualificação
Anderson Zanardi de Freitas	Pesquisador do Projeto junto ao Centro de Lasers e Aplicações (CLA)	Doutor, PhD em Tecnologia Nuclear pelo IPEN-CNEN-SP
Carlos Roberto Jorge Soares	Pesquisador responsável do Projeto junto ao Centro de Biotecnologia (CB)	Doutor, PhD em Tecnologia Nuclear pelo IPEN-CNEN-SP
Fabiana Medeiros da Silva	Pesquisadora do Projeto junto ao Centro de Biotecnologia (CB)	Doutora, PhD em Tecnologia Nuclear pelo IPEN-CNEN-SP
Monica Beatriz Mathor	Coordenadora do Projeto, pelo Centro de Tecnologia das Radiações (CTR)	Doutora, PhD em Tecnologia Nuclear pelo IPEN-CNEN-SP
Solange Kazumi Sakata	Pesquisadora do Projeto junto ao Centro de Tecnologia das Radiações (CTR)	Doutora, PhD em Química pelo IQ-USP
Wagner de Rossi	Pesquisador responsável do Projeto junto ao Centro de Lasers e Aplicações (CLA)	Doutor, PhD em Tecnologia Nuclear pelo IPEN-CNEN-SP
A definir	Pós –doc a ser contratado pelo projeto FAPESP Institucional (CTR)	
Jaqueline Jamara Souza Soares	Mestranda (CTR)	Engenheira Química-Faculdades Oswaldo Cruz
Raynara Maria Silva Jacovone	Mestranda (CTR)	Bacharel em Química-IQ-USP
A definir	bolsista TT (CB)	
A definir	bolsista TT (CB)	
Cristhiano da Costa Herrera	Doutorando (CLA)	Instituto Técnico Federal de Itapetininga SP
Antonio Arleques Gomes	Mestrando (CLA)	
Tatiana Franco da Cunha	Pesquisadora do Projeto junto à empresa Biosintesis (declaração anexa)	Mestre em Tecnologia Nuclear pelo IPEN-CNEN-SP

8 ORÇAMENTO DETALHADO

Recursos Solicitados ao Edital (vide planilha anexa)

ITEM	DESCRIÇÃO	QUANTIDADE	VALOR
Material de Consumo	Kits, Reagentes, Meios de cultura, Eletrodos, Placas de vidros ópticos para confecção dos circuitos, Mangueiras, conexões e acessórios para ar comprimido, Acessórios ópticos para laser, Material plástico descartável, Vidraria, EPIs	—	R\$ 90.000,00
Inscrição em congresso	Para apresentação dos resultados em cada área específica	6	R\$ 25.200,00
Serviços de Terceiros	Manutenção e Calibração de Equipamentos / Melhorias e Reformas para instalações / Contratação de serviços especializados	—	R\$ 80.000,00
Valor Total:			R\$ 195.200,00

9. CRONOGRAMA

Atividades	Plano de Trabalho / Quadrimestre						Responsabilidades
	1º	2º	3º	4º	5º	6º	
Desenho e provas de conceito da plataforma microfluidica com integração das tecnologias							Coordenador e Equipe
Piloto da plataforma microfluidica Skin-on-a-chip							Coordenador e Equipe
Padronização das amostras de estudo, controles e sistemas testes							Coordenador e Equipe
Padronização e Validação dos testes de avaliação biológica							Coordenador e Equipe
Elaboração de Documentação da Qualidade – Registros, verificações e padronizações estatísticas e POPs							Coordenador e Equipe
Acompanhamento Bibliográfico							Coordenador e Equipe
Redação de papers e/ou patentes; apresentação de resultados em congressos e eventos científicos de interesse do projeto							Coordenador e Equipe
Relatórios							Coordenador e Equipe

