

UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO
“PROFESSOR JOSÉ DE SOUZA HERDY”

Priscila Laviola Sanches

**Análise da proficiência do modelo de epiderme humana reconstruída
em relação ao potencial de irritação de compostos químicos e
avaliação da toxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio**

Duque de Caxias
2023

Priscila Laviola Sanches

**Análise da proficiência do modelo de epiderme humana reconstruída
em relação ao potencial de irritação de compostos químicos e
avaliação da toxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biomedicina Translacional como parte dos
requisitos parciais para obtenção do grau de doutora
em Biomedicina Translacional.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. José Mauro Granjeiro

Co-orientadora: Dra. Ana Rosa Lopes Pereira Ribeiro

Duque de Caxias

2023

S211a Sanches, Priscila Laviola.

Análise da proficiência do modelo de epiderme humana reconstruída em relação ao potencial de irritação de compostos químicos e avaliação da toxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio / Priscila Laviola Sanches. – Duque de Caxias, Rio de Janeiro. 2023.
138 f. il.

Orientador: José Mauro Granjeiro.

Coorientador: Ana Rosa Lopes Pereira Ribeiro.

Tese (doutorado) – UNIGRANRIO, Escola de Ciência da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional. Rio de Janeiro, 2023.

1. Pele equivalente. 2. Modelo de epiderme humana. 3. Teste de irritação. 4. Nanotecnologia. 5. Nanopartículas. I. Granjeiro, José Mauro. II. Ribeiro, Ana Rosa Lopes Pereira. III. Título. IV. UNIGRANRIO.

CDD: 610

ATA DE DEFESA DE TESE

Às 14 horas, do dia 28 de fevereiro de 2023, o Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, realizou sessão de Defesa da Tese versando sobre o projeto intitulado "Validação do modelo 3D de pele reconstruída e avaliação dos potenciais riscos de cosméticos que utilizam nanopartículas de TiO₂ em suas formulações", de autoria de Priscila Laviola Sanches, aluna do Doutorado Acadêmico, sob orientação do Professor José Mauro Granjeiro e da professora Ana Rosa Lopes Pereira Ribeiro. A sessão foi aberta pelo Prof. Celso Barbosa de Sant'Anna Filho, presidente da Comissão, que nos termos regimentais convocou os demais Membros da Comissão Examinadora: Profa. Sara Gemini Piperni, Profa. Carolina Motter Catarino e Profa. Rosana Bizon Vieira Carias. Em seguida, passou à palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Após a apresentação, a candidata foi arguida pelos examinadores e suas respostas foram consideradas **satisfatórias**.

O presidente declarou a doutoranda Priscila Laviola Sanches **aprovada**, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências Biomédicas, de acordo como o Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional do convênio tripartite entre UNIGRANRIO, INMETRO e UEZO. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão, em que foi lavrada a presente ata, que será assinada pelos Membros da Comissão Examinadora.

Duque de Caxias, 28 de fevereiro de 2023.

Documento assinado digitalmente
 CELSO BARBOSA DE SANT'ANNA FILHO
Data: 14/03/2023 14:16:38-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Celso Barbosa de Sant'Anna Filho
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO
Presidente da Banca



Profª. Drª. Sara Gemini Piperni
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ



Profª. Drª. Carolina Motter Catarino
Fundação Grupo Boticário – BOTICÁRIO

Documento assinado digitalmente
 ROSANA BIZON VIEIRA CARIAS
Data: 17/03/2023 07:43:45-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profª. Drª. Rosana Bizon Vieira Carias
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ



Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo
Coordenador Geral do Programa de
Pós-Graduação em Biomedicina
Translacional – BIOTRANS

Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo
Coordenador do PPG em Biomedicina
Translacional - BIOTRANS


Dedico este trabalho,

A todos que tornaram possível sua realização, em especial aos meus pais, Walmir e Catarina, pelo amor, carinho, dedicação, ensinamento, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida e por me fazer acreditar que tudo é possível, basta perseguir os sonhos. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado dons e tudo mais o suficiente para que eu pudesse chegar até aqui. Sei que “tudo posso naquele que me fortalece”.

Aos meus pais Walmir e Catarina, que com inteligência e sabedoria me ensinaram a viver sempre prezando pela dignidade, respeito e humildade. Eles que com excelência e qualidade constituíram uma incrível família que é pautada pela união. Agradeço imensamente pela criação e educação que me proporcionaram, por nunca medir esforços para que eu pudesse alcançar os meus objetivos, e mais ainda, agradeço pela honra de ter vocês como pais.

Ao meu irmão Gustavo, a quem agradeço pelos constantes momentos em que teve paciência com minhas atitudes, e que inúmeras vezes contribuiu me apoiando e incentivando com os meus projetos e planos.

À meu orientador, Professor José Mauro Granjeiro, por ter aceitado fazer parte deste sonho. Por ser um grande exemplo e inspiração para toda comunidade científica. Pelo exemplo de profissional, pelo compromisso e incentivo. Por estar disponível em todos os momentos que precisei. Pelas inúmeras conversas que contribuíram para o meu crescimento intelectual.

À minha co-orientadora Dra. Ana Ribeiro, que me inspirou pelo seu exemplo de mulher íntegra, cuja moral não poderá jamais ser ocultada. Pelo exemplo de profissional, que cuja qualidade não pode ser mensurada ou avaliada. Pelo compromisso e incentivo. Pela amizade e confiança, na construção desse trabalho. Pelo apoio e disponibilidade constante em todos os momentos. Enfim, serei eternamente grata por tudo.

Aos meus amigos do laboratório e da vida, Luths Geaquinto, Raquel Soares, Raquel Corrêa, Natália Yoshihara, Renata Akemi, Daniella Paiva, Wanderson Souza, Thais Lima, Flávio Augusto, Priscila Grion e Rosana Bizon por toda amizade,

companheirismo, ajuda, conselhos, incentivo ao longo dessa caminhada. e por todos os momentos de descontração.

A todos os amigos e colegas da DIMAV pela amizade e por ter contribuído de alguma forma para execução deste trabalho.

Ao INMETRO, por incentivar o conhecimento e nos permitir crescer na área científica.

Ao Grupo Boticário, pela parceria e confiança.

Aos meus avós José (em memória) e Izaura, pelo incentivo ao longo de todos os desafios para que eu chegasse até aqui. Agradeço imensamente por sempre se orgulharem mim.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Resumo

Modelos de pele equivalente foram desenvolvidos como um método alternativo a utilização de animais e mimetizam as propriedades histológicas, morfológicas, fisiológica e bioquímicas das diferentes camadas da pele humana. Atualmente, alguns modelos foram validados e são comercializados. Alguns grupos de pesquisa brasileiros vêm trabalhando na construção de novos modelos de pele equivalente utilizando células de doadores brasileiros. Porém, para que estes modelos sejam comercializados é essencial sua validação quanto a repetibilidade, reprodutibilidade, sensibilidade, especificidade e precisão. Embora os modelos de pele equivalente tenham sido desenvolvidos para avaliar o potencial de corrosão e irritação da pele de formulações químicas, até o momento não se sabe se esses modelos são apropriados para estudar a toxicidade de formulações contendo nanopartículas, rotineiramente utilizadas em cosméticos. Assim, este trabalho objetiva construir o modelo de epiderme humana reconstruída e avaliar seu desempenho como potencial candidato a modelo *in vitro* para o teste de irritação dérmica, assim como seu potencial para avaliação do perigo de NPs de TiO₂, muito usadas nas formulações de protetor solar. Para a construção das peles, foram utilizadas culturas primárias de queratinócitos humanos mantidas na interface ar-líquido para a formação completa da pele. A TG 439 da OECD foi utilizada como base para a avaliação do potencial de irritação de substâncias químicas e o ensaio de MTT foi utilizado para avaliar a toxicidade das NPs de TiO₂. As análises histológicas permitiram observar todas as camadas da pele, porém, com grande variabilidade na estrutura em função dos lotes de células adquiridos, o que comprometeu a reprodutibilidade do modelo. No entanto, o modelo mostrou ser promissor para estudos *in vitro* de irritação cutânea e confirmou a ausência de toxicidade de NPs de dióxido de titânio, tendo sido consideradas não irritantes e não citotóxicas nas condições experimentais utilizadas.

Abstract

Equivalent skin models were developed as an alternative method to the use of animals and mimic the histological, morphological, physiological and biochemical properties of the different layers of human skin. Currently, some models have been validated and are commercialized. Some Brazilian research groups have been working on the construction of new equivalent skin models using cells from Brazilian donors. However, for these models to be commercialized, their validation regarding repeatability, reproducibility, sensitivity, specificity and precision is essential. Although equivalent skin models have been developed to assess the corrosion and skin irritation potential of chemical formulations, so far it is not known whether these models are appropriate for studying the toxicity of formulations containing nanoparticles, routinely used in cosmetics. Thus, this work aims to build a reconstructed human epidermis model and evaluate its performance as a potential candidate for an in vitro model for the dermal irritation test, as well as its potential for assessing the danger of TiO₂ NPs, which are widely used in sunscreen formulations. For the construction of the skins, primary cultures of human keratinocytes maintained at the air-liquid interface were used for the complete formation of the skin. The OECD TG 439 was used as a basis for assessing the irritation potential of chemicals and the MTT assay was used to assess the toxicity of TiO₂ NPs. Histological analyzes allowed the observation of all layers of the skin, however, with great variability in structure depending on the batches of cells acquired, which compromised the reproducibility of the model. However, the model showed promise for in vitro studies of skin irritation and confirmed the lack of toxicity of titanium dioxide NPs, having been considered non-irritant and non-cytotoxic under the experimental conditions used.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUTURAS CRISTALINAS DO TiO_2 : ANATASE, RUTILO E BRUQUITA.....	20
FIGURA 2. DIFERENTES VIAS DE PENETRAÇÃO DE NPs ATRAVÉS DA PELETRANSPORTE PARACELULAR (ENTRE AS CÉLULAS), TRANSPORTE TRANSCELULAR (POR DENTRO DAS CÉLULAS) E TRANSPORTE ATRAVÉS DOS FOLÍCULOS CAPILARES. IMAGEM ADAPTADA DE: HTTPS://SMART.SERVIER.COM	24
FIGURA 3. CAMADAS DA EPIDERME.	25
FIGURA 4. ESQUEMA DOS PRINCIPAIS MODELOS DE PELE EQUIVALENTE UTILIZADOS.	34
FIGURA 5. FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE SELEÇÃO DE LITERATURA.	56
FIGURA 6. ESQUEMA DE ENSAIOS TOXICOLÓGICOS. A) CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS NPs DE TiO_2 QUE POSSIVELMENTE INTERFEREM NOS ENSAIOS BIOLÓGICOS; QUE INCLUEM B) CAPACIDADES ÓPTICAS DAS NPs DE TiO_2 , COMO ABSORBÂNCIA INTRÍNSECA E/OU FLUORESCÊNCIA (B1); ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS, SAIS E CORANTES NAS NPs (B2); E DISSOLUÇÃO DE NPs COM A CONSEQUENTE LIBERAÇÃO DE ÍONS METÁLICOS NO SOBRENADANTE (B3). C) TESTE CONVENCIONAL DE MTT ANALISANDO NPs DE TiO_2 , DEMONSTRANDO QUE AS NPs PODEM ADSORVER NO CORANTE MTT, EVITANDO A METABOLIZAÇÃO DOS REAGENTES.	66
FIGURA 7. ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DO MODELO DE PELE EQUIVALENTE	73
FIGURA 8. MODELO DE PELE DE ESPESSURA TOTAL (EPIDERME E DERME) DESENVOLVIDA NOS LABORATÓRIOS DO GRUPO BOTICÁRIO(A) IMAGEM FOTOGRÁFICA DOS MODELOS DE PELE DE ESPESSURA TOTAL APÓS O TESTE DE IRRITAÇÃO UTILIZANDO O INDICADOR MTT. (B) PORCENTAGEM DA VIABILIDADE CELULAR APÓS O TRATAMENTO COM OS CONTROLES (NEGATIVO E POSITIVO), NORMALIZADOS EM RELAÇÃO AO CONTROLE SEM TRATAMENTO. A LINHA EM VERMELHO INDICA O LIMAR ENTRE AS SUBSTÂNCIAS QUE SÃO CONSIDERADAS NÃO IRRITANTES (MAIOR QUE 50%) OU IRRITANTES (MENOR QUE 50%). (C) IMAGENS DE HISTOLOGIA.	78
FIGURA 9. IMAGENS DAS CULTURAS DE CÉLULAS EM MONOCAMADA, OBTIDAS POR MICROSCOPIA ÓPTICA. (A) FIBROBLASTOS E (B) QUERATINÓCITOS.....	79
FIGURA 10. IMAGEM DE HISTOLOGIA DOS MODELOS DE PELE DE ESPESSURA TOTAL DESENVOLVIDA NOS LABORATÓRIOS DO INMETRO (A) FIXADO POR PARAFINA E POR (B) CRIOPRESERVAÇÃO.....	80
FIGURA 11. PRIMEIRO MODELO DE EPIDERME HUMANA RECONSTRUÍDA (RHE) DESENVOLVIDA NOS LABORATÓRIOS DO INMETRO. (A) IMAGEM DAS PELES SEM OS INSERTOS. (B) IMAGEM DOS MODELOS DE RHE APÓS O TESTE DE IRRITAÇÃO UTILIZANDO O INDICADOR MTT. (C) VIABILIDADE CELULAR DOS MODELOS DE PELE EQUIVALENTE APÓS O TRATAMENTO COM OS CONTROLES (NEGATIVO E POSITIVO), NORMALIZADOS EM RELAÇÃO AO CONTROLE SEM TRATAMENTO. A LINHA EM VERMELHO INDICA O LIMAR ENTRE AS SUBSTÂNCIAS QUE SÃO CONSIDERADAS NÃO IRRITANTES (MAIOR QUE 50%) OU IRRITANTES (MENOR QUE 50%). (D) IMAGEM DE HISTOLOGIA DA RHE.	82
FIGURA 12. TESTE DE IRRITAÇÃO 1. (A) VIABILIDADE CELULAR DOS MODELOS DE RHE APÓS O TRATAMENTO COM AS SUBSTÂNCIAS, POR 42 MINUTOS. A LINHA EM VERMELHO INDICA O LIMAR ENTRE AS SUBSTÂNCIAS QUE SÃO CONSIDERADAS NÃO IRRITANTES (MAIOR QUE 50%) OU IRRITANTES (MENOR QUE 50%). (B) IMAGEM DE HISTOLOGIA DA RHE.	84
FIGURA 13. TESTE DE IRRITAÇÃO 2 (A) VIABILIDADE CELULAR DOS MODELOS DE RHE APÓS O TRATAMENTO COM AS SUBSTÂNCIAS, POR 42 MINUTOS. A LINHA EM VERMELHO INDICA O LIMAR ENTRE AS SUBSTÂNCIAS QUE SÃO CONSIDERADAS NÃO IRRITANTES (MAIOR QUE 50%) OU IRRITANTES (MENOR QUE 50%). (B) IMAGEM DE HISTOLOGIA DA RHE.	86
FIGURA 14. TESTE DE IRRITAÇÃO 3 E 4.. (A) VIABILIDADE CELULAR DOS MODELOS DE RHE, DO TESTE DE IRRITAÇÃO 3 E (B) IMAGEM HISTOLOGIA DO CONTROLE DESSE TESTE. (C) VIABILIDADE CELULAR DOS MODELOS DE RHE, DO TESTE DE IRRITAÇÃO 4 E (B) IMAGEM HISTOLOGIA DO CONTROLE DESSE TESTE. A LINHA EM VERMELHO INDICA O LIMAR ENTRE AS SUBSTÂNCIAS QUE SÃO CONSIDERADAS NÃO IRRITANTES (MAIOR QUE 50%) OU IRRITANTES (MENOR QUE 50%).	87
FIGURA 15. IMAGENS DE MICROSCOPIA ÓPTICA: HISTOQUÍMICA COM MARCAÇÃO DE CÉLULAS SENESCENTES.	88
FIGURA 16. IMAGENS DE HISTOLOGIA DO MODELO DE RHE EM DIFERENTES TEMPOS DE DIFERENCIAÇÃO.	89
FIGURA 17. TESTE DE IRRITAÇÃO 5. (A) VIABILIDADE CELULAR DOS MODELOS DE RHE APÓS O TRATAMENTO COM AS SUBSTÂNCIAS, POR 42 MINUTOS. A LINHA EM VERMELHO INDICA O LIMAR ENTRE AS SUBSTÂNCIAS QUE SÃO CONSIDERADAS NÃO IRRITANTES (MAIOR QUE 50%) OU IRRITANTES (MENOR QUE 50%). (B) IMAGEM DE HISTOLOGIA DA RHE.	91

FIGURA 18. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE NPS DE TiO ₂ . (A) VIABILIDADE CELULAR DOS MODELOS DE RHE APÓS EXPOSIÇÃO DE 10 µG/ML E 100 µG/ML DE NPS DE TiO ₂ , POR 42 MINUTOS E 48 HORAS. A LINHA EM VERMELHO INDICA O LIMIAR ENTRE AS SUBSTÂNCIAS QUE SÃO CONSIDERADAS NÃO IRRITANTES (MAIOR QUE 50%) OU IRRITANTES (MENOR QUE 50%). (B) IMAGENS DE HISTOLOGIA DOS MODELOS DE RHE DO CONTROLE E APÓS EXPOSIÇÃO DE 10 µG/ML E 100 µG/ML DE NPS DE TiO ₂ , POR 48 HORAS.	93
FIGURA 19. IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA ACOPLADOS A EDS DOS MODELOS DE RHE EXPOSTAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NPS DE TiO ₂ . (A) CONTROLE, (B) 10 µG/ML E (C) 100 µG/ML.	94
FIGURA 20. IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA ACOPLADOS A EDS DA SUPERFÍCIE DO MODELO DE RHE EXPOSTAS 100 µG/ML DE NPS DE TiO ₂	95

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. ESTRATÉGIA DE BUSCA.....	51
TABELA 2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	52
TABELA 3. PONTUAÇÃO GERAL E CATEGORIAS DOS ARTIGOS SELECIONADOS.....	57
TABELA 4. EXTRAÇÃO DE DADOS DOS ARTIGOS SELECIONADOS	64
TABELA 5. SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS UTILIZADOS PARA PROFICIÊNCIA DO MODELO.	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM (Microscopia de Força Atômica)

BCRJ (Banco de Células do Rio de Janeiro)

BraCVAM (Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos)

CFDA-AM (5-Carboxifluoresceína Diacetateacetoximetil Éster)

DCF (2',7'diclorofluoresceína)

DMEM (Meio Eagle modificado por Dulbecco)

DPBS (Solução Salina Tamponada com Fosfato de Dulbecco)

EDS (Energia Dispersiva de Raios X)

EELS (Espectroscopia por Perda de Energia de Elétrons)

EURL ECVAM (Laboratório de Referência da União Europeia para alternativas à experimentação animal)

EROs (Espécies Reativas de Oxigênio)

DLS (Espalhamento de Luz Dinâmico)

FT (Modelo de espessura total da pele)

GIVIMP (Documento de Orientação sobre Boas Práticas do Método *In Vitro*)

IARC (Agência Internacional de Pesquisa do Câncer)

ICP-MS (Espectrometria de Massa Com Fonte de Plasma Indutivamente Acoplado)

ISO (Organização Internacional de Normalização)

KGM (Meio de crescimento para queratinócito)

LDH (Lactato Desidrogenase)

MET (Microscopia Eletrônica de Transmissão)

MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura)

MCTI (Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação)

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil brometo de tetrazolina)

NP (Nanopartícula)

NR (Vermelho neutro)

OECD (*Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico*)

PBS (Solução Salina Tamponada Com Fosfato)

RHE (Epiderme Humana Reconstruída)

SDS (Dodecil sulfato de sódio)

SFB (Soro Fetal Bovino)

TEER (Resistência Elétrica Transepitelial)

TiO₂ (Dióxido de Titânio)

ToxRTool (Ferramenta de Avaliação de Confiabilidade de Dados Toxicológicos)

UV-Vis (Espectrofotometria na Região do Ultravioleta-Visível)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 NANOMATERIAIS	17
1.2 NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO E SUAS APLICAÇÕES EM PROTETORES SOLARES E EFEITOS BIOLÓGICOS	19
1.3 FISILOGIA DA PELE E INTERAÇÃO COM NANOPARTÍCULAS	23
1.4 MÉTODOS ALTERNATIVOS DE PELE	29
1.5 MODELOS TRIDIMENSIONAIS DE PELE RECONSTRUÍDA	31
1.6 DESAFIOS NA AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS	38
2. OBJETIVOS	40
2.1 OBJETIVO GERAL	40
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
3. CAPÍTULO I: ARTIGO DE REVISÃO SISTEMÁTICA	43
3.1 INTRODUÇÃO	43
3.2 METODOLOGIA	49
3.2.1 Foco da pergunta (baseada na estratégia PICO)	50
3.2.2 Procura da estratégia	50
3.2.3 Critérios de elegibilidade (OHAT)	52
3.2.4 Seleção de estudos, processo de triagem e extração de dados	53
3.2.5 Avaliação da confiabilidade	54
3.3. RESULTADOS	55
3.3.1 Pesquisa dos artigos nas bases de busca	55
3.3.2 Avaliação da Confiabilidade	56
3.3.3 Características do Estudo	58
3.3.4 Resultados de toxicidade	59
3.4 DISCUSSÃO	61
3.5 CONCLUSÃO	68
4. CAPÍTULO II: DESENVOLVIMENTO DA EPIDERME RECONSTRUÍDA	70
4.1 INTRODUÇÃO	70
4.2 METODOLOGIA	72
4.2.1 Construção dos modelos de pele de espessura total e RHE	72
4.2.1.1 Construção do modelo de pele de espessura total (derme e epiderme)	72
4.2.1.2 Construção do modelo de epiderme humana reconstruída (RHE)	73
4.2.3 Avaliação da toxicidade de NPs de TiO ₂	75
4.2.3.1 Análise do potencial de irritação e citotoxicidade de NPs de TiO ₂	75
4.2.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura	76
4.3 RESULTADOS	76
4.3.1 Treinamento para a construção do modelo de espessura total, com epiderme e derme (desenvolvida nos laboratórios do Grupo Boticário)	76
4.3.1.1 Avaliação da irritação cutânea in vitro	76
4.3.2 Construção do modelo de pele de espessura total nos laboratórios do INMETRO	79
4.3.3 Construção do modelo de epiderme humana reconstruída (RHE) nos laboratórios do INMETRO e avaliação da proficiência em relação ao potencial de irritação	81
4.4 DISCUSSÃO	96
4.4.1 Construção e implementação do modelo de pele de espessura total	96
4.4.2 Implementação do modelo de epiderme reconstruída (RHE)	98
4.4.3 Avaliação da toxicidade de NPs de TiO ₂	101

4.5 CONCLUSÃO	103
5. TRABALHOS FUTUROS	104
6. DIFICULDADES ENCONTRADAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DESTA PROJETO	104
7. REFERÊNCIAS	106
8. ANEXO 1: ARTIGO DE REVISÃO SISTEMÁTICA	123

1. Introdução

1.1 Nanomateriais

Atualmente, um dos ramos da ciência que mais vem se desenvolvendo e crescendo de forma exponencial é a nanotecnologia. Pesquisas nesse ramo tem gerado elevados investimentos de modo a impulsionar o mercado mundial e potencializar o consumo de produtos contendo nanomateriais. Desta forma, diversas áreas da indústria de engenharia, médica entre outras, vêm se beneficiando dos avanços da nanotecnologia e utilizam componentes nanométricos, também conhecido como nanopartículas (NPs) em seus produtos (Bayda, *et al.*, 2019; Lisa, *et al.*, 2021)

De acordo com a Organização Internacional de Normalização (ISO), um nanomaterial é definido como um material natural, incidental ou sintetizado, contendo partículas em um estado desagregado, agregado ou aglomerado, onde 50% ou mais da população apresentem uma ou mais dimensões externas, numa faixa de tamanho entre 1 a 100 nm (International Organization for Standardization, 2017).