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária). **Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos**. Brasília, 2ª edição, p. 9-71, 2012.
2. MEWES, K.R.; FISCHER, A.; ZÖLLER, N.N.; LAUBACH, V.; BERND, A.; JACOBS, A.; VAN ROMPAY, A.; LIEBSCH, M.; PIROW, R.; PETERSOHN, D. Catch-up validation study of an in vitro skin irritation test method based on an open source reconstructed epidermis (phase I). **Toxicology in Vitro**, p. 238–253, 2016.
3. RENAMA. **Rede Nacional de Métodos Alternativos**. Disponível em: <http://renama.org.br/2012/09/metodos-alternativos/>. Acesso em: 14 de agosto de 2016.
4. BRASIL. Resolução Normativa Nº 17, de 3 de julho de 2014. Dispõe sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. **Diário Oficial da União**. Nº 126, Seção 1, 4 de julho de 2014.
5. BRASIL. Resolução Normativa nº 18, de 24 de setembro de 2014. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. **Diário Oficial da União**. Nº 185, Seção 1, 25 de setembro de 2014.
6. COMISSÃO EUROPEIA. Relatório sobre o Desenvolvimento, a Validação e a Aceitação Legal de Métodos Alternativos aos Ensaios em Animais no Domínio dos Produtos Cosméticos (2008). Relatório da Comissão ao Parlamento Europeu e ao Conselho. Bruxelas, 2010.
7. ISAAC, C.; REGO, F.M.; LADEIR, P.R.S.; ALTRAN, S.C.; OLIVEIRA, R.C.; ALDUNATE, J.L.C.B.; PAGGIARO, A.O.; FERREIRA, M.C. Construção de substituto da pele composto por matriz de colágeno porcino povoada por fibroblastos dérmicos e queratinócitos humanos: avaliação histológica. **Rev. Bras. Cir. Plást.** p. 504, 2012.
8. OECD 439 - **In vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method**. 2015.
9. SILVA, F.M. Desenvolvimento, Caracterização e Estudo Pré-Clínico de Dispositivos Implantáveis Biocompatíveis Baseados no Polímero Poli(E-Caprolactona). **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Universidade de São Paulo**. São Paulo. 2011.
10. OLIVEIRA, C.S.; NASCIMENTO, M.; JUNIOR, E.A.; CRUSOÉ, M.; BAHIA, P.; ROSA, F.P. Avanços e aplicações da bioengenharia tecidual. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. p. 28-36, 2010.

11. LANGER, R.; VACANTI, J.P. Tissue Engineering. **Science**, v. 260, p. 920-926, 1993.
12. LANGER, R. Tissue Engineering. **Mol. Ther.**, v. 1, p. 12-15, 2000.
13. BHATIA, S.N. INGBER. Microfluidic organs-on-chips. **Nature Biotechnology**, v. 32 (8), p. 760-772, 2014.
14. SRIRAM, G.; BIGLIARDI, P.L.; BIGLIARDI-QI, M. Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models in vitro. **Eur. J. Cell Biol.**, p. 483–512, 2015.
15. QUAN T.; FISHER G. J. Role of Age-Associated Alterations of the Dermal Extracellular Matrix Microenvironment in Human Skin Aging: A Mini-Review. **Gerontology**, p.427-434, 2016.
16. QIU, J.; ZHONG, L.; ZHOU, M.; CHEN, D.; HUANG, X.; CHEN, J.; CHEN, M.; NI, H.; CAI, Z. Establishment and characterization of a reconstructed Chinese human epidermis model. **Int. J. Cosmetic Sci.**, p. 60–67, 2016.
17. TORTORA, G.J.; DERRICKSON, B. **Corpo Humano, Fundamentos de Anatomia e Fisiologia.**, 8ª edição. Artmed. Brasil. 2012.
18. WANG, Y.; XU, R.; HE, W.; YAO, Y.; LI, H.; ZHOU, J.; TAN, J.; YANG, S.; ZHAN, R.; LUO, G.; WU, J. Three-Dimensional Histological Structures of the Human Dermis. **Tissue Eng.**, v.21, Number 9, 2015.
19. SOUTO, L.R.M.; REHDER, J.; VASSALLO, J.; CINTRA, M.L.; KRAEMER, M.H.S.; PUZZI, M.B. Model for human skin reconstructed *in vitro* composed of associated dermis and epidermis. **Skin Cell Culture Laboratory**, Campinas, São Paulo, p. 71-76, 2006.
20. ALÉPÉE, N.; HIBATALLAH, J.; KLARIC, J.; MEWES, K.R.; PFANNENBECKER, U.; MCNAMEE, P. Assessment of cosmetic ingredients in the in vitro reconstructed human epidermis test method EpiSkin™ using HPLC/UPLC-spectrophotometry in the MTT-reduction assay. **Toxicol. Vitro**, p. 105–117, 2016.
21. SAMAD, R.E.; MACHADO, L.M.; VIEIRA JR, N.D.; de ROSSI, W. Ultrashort Laser Pulses Machining, in: I. Peshko (Ed.) Laser Pulses - Theory, Technology, and Applications, pp. 143-174, InTech2012.
22. COURROL, L.C.; SAMAD, R.E.; GOMES, L.; RANIERI, I.M.; BALDOCHI, S.L.; de FREITAS, A.Z. ; VIEIRA, N.D. Color center production by femtosecond pulse laser irradiation in LiF crystals. **Optics Express**, v. 12, 288-293, 2004.