Na literatura encontra-se relatos de que a primeira aplicação conhecida da nanotecnologia foi em vitrais usados nas igrejas na Europa medieval (Edwards & Thomas, 2007). Os artesãos de vidro reduziam inconscientemente os complexos de ouro para formar pequenas nanopartículas de ouro após misturar cloreto de ouro com o vidro derretido para deixar o vidro com a cor de vermelho rubi (Dowling, *et al.*, 2004; Okamoto & Yamaguchi, 2003; Wilson, *et al.*, 2008)

Em 1857, foi relatado pela primeira vez por Michael Faraday que o ouro coloidal exibia propriedades significativamente diferentes do ouro a granel (Faraday, 1857; Amina, *et al.*, 2020). Embora não tenha sido elucidado o mecanismo, ele demonstrou as diferenças no tamanho das partículas, sendo essa observação o primeiro passo para compreender as diferenças no comportamento da matéria em nanoescala. No entanto, o termo “nanotecnologia” foi criado só em 1974, sendo um campo que se desenvolveu rapidamente com a invenção de vários instrumentos, entre eles o microscópio eletrônico de transmissão, microscópio de varredura por tunelamento e o microscópio de força

atômica, todos capazes de investigar e manipular nanoestruturas (Bayda, *et al.*, 2019; Lisa, *et al.*, 2021).

Desde então, esse ramo vem ganhando muitos investimentos e vem crescendo a cada dia mais. Na medicina por exemplo, nanopartículas de ouro, prata e outros metais são utilizadas em terapias fotodinâmicas para aplicações como o câncer (Yaqoob, *et al.*, 2020; Liang, *et al.*, 2021). A terapia fotodinâmica tem sido muito investigada nos últimos anos como um tratamento “não convencional” para o câncer. Essa aplicação permite muitas das vezes que os médicos atinjam seletivamente os tumores e evitam o uso da quimioterapia e radioterapia tradicionais, reduzindo drasticamente seus efeitos colaterais geralmente citotóxicos aos tecidos normais (Yaqoob, *et al.*, 2020; Liang, *et al.*, 2021)). Em relação ao tratamento para o câncer de pele, especialmente o melanoma, muitas nanopartículas foram estudadas incluindo nanopartículas inorgânicas, nanopartículas a base de carbono, nanopartículas proteicas, dendrímeros e lipossomos (Dianzani *et al.*, 2014; Leli., 2023). Foi demonstrado que a adsorção de ligante e/ou polímeros a superfície dos lipossomos aumenta significativamente a especificidade da administração do medicamento (Torchilin, *et al.*, 2005; Yifeng, *et al.*, 2022).

Devido as suas nano dimensões, as NPs vem sendo aplicadas em diversas áreas por apresentarem características elétricas, mecânicas e térmicas. Consequentemente, a exposição humana a NP aumentou como resultado de seu uso em indústrias como: alimentos, farmacêutica, cosmética, biomédica (dispositivos médicos: implantes, próteses, sistemas de administração controlada de medicamentos), aeronáutica, têxtil e também como engenharia Ambiental (Hanawa, *et al.*, 2019; Kongsong *et al.*, 2014; Miyani & Hughes, 2017; Semenzin *et al.*, 2015; Sethi *et al.*, 2014; Shetti *et al.*, 2019). Levando-se em consideração a elevada exposição humana aos diferentes tipos de NPs e tendo em vista seus diversos benefícios, entre eles, pode-se citar o grande potencial para melhorar a qualidade de vida e contribuir para a competitividade industrial, o desenvolvimento de pesquisas para avaliar a segurança dessas substâncias, caso a caso, são de extrema importância. Na literatura, foi relatado que as propriedades físico-químicas dos nanomateriais (escala manométrica) são totalmente diferentes quando comparadas com a escala micrométrica e macrométrica. O contato das NPs com o corpo

humano pode acontecer por diferentes vias, entre elas pode-se destacar os tratos respiratório, gastrointestinal e pele (Hong *et al.*, 2017; Zannatul e Abderrahim, 2020). Portanto, esclarecer o impacto da exposição a esses nanomateriais na saúde humana, a longo prazo é essencial.

1.2 Nanopartículas de dióxido de titânio e suas aplicações em protetores solares e efeitos biológicos

Nanopartículas de dióxido de titânio (NPs de TiO_2) estão sendo utilizadas em várias aplicações, como: cosméticos, suplementos nutricionais, corantes alimentares, nanomedicina, entre outros. Devido as suas diversas aplicações e as suas propriedades físico-químicas, a produção de NPs de TiO_2 tem aumentado continuamente, e tem sido um dos nanomateriais mais fabricados no mundo (Suresh, *et al.*, 2022). As principais rotas de exposição das NPs de TiO_2 com relevância toxicológica são exposição oral, exposição dérmica, inalação, e através de dispositivos médicos (Zannatul e Abderrahim, 2020; Wu e Ren 2020).

A diminuição do tamanho de uma partícula para a escala nanométrica, leva consequentemente ao aumento da área de superfície de contato, e devido a isso, suas propriedades são diferentes de quando as partículas estão em micro e/ou macroescala. Dentre as propriedades que são alteradas pode-se incluir, alterações na solubilidade, condutividade, comportamento térmico, resistência do material, atividade catalítica e propriedades ópticas (Ziental *et al.*, 2020; Asha, *et al.*, 2020).

Devido à sua capacidade fotoprotetora, NPs de TiO_2 são regularmente utilizadas em bloqueadores solares inorgânicos físicos (Sharma *et al.*, 2019). A vantagem de usar TiO_2 na escala nanométrica é devido a sua transparência para a luz visível e uma melhor eficiência do bloqueio de UV quando se compara com componentes de protetor solar de tamanho micrométricos que são conhecidos como opacos. As NPs de TiO_2 refletem e espalham UVB (290-320 nm) e UVA (320-400 nm) dando uma proteção de radiação solar

adequada, evitando queimaduras solares e fotoenvelhecimento (Yoo, *et al.*, 2020; Vertuani, *et. al.*, 2022).

O TiO_2 pode ser encontrado em três diferentes estruturas cristalinas, a anatase, o rutilo e a bruquita, como mostra a figura 1. Entretanto, a estrutura cristalina rutilo é conhecida por ter um alto índice de refração em comparação com a anatase, e por isso é a mais utilizada em cosméticos. De acordo com a legislação europeia, o TiO_2 é um filtro UV inorgânico que pode ser utilizado em produtos protetores solares, onde o teor máximo é regulado pela legislação (concentração admissível de 25% (p/p)) (Taurozzi *et al.*, 2013). Como mencionado, devido à maior relação da área de superfície/volume, NPs tornam-se mais bioreativas em comparação com os materiais a granel normais (partículas em microescala), dando origem a preocupações sobre a sua potencial toxicidade para os seres humanos, uma vez que essa redução no tamanho das NPs aumenta suas chances de internalização nas células da pele, com possíveis consequências biológicas para os consumidores (Panzarini, *et al.*, 2018).

Em uma pesquisa realizada em Madison, Wisconsin, nos Estados Unidos para estimar a exposição da população ao TiO_2 , através do uso diário de produtos de cuidados pessoais demonstrou-se que os filtros solares e o creme dental são os principais produtos que contêm TiO_2 . Este trabalho concluiu que a exposição diária de TiO_2 pela via dérmica variou de 2,8 a 14 mg por pessoa por dia (F. Wu & Hicks, 2020).

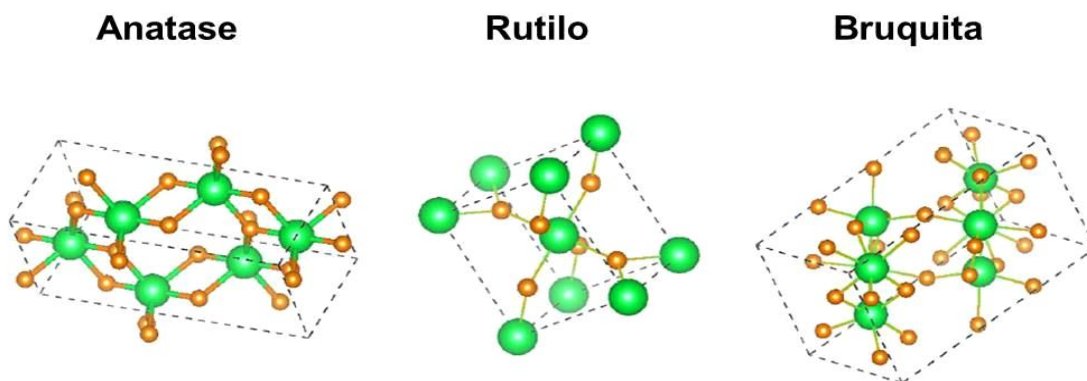


Figura 1. Estruturas cristalinas do TiO_2 : Anatase, rutilo e bruquita.

Imagem adaptada de Vitoreti *et al.*, 2017

Sabe-se que a resposta dos sistemas biológicos às NPs depende de suas características físico-químicas no ambiente biológico. Na literatura, foi demonstrado que após a exposição das NPs aos meios biológicos, uma grande quantidade e variedade de proteínas são absorvidas na superfície das NPs, fenômeno esse, conhecido como proteína corona (Ehrenberg *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2012, Sanches *et al.*, 2019). Sabe-se que a proteína corona medeia respostas celulares, como captação celular, acúmulo, localização intracelular e biodistribuição (Foroozandeh & Aziz, 2015; Ribeiro *et al.*, 2017; Sanches *et al.*, 2019). Levando-se em consideração os níveis de interação das proteínas com as superfícies das NPs, as proteínas coronas podem ser categorizadas de duas formas: “Soft corona” ou “Hard corona”. O termo “Soft corona” é utilizado quando exista uma fraca interação das proteínas com a superfície das NPs, e as mesmas permanecem adsorvidas por um pequeno intervalo de tempo, segundos a minutos, em contrapartida, o termo “Hard corona” é utilizado quando existe uma forte interação e alta afinidade das proteínas com a superfície das NPs, permanecendo adsorvidas por longos períodos (horas) (Rafaela e María, 2021; Didar, *et al.*, 2022).

Na literatura, foi demonstrado que as proteínas não eram as únicas a se adsorverem na superfície das NPs. Foi demonstrado que após a exposição das NPs aos meios biológicos além das proteínas, os íons também se adsorviam a superfície das NPs de TiO₂ (anatase) e formavam um bio-complexo, que desempenham um importante papel no destino das NPs. Neste estudo, também foi demonstrado que esses bio-complexos funcionam como um cavalo de tróia, escondendo as NPs (biocamuflagem), facilitando desta forma, a internalização das NPs nas células (Ribeiro *et al.*, 2016). Nosso grupo também demonstrou que a interação de NPs de TiO₂ com meios biológicos, DMEM High e KGM, utilizados para cultivar fibroblastos e queratinócitos dérmicos, respectivamente, gerou a formação de um bio-complexo (proteínas e íons). A formação desse bio-complexo foi aparentemente relevante para a internalização das NPs, assim como influenciou no endereçamento celular (Sanches *et al.*, 2019).

Essa biocamuflagem é considerada a identidade biológica das NPs e é o que as células percebem e com o que as células interagem. Outro fato que deve ser levado em consideração é que as superfícies das NPs podem acabar induzindo alterações conformacionais nas proteínas adsorvidas, o que pode afetar diretamente a bioreatividade geral dos NPs (Monopoli *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2016; Mahmoudi, *et al.*, 2018). Jayaram *et al.* demonstraram pela primeira vez que após a formação da proteína corona na superfície das NPs de TiO₂, essas proteínas oxidaram, e essa oxidação gerou um estresse oxidativo nas células (Jayaram *et al.*, 2017). Na literatura, sabe-se que a incubação de NPs de TiO₂ em ambiente biológico demonstra diferenças quantitativas significativas na formação de corona que podem se correlacionar com diferentes interações com os receptores da superfície celular e consequente internalização e tráfego intracelular (Monopoli *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2016; Mahmoudi, *et al.*, 2018).

Após a penetração na pele, as NPs podem seguir diferentes vias, incluindo os transportes transcelular e paracelular, bem como o transporte pelos folículos capilares, como mostra a Figura 2. O fato de que após a penetração na pele as NPs possam alcançar a corrente sanguínea e depois ser transferidos para vários tecidos e órgãos, sugere que a exposição prolongada de NPs possa representar um risco à saúde dos consumidores (Saquib *et al.*, 2012; Shakeel *et al.*, 2016; Karimi, *et al.*, 2018).

Foi descrito que após a internalização de NPs de TiO₂, as mesmas induzem a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs), levando à perda de funções celulares vitais e possivelmente levando à morte celular (Shi *et al.*, 2013; Tucci *et al.*, 2013; Yurong Wang *et al.*, 2015). Alguns resultados sugerem toxicidade dérmica associada à geração de EROs, estresse oxidativo e depleção de colágeno que podem induzir o envelhecimento da pele (Wu, *et al.* 2017). O envolvimento de EROs no dano oxidativo do DNA na epiderme humana, nas células HaCaT (Shukla *et al.*, 2014) e nos fibroblastos dérmicos humanos (Saquib *et al.*, 2012), foi relatado. Shukla *et al.* confirmaram o envolvimento de EROs em dano oxidativo do DNA em células epidérmicas humanas e HaCaT (Shukla *et al.*, 2014). Na literatura foi descrito que as NPs de TiO₂ induzem toxicidade, estresse, inflamação e modificações genéticas (Shi *et al.*, 2013; Yurong Wang

et al., 2015; Zhao, *et al.*, 2013; Abbasi-Oshaghi, *et al.*, 2019), que são intensificadas com a exposição a UVA e UVB. A relação entre NPs de TiO₂ e o dano do DNA em fibroblastos dérmicos humanos também foi demonstrado. Resultados preliminares com células primárias da pele humana (fibroblastos e queratinócitos) expostas a NPs de rutilo mostram que a viabilidade das células foi alterada, e, para a maior concentração de NPs estudada (100µg/mL), a análise do ciclo celular demonstrou mudanças na fase G2, sendo essa a fase que está relacionada com a proliferação celular. Além disso, as NPs, em todas as concentrações estudadas, foram internalizadas por ambas as células da pele e foram acumuladas preferencialmente nas vesículas com membrana (Sanches, *et al.*, 2019)

Nos últimos anos, foram feitos esforços no campo de cosméticos para revestir as NPs de TiO₂, a fim de diminuir a produção de EROs (Dréno, *et al.*, 2019). Um grande exemplo desse esforço foi demonstrado por Mano *et al.* Eles demonstraram que após o revestimento da superfície das NPs de TiO₂ por polietilenoglicol, houve uma redução significativa da citotoxicidade, assim como alterações na expressão gênica nas células epiteliais de pulmão humano (NCI-H292) e nas células de leucemia humana (THP-1) (Uboldi, *et al.*, 2016).

1.3 Fisiologia da Pele e interação com nanopartículas

A pele é o maior órgão do corpo humano e possui uma estrutura própria e com uma composição complexa, sendo caracterizada por diferentes tecidos e tipos de células, que são distribuídas por diferentes camadas interdependentes. Estas camadas da pele são divididas por epiderme, derme e hipoderme (ou tecido subcutâneo) como foi possível observar na figura 2. Além disso, possui aspecto, estrutura e funções variáveis nas diferentes regiões do corpo. Um indivíduo adulto pode ter a área total da pele variando entre 1,5 a 2m², representando aproximadamente 15% do peso corporal.

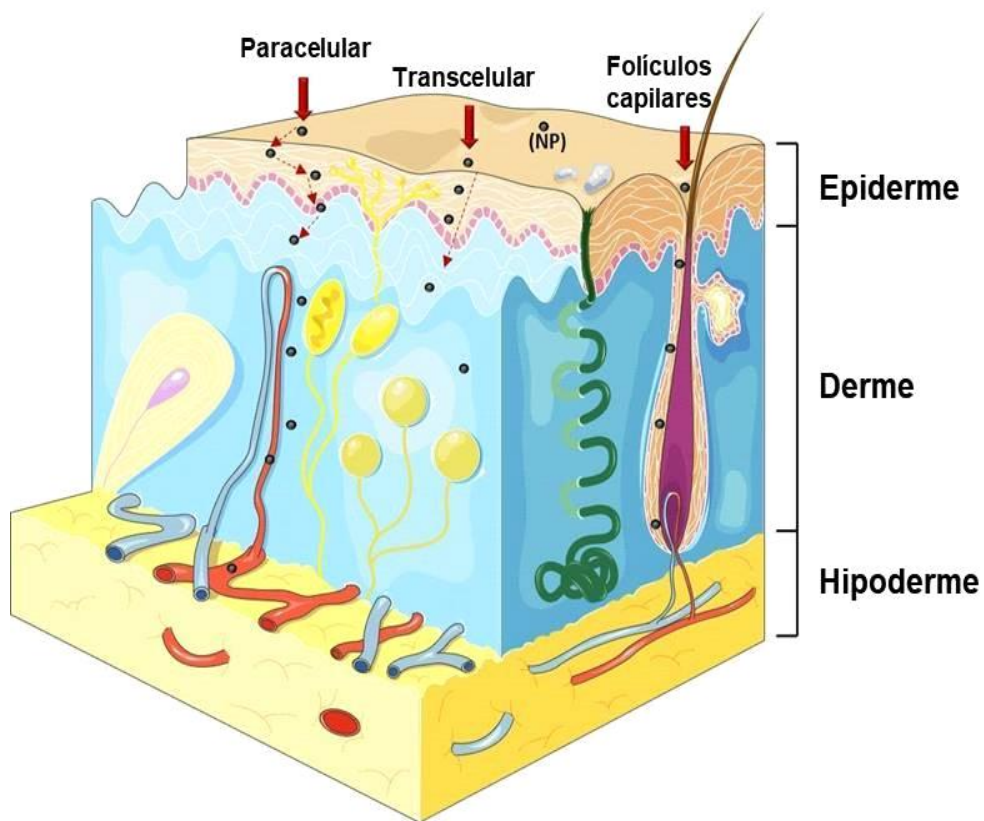


Figura 2. Diferentes vias de penetração de NPs através da pele: Transporte paracelular (entre as células), transporte transcelular (por dentro das células) e transporte através dos folículos capilares. Imagem adaptada de: <https://smart.servier.com>

A epiderme é a camada mais superficial da pele e é considerada a mais importante. Ela é constituída por um epitélio pavimentoso estratificado e queratinizado, e sua espessura pode variar de acordo com a região do corpo. Foi descrito que o sexo masculino possui a epiderme mais espessa do que o feminino e em indivíduos do mesmo sexo essa diferença é menor (Tiwari, *et al.*, 2021).

A epiderme é caracterizada por cinco estratos, o estrato germinativo também conhecido como camada basal, estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido e o estrato córneo, como é possível observar na figura 3, e são os queratinócitos as principais células que constituem essa camada, correspondendo a 80% das células epiteliais. Os queratinócitos são derivados da camada basal e se multiplicam de maneira

contínua, e vão se diferenciando e ficando achatadas à medida que se aproximam da superfície, assim como passam a secretar e a acumular quantidades crescentes de queratina, que é uma proteína fibrosa protegendo a epiderme. Os outros 20% das células que constituem a epiderme estão divididos entre melanócitos, que são as células responsáveis por produzir a melanina, promovendo a cor da pele e as células de Langerhans, que fazem parte do sistema imunológico (Nohynek *et al.*, 2008, Tiwari, *et al.*, 2021).

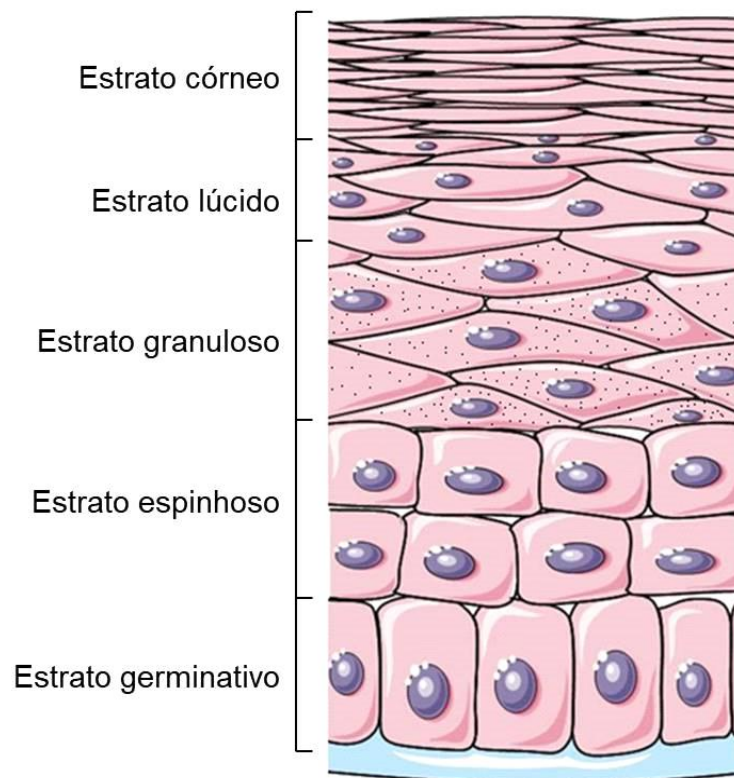


Figura 3. Camadas da epiderme.

Imagem adaptada de: <https://smart.servier.com>

Devido à polimerização macromolecular de proteínas derivadas dos queratinócitos, o estrato córneo, a camada mais superficial da pele, é altamente insolúvel, sendo a involucrina e a loricrina as proteínas mais abundantes, uma vez que facilitam a diferenciação terminal da epiderme e, portanto, a formação da barreira cutânea (Costa *et al.*, 2015; Chermnykh, *et al.*, 2020; Justine e Simon, 2022).

O estrato córneo possui uma estrutura lamelar que é resultante de uma reorganização e de acúmulo de organelas que são ricas em lipídeos e corpos lamelares que são excretados para os espaços intercelulares na interface entre o estrato córneo e o granuloso. Foi demonstrado que essa organização lipídica é responsável pela função de barreira e que a perda dessa estrutura laminar, seja pela aplicação de algum tipo de solvente ou até mesmo devido algumas doenças, está associada à quebra das propriedades de barreira (Chermnykh, *et al.*, 2020). Existem algumas formulações cosméticas que fornecem moléculas de água e lipídeos com a finalidade de melhorar a função de barreira do estrato córneo (Valdman-Grinshpoun *et al.*, 2012). A espessura desse estrato depende principalmente da localização do corpo, as palmas das mãos e dos pés, por exemplo, são as camadas mais espessas. Também foi relatado que a exposição ao sol pode gerar um estrato córneo mais espesso devido à exposição à radiação UV, assim como a irritação mecânica, pois geram uma hiperproliferação de queratinócitos e o aumento da função de barreira (Salmiah, *et al.*, 2020).