23. SAMAD, R.E.; VIEIRA, N.D. Geometrical method for determining the surface damage threshold for femtosecond laser pulses. **Laser Physics**, v. 16, 336-339, 2006.
24. MACHADO, L.M.; SAMAD, R.E.; de ROSSI W.; VIEIRA Junior, N.D. D-Scan measurement of ablation threshold incubation effects for ultrashort laser pulses. **Optics Express**, v. 20, 4114-4123, 2012.
25. SANTOS, D.; SAMAD, R.E.; TREVIZAN, L.C.; de FREITAS, A.Z.; VIEIRA, N.D.; KRUG, F.J. Evaluation of Femtosecond Laser-Induced Breakdown Spectroscopy for Analysis of Animal Tissues. **Applied Spectroscopy**, v. 62 1137-1143, 2008.
26. MATOS, R.A.d.; CORDEIRO, T.d.S.;SAMAD, R.E.; SICCHIERI, L.B.; VIEIRA Júnior, N.D.; COURROL, L.C. Synthesis of silver nanoparticles using agar–agar water solution and femtosecond pulse laser irradiation, **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 423, 58-62, 2013.
27. MACHADO, L.M.; SAMAD, R.E.; FREITAS, A.Z.; VIEIRA, N.D.; de ROSSI, W. Microchannels Direct Machining using the Femtosecond Smooth Ablation Method. **Physics Procedia**, v. 12, 67-75, 2011.
28. SANTOS, M.O.; PELEGATI, V.B.; CESAR, C.L.; ZORN, T.M.T.; ZECELL, D.M.; SAMAD, R.E.; VIEIRA Junior, N.D. Characterization Of Burned Skin Ablated With Ultrashort Pulses Laser Using Nonlinear Microscopy Technique. **Revista Brasileira de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 13, 150-154, 2011.
29. FUJIMOTO, J. G. in: E. B. Brett and G. J. Tearney (ed), Handbook of Optical Coherence Tomography Optical Coherence Tomography, (Marcel Dekker, New York, 2002), Chap 1.
30. FREITAS, A.Z.; ZECELL, D.M.; MAYER, M.P.A.; RIBEIRO, A.C.; GOMES, A.S.L.; VIEIRA, Jr.,N.D. **Laser Phys.** 6, 896, 2009.
31. FREITAS, A. Z.; MAGRI, M. A. and RAELE, M. P. in: F. J. Duarte (ed), Laser Pulse Phenomena and Applications, (InTech, Rijeka, 2010), Chap 20.
32. HUGHES, M.; SPRING, M. and PODOLEANU, A. "Speckle noise reduction in optical coherence tomography of paint layers". **Applied Optics** 49(1), 99–107, 2010.
33. HOJJATOLESLAMI A. and AVANAKI, M. R. N. "OCT skin image enhancement through attenuation compensation". **Applied Optics** 51(21), 4927–4935, 2012.

34. LEE, J.; KIM, J.; KIM, S.; MIN, D. H. Biosensors based on graphene oxide and its biomedical application. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 105, 275–287, 2016.
35. <https://scifinder-cas.ez67.periodicos.capes.gov.br>, acesso 26/julho 2018 as 18:30.
36. SHEN, L. and He, P. An electrochemical immunosensor based on agarose hydrogel films for rapid determination of ractopamine. *Electrochem. Commun.*, v. 9, 657–662, 2007.
37. “Microusinagem com laser de pulsos ultracurtos aplicada na produção e controle de circuitos optofluídicos”. **Projeto Temático FAPESP** n. 2013/26113/6; coordenador: WAGNER de ROSSI.
38. XU, Z.; WANG, S.; LI, Y.; WANG, M.; SHI, P.; HUANG, X. Covalent Functionalization of graphene oxide with biocompatible poly(ethylene glycol) for delivery of paclitaxel. **ACS Applied Materials e Interfaces**, vol.6, p. 17268-17276, (2014).
39. SAKATA, S. K.; SOUSA, T. S. E. ; SOMESSARI, E. S. R. ; SILVEIRA, C. G. Incorporação de nanopartículas de metais de transição em compostos à base de grafeno para a formação de um nanocompósito em forma de pó. Número do registro: BR1020160164451, Depósito: 15/07/2016
40. YANG, K.; FENG, L.; HONG, H.; CAI, W.; LIU, Z. Preparation and functionalization of graphene nanocomposites for biomedical applications. **Nature Protocols**, vol.8, nº12, p. 2392-2403, 2013.