A derme é a segunda camada da pele e, portanto, está localizada sob a epiderme. Esta camada também possui uma espessura variável dependendo da região do corpo, podendo variar entre 0,3 e 3 milímetros. Essa camada é constituída por um tecido conjuntivo, ou seja, é um tecido de sustentação da epiderme (Yuzhen Wang, *et al.*, 2015). Os fibroblastos são as principais células que constituem a derme e, são os responsáveis pela produção e modulação da matriz extracelular, no entanto, a derme possui outros tipos de celulares, entre elas, encontram-se os macrófagos, mastócitos, leucócitos, melanóforos, linfócito T e células dendríticas (Téllez-Soto, *et al.*, 2021). A integridade estrutural e a função da derme são dependentes da sua matriz extracelular, principalmente da organização e estrutura das fibras de colágeno. O colágeno é o principal componente da derme, variando de 70 a 80%, e, portanto, é o responsável por conferir resistência. Entre os outros componentes da matriz extracelular destaca-se as fibras elásticas que são compostas por elastina e proteínas microfibrilares (representam cerca de 5% da derme), responsável pela elasticidade da derme e os proteoglicanos, que representa a substância amorfa em torno das fibras de colágenas e elásticas, assim como, também são constituídas de fibras proteicas, vasos sanguíneos e linfáticos,

órgãos sensoriais, terminações nervosas, glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas e folículos pilosos (Bondioli, *et al.*, 2014; Téllez-Soto, *et al.*, 2021). Alterações no microambiente da matriz extracelular dérmica, como por exemplo, a diminuição da quantidade de colágeno tipo I, ocasiona a perda da firmeza e elasticidade da pele e consequentemente, o aparecimento de rugas. Sabe-se que à medida que um indivíduo vai envelhecendo, a pele apresenta um declínio na produção de colágeno (Bondioli, *et al.*, 2014; Yuzhen Wang, *et al.*, 2015).

A hipoderme ou tecido subcutâneo é a camada mais profunda da pele e, portanto, fica localizada abaixo da derme. Este tecido é bastante complexo e é constituído pelos adipócitos, que são as células responsáveis pelo armazenamento de gordura. A hipoderme apresenta diversas funções, atuando como reserva energética, isolante térmico, proteção contra choques mecânicos, modeladora da superfície corporal e fixadora dos órgãos (Shima e Agnes 2021; Justine e Simon 2022).

A pele é um órgão muito mais complexo do que aparenta ser, e tem como principal função a proteção do organismo contra ameaças externas físicas, impedindo a entrada de patógenos infecciosos, injúria mecânica e o atrito. Entretanto, ela também apresenta muitas outras funções, como na regulação do calor através das glândulas sudoríparas, fornecendo uma termorregulação do organismo, na prevenção de perda de água, também fornece defesas imunológicas, e uma extensa rede de nervos que tem função na percepção do frio, calor, dor, toque e pressão (Tiwari, *et al.*, 2021; Justine e Simon 2022).

Como mencionado, a pele é o maior órgão do corpo humano, e, portanto, ela também é a maior superfície de contato que temos entre o ambiente interno e externo, e por este motivo ela exerce um importante papel na entrada de diferentes NPs (Justine e Simon 2022).

Em relação aos cosméticos, se sabe que muitos produtos contêm vários tipos de materiais nanométricos, como: ouro, óxido de zinco, dióxido de titânio, nanotubos, fulerenos, entre outros (Awais, *et al.*, 2019; Kannadhasan, *et al.* 2023). Algumas das nanoestruturas referidas foram introduzidas em filtros solares, com o objetivo final de

proteger a pele da radiação solar, reduzindo as chances de melanoma e também do envelhecimento precoce da pele (Liang, *et al.*, 2021; Leli, *et al.*, 2023). As NPs estão entre os melhores agentes fotoprotetores, pois são capazes de bloquear a incidência de radiação ultravioleta (Leli, *et al.*, 2023).

Muitos estudos *in vivo* e *in vitro* investigam a penetração de NPs de TiO₂ na pele, no entanto, seus resultados são muito contraditórios. Muitos pesquisadores defendem a teoria de que NPs de TiO₂ presentes nas formulações de filtros solares não são capazes de penetrar no estrato córneo. Entretanto, resultados opostos demonstraram a penetração de NPs de TiO₂ tanto na pele intacta quanto em pele lesionada, como em casos de cicatrizes, queimaduras solares e pele depilada. Eles também destacaram que quando a pele está lesionada, é mais suscetível a penetração de NPs de TiO₂ (Lin, *et al.*, 2011; Monteiro-Riviere, *et al.*, 2011; Naess, *et al.*, 2016). De fato, Monteiro-Riviere *et al.* demonstrou o aumento da penetração de NPs de TiO₂ em porcos com pele danificada (Monteiro-Riviere, *et al.*, 2011; Farjami, *et al.*, 2021).

Um dos primeiros e prolongados estudos realizado até o momento, utilizando a aplicação de filtro solar contendo NPs de TiO₂, foi utilizando o mesmo duas vezes ao dia, durante 9 a 31 dias. Os resultados revelaram níveis mais altos de NPs de TiO₂ tanto na epiderme quanto na derme dos pacientes tratados (Tan, *et al.*, 1996). Em outro estudo com voluntários, as NPs de TiO₂ foram encontradas em células viáveis da epiderme após a aplicação do filtro solar seis vezes ao dia, por um período de sete dias consecutivos (Naess, *et al.*, 2016). Até onde se sabe, toda a controvérsia gerada em torno da penetração das NPs está relacionada à alta variabilidade nas condições analisadas, pois se sabe que a penetração dérmica das NPs de TiO₂ depende do modelo utilizado (animal, humano, sexo), tamanho, composição, estado de aglomeração das NPs, local de aplicação, dose, número de aplicações, duração do estudo, exposição a UV, entre outros. Por outro lado, a maioria dos artigos não utilizam protocolos padronizados e o mais problemático é a utilização de técnicas de caracterização com um limite de detecção incapaz de detectar NPs (Swapnil, *et al.*, 2022).

Curiosamente, Pelclova *et al.* utilizou uma técnica de alta sensibilidade para detectar NPs de TiO₂ em amostras de plasma e urina após 6 a 48 h do uso do filtro solar. Pela primeira vez, foi claramente demonstrado quantidades detectáveis das NPs de TiO₂, confirmando que as NPs podem passar pelas camadas protetoras da pele (Pelclova, *et al.*, 2019).

1.4 Métodos alternativos de pele

A utilização de animais no meio científico causa muita controvérsia devido às questões éticas que a envolvem. Sabe-se que a utilização de animais como modelos de estudos gerou grandes avanços científicos na área da saúde, e que sem eles esses avanços não seriam possíveis. Mesmo sabendo que o uso desses animais salvou e ainda salva muitas vidas, não podemos esquecer que os estudos nesses animais podem gerar dor e estresse ao mesmo. Além da utilização de animais para estudos na prevenção, cura e tratamento de doenças, os animais de laboratório também são utilizados para garantir a segurança de muitos produtos de composição química como medicamentos e cosméticos, entre outros.

Em 1959, os pesquisadores William Russel e Rex Burch, preocupados com a ética na experimentação animal, publicaram um livro denominado “*The principles of Humane Experimental Technique*”, que descreve o princípio dos 3Rs e relaciona o uso de animais na ciência. Essa terminologia (3Rs) está relacionada aos princípios de redução (*reduction*), substituição (*replacement*) e refinamento (*refinement*) da utilização de animais. Desta forma, os 3Rs utiliza como estratégia a otimização da quantidade de animais utilizados nos experimentos científicos, substituição do uso de animais em experimentos quando isso for possível e o incentivo ao refinamento das técnicas de modo a reduzir o sofrimento, a dor ou o desconforto dos animais (Thales, 2015; Hubrecht and Cáster, 2019). De forma a implementar esta estratégia, foi então desenvolvido os “Métodos Alternativos”. Portanto, os métodos alternativos são definidos por aqueles que têm a capacidade de reduzir, refinar ou até mesmo substituir a utilização de animais em testes científicos. (Doke & Dhawale, 2015; Hubrecht and Cáster, 2019).

Dentre os métodos alternativos, destacam-se os métodos *in silico*, que utiliza modelos matemáticos ou computacionais de softwares para prever o efeito de novas substâncias com base em banco de dados, os métodos conhecidos como sistemas microfisiológicos, também conhecida pelas nomenclaturas *human-on-a-chip*, *organ-on-a-chip* e *multi-organ-chip*, que utiliza o cultivo de células organizadas em arquitetura tridimensional, chamados de organoides, em dispositivos microfluídicos e os métodos alternativos *in vitro*, que utilizam o cultivo de células, tecidos ou órgãos em laboratório, visando obter sempre as mesmas informações obtidas com o modelo animal (Doke & Dhawale, 2015; Raunio, *et al.*, 2011; Uwe, *et al.*, 2019).

Em 2009, devido à grande pressão política e ética em relação a implementação de ações que substituíssem a utilização de animais para experimentos científicos, a União Europeia deu origem a regulamentação que prevê a avaliação da segurança dos ingredientes cosméticos por testes que não utilizem animais. E foi a partir de 2013, que a União Europeia banuiu oficialmente a utilização de animais para as pesquisas de desenvolvimento de cosméticos, tanto para testar os ingredientes como para os produtos acabados (*Commission implementing decision of 25 November 2013 on Guidelines on Annex I to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on Cosmetic Products (Text with EEA Relevance) (2013/674/EU)*, 2013). Antes de um novo produto cosmético ser comercializado, ele deve passar por uma série de testes, testes de toxicidade, segurança, eficácia entre outros. Todas essas ações representaram e ainda representam um grande incentivo ao desenvolvimento assim como a adoção de métodos alternativos ao uso de animais em todo o mundo incluindo o Brasil.

Desde então, o Brasil sempre mostrou um grande compromisso e empenho para promover, implementar, desenvolver e validar métodos alternativos. Foi com esse objetivo que em julho de 2012, através do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), foi criada a RENAMA que tem por objetivo: promover a implementação, o desenvolvimento e a validação de métodos alternativos ao uso de animais; promover a adoção de métodos alternativos ao uso de animais na atividades de ensino e pesquisa; estimular a implantação de métodos alternativos ao uso de animais por meio do de treinamento técnico e implementação de metodologias validadas; monitorar

periodicamente o desempenho dos laboratórios associados por meio de comparações interlaboratoriais; promover a qualidade dos ensaios usando-se do desenvolvimento de materiais de referência químicos e biológicos certificados, quando aplicável; incentivar a implementação do sistema de qualidade laboratorial e dos princípios das boas práticas de laboratório (BPL); disseminar o conhecimento na temática de métodos alternativos ao uso de animais; ofertar, no âmbito dos laboratórios integrantes da Rede, serviços para ensaios toxicológicos utilizando metodologias alternativas ao uso de animais (Nagarajan, *et al.*, 2021).

A validação dos métodos alternativos para a substituição de testes em animais envolve sempre três laboratórios, o que desenvolveu o método e dois outros laboratórios independentes selecionados pelo corpo de validação. O processo de validação foi concebido para garantir a qualidade e a segurança dos métodos na avaliação da capacidade preditiva do modelo em relação à sensibilidade, especificidade e precisão.

Alguns métodos alternativos *in vitro* foram validados pelas diretrizes da *Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico* (OECD) e estão disponíveis comercialmente, como a EpiSkin™, EpiDerm™ e SkinEthic™ RHE, que serão mais discutidos adiante.

1.5 Modelos tridimensionais de pele reconstruída

A partir da Regulamentação Europeia, em 2009, é proibido a utilização de animais em testes de produtos cosméticos. Desta forma, as empresas dessa área têm o desafio de desenvolver seus produtos sem utilizar os tradicionais estudos toxicológicos em animais. Com esta finalidade, foram então desenvolvidos os modelos de pele equivalente, que mimetizam propriedades histológicas, morfológicas, bioquímicas e fisiológicas das diferentes camadas da pele humana. De fato, modelos de engenharia 3D que imitam tecidos humanos em sistemas de microfisiologia estão em desenvolvimento para superar as limitações dos modelos 2D *in vitro* e a previsibilidade limitada de testes em animais.

Atualmente, os modelos de pele equivalente são classificados de duas formas, os sem arcabouços (*Scaffold-free*) e os com arcabouços (*Scaffold-based*). Os esferoides são os modelos que não utilizam arcabouço, uma vez que utilizam agregados de células não aderentes desenvolvido pela automontagem de um ou mais tipos de células. A vantagem de se utilizar este modelo está nos baixos custos e na boa reprodutibilidade (Randall, *et al.*, 2018). Em 2016, Stroebel *et al.*, demonstrou a formação de esferoides de pele com diferentes camadas de queratinócitos e com um núcleo formado por fibroblastos dérmicos produzindo sua própria matriz extracelular (Ströbel, *et al.*, 2016). Entretanto, esse modelo tem a desvantagem de ficar totalmente imerso no meio de cultivo, não corresponde totalmente a fisiologia da pele que tem uma interface ar-líquido. Contudo, os esferoides são muito utilizados em estudos toxicológicos e no desenvolvimento de medicamentos anticâncer (Messner, *et al.*, 2013; Sant & Johnston, 2017; Zanoni, *et al.*, 2020).

Os modelos que utilizam arcabouço, como o próprio nome diz, as células são cultivadas na presença de um suporte, podendo este ser a base de hidrogel ou a base de fibras poliméricas. São geralmente formados por polímeros naturais, sintéticos ou até mesmo pela combinação desses diferentes polímeros (Randall, *et al.*, 2018). Em questão estrutural, esse modelo possui uma construção 3D funcionalmente semelhante ao tecido biológico (Caddeo, *et al.*, 2017; Debels, *et al.*, 2015). Entre os polímeros naturais mais utilizados, destacam-se o colágeno, a elastina, a fibronectina, fibrina, quitosana, entre outros (Lohmann, *et al.*, 2017; Mason, *et al.*, 2013; Ashna, *et al.*, 2022). Para o desenvolvimento da pele equivalente os modelos que utilizam um suporte polimérico natural são muito utilizados, levando-se em consideração que não apresentam toxicidade e raramente apresentam algum tipo de resposta inflamatória. Entretanto, muitos polímeros naturais, como por exemplo o colágeno, por apresentarem alto teor de água, possuem fracas propriedades mecânicas, sendo necessário muitas das vezes, implementar novas técnicas para melhorar a resistência mecânica, como por exemplo a reticulação. Mesmo com essa limitação, vale ressaltar que o colágeno tipo I ainda é predominantemente utilizado (Sahana & Rekha, 2018).

Os polímeros sintéticos foram desenvolvidos com o intuito de superar as limitações encontradas com os polímeros naturais, tanto em relação as fracas propriedades mecânicas quanto a alta variabilidade dos lotes (Antoine, *et al.*, 2014; Randall, *et al.*, 2018). Os polímeros sintéticos mais utilizados são o ácido polilático, poli (ϵ -caprolactona), polietilenoglicol, entre outros. Entretanto, por possuírem propriedades de adesão celular fracas, geralmente elas são utilizadas juntamente com os polímeros naturais (Liu e Wang, 2020).

Comparados à pele humana, os modelos de pele equivalente têm a desvantagem de ter uma função de barreira prejudicada, são mais permeáveis e têm um curto período de viabilidade. Atualmente, foram validados pela OECD diferentes modelos de pele equivalente e com diferentes níveis de complexidade biológica. Existem os modelos mais simples que consistem apenas na epiderme, conhecida como epiderme humana reconstruída (*Reconstructed Human Epidermis* - RHE), com um tipo de célula (queratinócitos) e existem os modelos mais completos, com epiderme e derme (queratinócitos e fibroblastos), conhecidos como modelo de espessura total da pele (*Full-Thickness Skin Model* - FT). A complexidade pode até aumentar quando outros tipos de células são adicionados ao modelo, como melanócitos, células de Langerhans, células-tronco, entre outros (Mathes, *et al.*, 2014; Moniz, *et al.*, 2020). A Figura 4 mostra um esquema dos principais modelos de pele equivalente.

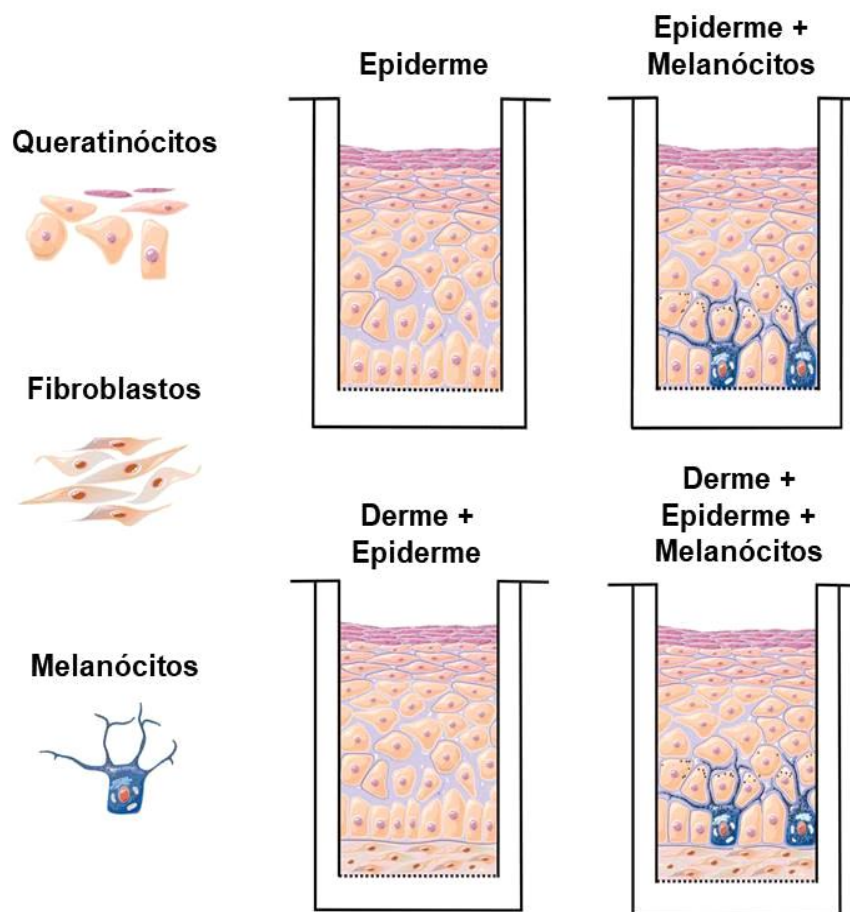


Figura 4. Esquema dos principais modelos de pele equivalente utilizados.

Imagem adaptada de: <https://smart.servier.com>

As vantagens e desvantagens entre esses diferentes modelos dependem da finalidade de cada estudo, por exemplo, os modelos constituídos apenas por epiderme são utilizados nos testes de irritação, corrosão, fototoxicidade, genotoxicidade dérmica, administração de medicamentos transdérmicas, testes de sensibilização e metabolização da pele, enquanto aqueles com epiderme e derme são geralmente usados para avaliar a eficácia de medicamento ou terapia (Mathes, *et al.*, 2014; Moniz, *et al.* 2020). Entre os diversos modelos de pele equivalente disponíveis no mercado, encontra-se a SkinEthic™ (*EpiSkin Research Institute*), EpiSkin™ (*EpiSkin Research Institute, Lyon, França*), EpiDerm™ (*MatTech Co., Ashland, MA, EUA*), entre outros. Muitos modelos são utilizados para fins regulatórios, os modelos EpiSkin™ e EpiDerm™, por

exemplo, foram aprovados pela EURL ECVAM (Laboratório de Referência da União Europeia para alternativas à experimentação animal) para substituir o teste de irritação da pele de coelho *in vivo*. Muitos testes de irritação de pele *in vitro* estão oficialmente validados pelas diretrizes da *Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico* (OECD 439), entre estes modelos, encontram-se a EpiSkin™, EpiDerm™ e SkinEthic™ RHE (OECD No.439, 2019). Os testes para avaliar a corrosão da pele, que é a forma mais extrema de irritação da pele, também foram incluídas nas *regulamentações, assim como testes para a reconstrução da epiderme humana (EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ e epiCS®)* (OECD No. 431, 2015).

Esses modelos utilizam a epiderme humana reconstruída, que imita de perto as propriedades histológicas, morfológicas, bioquímicas e fisiológicas da camada epidérmica da pele humana (Kim, *et al.*, 2016; Bo, *et al.* 2022). Os modelos de pele humana reconstruídos superam as limitações das monocamadas clássicas de células *in vitro*, permitindo a aplicação tópica de materiais de teste. Eles foram considerados bons modelos para testar a irritação da pele, fototoxicidade e metabolismo da pele. O modelo EpiSkin, por exemplo, é uma epiderme humana reconstruída *in vitro* a partir de queratinócitos humanos normais cultivados em uma matriz de colágeno na interface ar-líquido que é validada para estudos de corrosão/irritação cutânea (Liu, *et al.*, 2018; Alépée, *et al.*, 2019. Segundo Pruniéras *et al.*, para criar esses modelos de pele, que sejam fisiologicamente relevantes, uma interface ar-líquido é necessária para concluir a diferenciação em toda a área da superfície (Magdalena, *et al.*, 2022).

Os modelos de pele são constituídos de queratinócitos crescidos sobre um substrato 2D, como um gel de colágeno ou um filtro de policarbonato, como mencionado anteriormente, ou sobre uma derme (Magdalena, *et al.*, 2022). Atualmente, ainda não existem modelos de pele validados com estruturas como folículos capilares, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas, que costumam atuar como rotas para invasão química, assim como também não possuem o microbioma presente na pele, que apresenta um papel protetor. Por este motivo, a pele humana *ex vivo* ainda é considerada o “padrão ouro” para alguns experimentos de penetração *in vitro*, pois se mantém a função de barreira com exceção do microbioma.

É importante ressaltar que existem questões éticas com a utilização de tecido humano, não podendo ser utilizado em um modelo comercial, pois a União Europeia proibiu ganhos financeiros através do uso de tecido humano. Portanto, a doação do tecido deve ser um ato altruísta e qualquer ganho financeiro seria eticamente errado.

O modelo EpiSkin™, por exemplo, utiliza uma cultura de queratinócitos humanos normais, sobre uma matriz de colágeno por 13 dias e o modelo SkinEthic™ utiliza queratinócitos humanos normais sobre um filtro de polycarbonato por um período de 17 dias (Suhail, *et al.*, 2019).

Comparando alguns modelos de pele equivalente com a pele nativa em relação à composição lipídica, foi observado que o modelo EpiDerm® foi o modelo que apresentou o maior teor lipídico, seguido do modelo EpiSkin™ e por último o modelo SkinEthic™ (Anderson & Shive, 2012). Também foi observado que a espessura entre os modelos de pele equivalente utilizados para avaliar a irritação dérmica variavam. O modelo EpiDerm® apresenta uma epiderme variando entre 7 a 14 camadas (83-100 µm) com um estrato córneo de 16 a 25 camadas (12-28 µm), o modelo EpiSkin™ apresenta uma epiderme variando de 7 a 10 camadas celulares (24-69 µm) e um estrato córneo de 15 a 24 camadas (17-37 µm), o modelo SkinEthic™, apresenta uma epiderme com 5 a 9 camadas de células (23-59 µm) e um estrato córneo com 14 a 24 camadas (15-32 µm). Foi demonstrado que a proteína hemidesmossomo, que é uma proteína que medeia a adesão das células epiteliais com a membrana basal, conectando seus filamentos intermediários do citoesqueleto com a matriz extracelular, estava mais presente nos modelos SkinEthic™, do que no modelo EpiDerm™, e pouquíssimo foi observado nos modelos EpiSkin™. Os três modelos mostraram sinais de apoptose e um acúmulo intercelular anormal de vesículas (Ponec, *et al.*, 1997, 2000, 2002). Resultados semelhantes em relação a composição lipídica foram demonstrados em modelos 3D utilizando HaCaT (Dijkhoff, *et al.*, 2022). Embora seja muito importante observar e entender a composição lipídica desses modelos, o real efeito da função de barreira ainda não foi quantificado, e esse efeito pode variar de acordo com a capacidade de penetração de cada produto químico.

A viabilidade celular é o principal objetivo para avaliar a toxicidade de substâncias químicas, no entanto, ensaios complementares podem ser realizados, como matriz de genes, análise histológica, morfológica e liberação de citocinas (Sarmiento, *et al.*, 2012; Almeida, *et al.*, 2017).

Atualmente, os modelos disponíveis comercialmente para avaliar a corrosão cutânea *in vitro* (OECD TG 431) e irritação da pele (OECD TG 439) são: EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™, epiCS® e LabCyte® (OECD No. 431, 2015; OECD No.439, 2019).

A vantagem de se utilizar os modelos RHE é que eles contêm todas as camadas epidérmicas da pele, com a principal desvantagem de que nem sempre é possível distinguir os estratos basal, espinhoso e granuloso, questão importante para os estudos de penetração. Além disso, é observada uma baixa variação entre lote e algumas vezes uma alta variação (Almeida, *et al.*, 2017; Mathes, *et al.*, 2014). Os modelos de pele de espessura total (FT) tem a vantagem de fornecer um tecido parede a parede, além de possuir uma membrana basal semelhante à *in vivo* quando comparado aos modelos RHE. A permeabilidade dos modelos RHE é inferior à pele humana e a do porco, porém eles são aceitos para testar estudos de permeação e penetração *in vitro* quando os medicamentos são aplicados como soluções aquosas (Schäfer-Korting, *et al.*, 2008; Neupane, *et al.*, 2020).

A adição dos fibroblastos nos modelos de espessura total ao protocolo é uma adição crítica, uma vez que introduz a sinalização parácrina. A adição dessas células e a matriz dérmica que eles produzem aumenta a vida útil dos modelos de 8 para 20 semanas, aproximadamente. Os hemidesmossomos e fibrilas de ancoragem também podem ser vistos nestes modelos (Mathes, *et al.*, 2014; Bo, *et al.*, 2022).

Para testar os produtos de proteção solar, as empresas também estão desenvolvendo modelos de pele equivalente que incorporam melanócitos (por exemplo, MelanoDerm™, MatTek corp; epiCS -M, ATERA SAS & CellSystems GmbH; e subsidiária SkinEthic™ RHPE da L'Oréal) (Li, *et al.*, 2011; Gledhill, *et al.*, 2015; Szymanski, *et al.*, 2020). Como é possível observar, os modelos de pele equivalente disponíveis

atualmente, ainda não contêm todos os tipos de células consideradas essenciais como as células dendríticas e os macrófagos, muito menos integram vasos sanguíneos, nem a interferência dinâmica entre o epitélio e o tecido conjuntivo, que são essenciais para regular a morfogênese e homeostase da epiderme.

Atualmente, a principal estratégia para desenvolver modelos de pele equivalente, tem sido utilizar técnicas de biofabricação, como a eletrofiação e a bioimpressão, com o intuito de desenvolver modelos biológicos cutâneos relevantes, constituídos por tipos celulares especializados como os melanócitos, adipócitos, as células de Langherans, células imunes, células-tronco, entre outros, assim com uma vasculatura, permitindo a entrega fisiológica de oxigênio e nutrientes (Mathes, *et al.*, 2014; Szymanski, *et al.*, 2020). O principal objetivo dessa técnica é alcançar um construto cutâneo 3D fisiológico relevante e que possa ser usado para avaliar a toxicidade de novas formulações cosméticas e também o desenvolvimento de medicamentos contra o câncer.

1.6 Desafios na avaliação toxicológica de nanopartículas

Embora os modelos de pele equivalente tenham sido utilizados pela indústria cosmética para testes de corrosão e irritação da pele de formulações químicas, até o momento não se sabe se esse modelo é apropriado para o estudo de citotoxicidade, corrosão, irritação e fototoxicidade de formulações contendo NPs de TiO₂. Deve-se sempre levar em consideração que os princípios para avaliar os riscos dos produtos químicos são muitas das vezes diferentes de algumas propriedades importantes das NPs consideradas determinantes para a avaliação da toxicidade, como tamanho, reatividade, área de superfície, concentração, estrutura cristalina, entre outros, assim como também deve-se levar em consideração que avaliar o risco de NPs não é uma questão trivial, uma vez que o quadro regulamentar exige uma avaliação caso a caso (Hristozov, *et al.*, 2012; Schwirn, *et al.*, 2014; Wu, *et al.*, 2020; Lisa, *et al.*, 2021).

Devido a redução do tamanho das NPs, a área de superfície de contato aumenta, e por consequência, aumenta a reatividade, influenciando diretamente na toxicidade.

Antes das análises toxicológicas, é essencial caracterizar as propriedades físico-químicas das NPs, como a forma, tamanho, estado de aglomeração e estrutura cristalina, uma vez que esses parâmetros podem influenciar na resposta celular e na capacidade de penetração na pele. A formação de proteína corona na superfície das NPs, podem modificar suas propriedades físico-químicas, como a carga superficial, além de interferir nas funcionalidades nos microambientes biológicos, como na captação celular, inflamação e degradação (Sanches, *et al.*, 2019).

Muitas técnicas de caracterização são utilizadas para avaliar a toxicidade de NPs. A microscopia eletrônica de transmissão é uma das técnicas mais utilizadas para avaliar a distribuição do tamanho, forma e morfologia das NPs. No entanto, outras técnicas também são utilizadas, como o espalhamento dinâmico de luz (DLS), espectroscopia por perda de energia de elétrons (EELS), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectrometria de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), microscopia de força atômica (AFM), espectrofotometria na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), entre outros (Ribeiro, *et al.*, 2017).

Após a caracterização físico-química das NPs, procede-se a análise do potencial efeito tóxico *in vitro*. Neste contexto, evidências mostram que as NPs, muitas das vezes, interferem com muitos ensaios biológicos utilizados para a avaliação da citotoxicidade. No caso das NPs de TiO₂, foi relatado interferência como o ensaio de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolio (MTT), ensaio de lactato desidrogenase (LDH) (Holder *et al.*, 2012; Kroll & Hendrik, 2012; Sanches *et al.*, 2019), vermelho neutro (Guadagnini *et al.*, 2015, Sanches *et al.*, 2019), ensaio de Alamar Blue (Ong, *et al.*, 2014; Lammel & Sturve, 2018), entre outros. Confirmando a teoria de que avaliar a toxicidade de NPs não é uma questão tão simples. Contudo, a relevância humana dos testes toxicológicos em células cultivadas *in vitro* e em monocamada, estimularam o desenvolvimento de tecidos biomiméticos visando identificar com maior confiança o perigo de compostos químicos.

Na literatura ainda existem poucos estudos que avaliam os riscos das NPs em modelo de pele equivalente. A maioria dos estudos utilizando esses modelos concluíram que as NPs de TiO₂ não são irritantes, corrosivas e nem são fototóxicas (Miyani &

Hughes, 2017; Tang, *et al.*, 2018). Outro grupo, avaliou os mecanismos de internalização de NPs de ouro com diferentes cargas de superfície (carga neutra, negativa e positiva) utilizando o modelo Episkin. Eles demonstraram que todas as NPs de ouro estudadas penetraram na epiderme, no entanto, a NP com carga superficial positiva exibiram a mais eficiente penetração na pele através das vias intracelular e intercelular quando comparada com as NPs de ouro com carga negativa e neutra (Hao, *et al.*, 2017).

No Brasil, o Grupo Boticário desenvolve desde 2013 novos modelos de pele, ou seja, espessura total incluindo derme e epiderme, e epiderme humana reconstruída a partir de tecidos de doadores brasileiros. A fim de permitir o uso regulatório desses modelos, é fundamental a avaliação da sua proficiência, sendo esse um dos objetivos deste estudo.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O objetivo principal da tese é avaliar a proficiência do modelo de epiderme humana reconstruída do Grupo Boticário em relação ao potencial de irritação seguindo as orientações do Guia da OECD 439 e utilizar esse modelo para avaliação, de forma rápida e confiável, do perigo de nanopartículas de TiO₂ (rutilo), rotineiramente usadas nas formulações de protetor solar.

2.2 Objetivos específicos

1. Desenvolvimento de um artigo de revisão sistemática com o intuito de compreender a relevância dos modelos de pele equivalente para avaliação da toxicidade induzida por nanopartículas de TiO₂.
2. Construção do modelo de epiderme humana reconstruída;

3. Avaliação da proficiência do modelo de epiderme humana reconstruída quanto ao potencial de irritação, segundo o TG 439 da OECD;
4. Avaliação da toxicidade de NPs de TiO_2 no modelo de epiderme humana reconstruída;

Para facilitar o entendimento da base teórica e dos resultados obtidos, a tese foi dividida em dois capítulos, descritos abaixo.

- **CAPÍTULO I:** Corresponde ao primeiro objetivo específico, com todas as etapas realizadas do artigo de revisão sistemática.
- **CAPÍTULO II:** Serão apresentados todas as outras etapas dos objetivos específicos (etapas de 2 a 4).

CAPÍTULO I

Artigo de revisão sistemática

3. Capítulo I: Artigo de revisão sistemática

Avaliação da toxicidade de nanopartículas de TiO₂ no modelo de pele equivalente

Artigo publicado em junho de 2020 no periódico “Frontiers in Bioengineering and Biotechnology”. Factor de Impacto 4.21 (Anexo 1).

Autores: Priscila Laviola Sanches^{1,2}, Luths Raquel de Oliveira Geaquinto^{2,3}, Rebecca Cruz⁴, Desirée Cigaran Schuck⁵, Márcio Lorencini⁵, José Mauro Granjeiro^{1,2,3,4} e Ana Rosa Lopes Ribeiro^{1,2,3}

¹Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, Universidade do Grande Rio, Duque de Caxias, Brasil; ²Diretoria de Metrologia Aplicada às Ciências da Vida, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Duque de Caxias, Brasil; ³Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Duque de Caxias, Brasil; ⁴Universidade Federal Fluminense, Niterói, Brasil; ⁵Pesquisa e Desenvolvimento, Grupo Boticário, Curitiba, Brasil.

3.1 Introdução

O desenvolvimento da área de nanotecnologia, no que diz respeito à produção de nanomateriais, está em crescimento exponencial (Wang e Tooley, 2011). De acordo com a Organização Internacional de Padronização (ISO), nanomaterial é definido como material natural, incidental ou manufaturado contendo partículas (estado não ligado, agregado, aglomerado), onde 50% ou mais das partículas têm uma ou mais dimensões externas na faixa de tamanho entre 1 e 100 nm (Potocnik, *et al.*, 2011; International Organization for Standardization, 2017).

Devido às suas dimensões nano, eles podem efetivamente ter características elétricas, térmicas e mecânicas, desejáveis para diversas aplicações (Davis, *et al.*, 2010; Louro, *et al.*, 2019; Lüderwald, *et al.*, 2019). Consequentemente, a exposição humana às nanopartículas (NPs) aumentou devido à sua utilização em indústrias como: alimentar, farmacêutica, cosmética, biomédica (dispositivos médicos: implantes, próteses, sistemas

de libertação controlada de fármacos), aeronáutica, têxtil, bem como engenharia ambiental (Kongsong, *et al.*, 2014; Sethi, *et al.*, 2014; Semenzin, *et al.*, 2015; Miyani e Hughes, 2016; Hanawa, *et al.*, 2019; Shetti, *et al.*, 2019).

Em relação aos cosméticos, se sabe que muitos produtos contêm diversos tipos de materiais nanométricos como: ouro, óxido de zinco, dióxido de titânio, nanotubos, fulerenos, entre outros (Morganti, *et al.*, 2010). Algumas das referidas nanoestruturas foram introduzidas em protetores solares, com o objetivo final de proteger a pele da radiação solar, reduzindo as chances de melanoma e o envelhecimento precoce da pele (Wolf, *et al.*, 2001; Rampaul, *et al.*, 2007). As NPs estão entre os melhores agentes fotoprotetores, pois são capazes de bloquear a incidência da radiação ultravioleta (González, *et al.*, 2008). Atualmente, as nanopartículas de dióxido de titânio (NPs de TiO_2) são as nanoestruturas mais utilizadas em protetores solares disponíveis comercialmente, devido à sua capacidade de refletir e espalhar os raios ultravioleta A (UVA, 320–400 nm) e ultravioleta B (UVB, 290–320 nm), protegendo contra queimaduras solares e fotoenvelhecimento (Monteiro-Rivière, *et al.*, 2011; Martirosyan e Schneider, 2014).

O TiO_2 foi anteriormente classificado como uma partícula inerte, incapaz de ser absorvida pela pele (Nohynek, *et al.*, 2007). Quando esses protetores solares foram criados, o TiO_2 foi usado em escala micrométrica, sendo visível na pele como uma camada opaca. Com o avanço da nanotecnologia e visando solucionar esse efeito visual indesejável, as NPs de TiO_2 foram introduzidas nas formulações.

O Comitê Científico de Segurança do Consumidor da UE (SCCS) aprovou o dióxido de titânio nanométrico (nas três formas cristalinas) para ser considerado seguro para uso em produtos cosméticos destinados a aplicação em pele saudável, intacta ou queimada pelo sol. Como filtro UV, o TiO_2 pode ser introduzido em formulações cosméticas na concentração máxima de 25%. Os benefícios do uso de NPs de TiO_2 são sua alta área superficial, aumento das propriedades de espalhamento e reflexão dos raios ultravioleta e transparência na luz visível (Wiesenthal, *et al.*, 2011). Em contraste,

esta redução de tamanho do TiO₂ aumenta suas chances de internalização pelas células da pele, com possíveis consequências biológicas para os consumidores.

Na literatura, alguns estudos *in vitro* descreveram que as NPs de TiO₂ induzem toxicidade, inflamação e modificações genéticas que são intensificadas com a exposição a UVA e UVB (Jin, *et al.*, 2011; Shi, *et al.*, 2013; Tucci, *et al.*, 2013; Zhao, *et al.*, 2013; Wang e outros, 2014). Os possíveis mecanismos de toxicidade incluem estresse oxidativo, onde NPs de TiO₂ desencadeiam a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em diferentes linhagens celulares dérmicas (Tucci, *et al.*, 2013; Zhao, *et al.*, 2013; Wang, *et al.*, 2014; Foroozandeh e Aziz, 2015). O envolvimento de ROS em dano oxidativo ao DNA, em células epidérmicas humanas, HaCaT (Shukla, *et al.*, 2014) e fibroblastos dérmicos humanos (Saqib, *et al.*, 2012), foi relatado. A retomada da toxicidade dérmica está associada à geração de ROS, estresse oxidativo e depleção de colágeno que promovem o envelhecimento da pele (Wu, *et al.*, 2009). Na verdade, a estratégia na indústria de protetores solares é revestir as NPs de TiO₂ para minimizar a sua potencial toxicidade (Dréno, *et al.*, 2019).

Compostos como: sílica, alumina, cetilfosfato, dióxido de manganês, trietoxicaprililsilano, PEG entre outros, contribuem para tornar os protetores solares mais passivos, melhorando sua capacidade de capturar ou inibir a formação de espécies de radicais livres, bem como de restringir a penetração de NPs na pele (Filipe, *et al.*, 2009; Osmond e McCall, 2010; Smijs e Pavel, 2011). Essas alterações nas características da superfície das NPs dão origem à necessidade de um novo conjunto de caracterização físico-química, avaliação *in vitro* e *in vivo*, uma vez que a modificação da superfície regula as interações interpartículas e células-NPs, mediando a formação da coroa que é amplamente conhecida por induzir respostas celulares específicas como absorção celular, tráfego intracelular, acumulação e biodistribuição (Oberdörster, *et al.*, 2005; Filipe, *et al.*, 2009; Osmond e McCall, 2010; Foroozandeh e Aziz, 2015; Ribeiro, *et al.*, 2017; Sanches, *et al.*, 2019). Os resultados encontrados sugerem que o benefício de uma barreira física na forma de um revestimento minimiza a formação de ROS e a consequente toxicidade dérmica (Yu, *et al.*, 2020).

Os dados *in vitro* e *in vivo* sobre o potencial de absorção dérmica e/ou penetração de NPs de TiO₂ de protetores solares apresentam resultados controversos. Embora vários artigos descrevam o contrário (Filipe, *et al.*, 2009; Senzui, *et al.*, 2010; Crosera, *et al.*, 2015), a penetração de NPs de TiO₂ tanto em pele saudável quanto em pele danificada ou lesionada (como nos casos de cicatrizes, queimaduras solares e pele depilada) é demonstrado na comunidade científica (Tan, *et al.*, 1996; Lekki, *et al.*, 2007; Gontier, *et al.*, 2008; Schneider, *et al.*, 2009; Lin, *et al.*, 2011; Monteiro-Riviere, *et al.*, 2011; Larese Filon, *et al.*, 2013; Gulson, *et al.*, 2015; Shakeel, *et al.*, 2016; Touloumes *et al.*, 2020), sendo a pele danificada ou lesionada mais suscetível a penetração de NPs TiO₂ (Tan, *et al.*, 1996; Lekki *et al.*, 2007; Gontier *et al.*, 2008; Schneider, *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2011; Monteiro-Riviere *et al.*, 2011; Larese Filon *et al.*, 2013; Gulson *et al.*, 2015; Shakeel *et al.*, 2016; Touloumes *et al.*, 2020). A aplicação prolongada de protetores solares contendo NPs de TiO₂ na pele humana saudável revela a detecção de níveis de titânio na epiderme e na derme dos pacientes (Tan *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 2011; Gulson *et al.*, 2015; Naess *et al.*, 2015; Shakeel *et al.*, 2016).

Recentemente, embora o estudo tenha algumas limitações (pouco número de voluntários), Pelclova *et al.* usando técnicas de caracterização altamente sensíveis detectou NPs de TiO₂ no plasma e na urina após 6 a 48 h após de exposição ao protetor solar, demonstrando que as NPs de TiO₂ podem passar pelas camadas protetoras saudáveis da pele humana e entrar na circulação sanguínea, mesmo com tempos de exposição mais baixos de aplicação de filtro solar (Pelclova e outros, 2019). A penetração das NPs não é exclusiva das NPs de TiO₂. Brian Gulson *et al.* também relatou a detecção de óxido de zinco usado em protetores solares em sangue e urina de humanos (Gulson *et al.*, 2010).

Do nosso ponto de vista, e também afirmado pelo relatório da OCDE que avalia os métodos *in vitro* para avaliação de risco de nanomateriais em humano (Organização para o Desenvolvimento de Cooperação Econômica, 2018), existem muitos pontos críticos na literatura disponível que contribuem para todas as controvérsias sobre a penetração das NPs de TiO₂ na pele humana. É importante referir que vários fatores como: o modelo empregado (animal, humano com variações de gênero), tamanho,

composição química e revestimento das NPs, local de aplicação, solubilidade das partículas, dose e número de aplicações, período do estudo, o movimento de flexão da pele, a exposição aos raios UV, entre outros, influenciam a penetração dérmica das nanopartículas (Gulson et al., 2015; Shakeel et al., 2016). Tanto quanto sabemos, a maioria dos estudos é realizada com uma grande variedade de condições e metodologias, onde não são utilizados protocolos padronizados e nanomateriais de referência. Mais importante é que as técnicas de caracterização utilizadas para avaliar a penetração de NPs na pele às vezes estavam entrando no limite de detecção do equipamento, contribuindo para toda essa polêmica.

O mecanismo de penetração das nanopartículas de filtro solar não foi esclarecido, no entanto, sugere-se que as NPs de TiO_2 possam ser absorvidas por diferentes vias que incluem os transportes transcelular e paracelular, bem como folículos pilosos (transapêndices), glândulas sudoríparas, dobras cutâneas ou uma combinação de todos, como mostrado na figura 2 (Filipe et al., 2009; Wu et al., 2009). O fato de que, após a penetração na pele, as NPs possam atingir a corrente sanguínea e, em seguida, sofrer translocação para vários tecidos e órgãos distantes, sugerem que a exposição prolongada de NPs possa representar um risco à saúde dos consumidores (Lademann et al., 1999; Baroli et al., 2007; Lekki et al., 2007; Saquib et al., 2012; Shakeel et al., 2016).

Conforme descrito anteriormente, existem muitos estudos *in vitro* (utilizando modelos 2D) e *in vivo* (utilizando animais) sobre o efeito da citotoxicidade e genotoxicidade das NPs de TiO_2 . No entanto, as indústrias cosméticas estão usando métodos alternativos, como modelos de pele equivalente reconstruída, devido as considerações éticas, científicas e econômicas. A legislação cosmética da UE está trabalhando para abolir os testes em animais para cosméticos e seus ingredientes (Evans et al., 2016; Salamanna et al., 2016; Caddeo et al., 2017; Alépée et al., 2018; Owen et al., 2018). Na verdade, modelos de engenharia 3D que imitam tecidos humanos estão em desenvolvimento para superar as limitações dos modelos *in vitro* 2D em relação à sua preditividade limitada (Verneti et al., 2017). Atualmente, existem modelos de pele

equivalente disponíveis comercialmente, bem como construções internas com vários níveis de complexidade biológica.

O modelo mais simples consiste em uma epiderme onde apenas os queratinócitos são usados, e é conhecido como Epiderme Humana Reconstruída (RHE) e está disponível comercialmente como EpiDerm™ (MatTek Corp), EpiSkin™ e SkinEthic™ (uma subsidiária da L'Oreal). Eles fazem uso de epiderme humana reconstruída, que imita de perto as propriedades histológicas, morfológicas, bioquímicas e fisiológicas da camada epidérmica da pele humana (Kim et al., 2016). A vantagem dos modelos de RHE é que eles contêm todas as camadas epidérmicas da pele, entretanto, tem como desvantagem, que nem sempre é possível distinguir os estratos basal, espinhoso e granuloso, questão importante para estudos de penetração. Além disso, observa-se uma baixa variação intralote e, por vezes, uma alta variação interlote (Mathes et al., 2013; Almeida et al., 2017). Em abril de 2007, os modelos EpiSkin™ e EpiDerm™ foram aprovados pelo ECVAM (Centro Europeu para a Validação de Métodos Alternativos) para substituir o teste *in vivo* de irritação cutânea em coelhos. Eles também são usados para outros fins regulatórios, como testes *in vitro* de irritação da pele (OCDE TG 439) e corrosão da pele (OCDE TG 431) de ingredientes cosméticos. Uma atualização em 2019 foi feita para incluir dois modelos adicionais, nomeadamente SkinEthic™ e epiCS^R (OCDE, 2014, 2019). Além disso, esses modelos são amplamente utilizados para testes de fototoxicidade, genotoxicidade, sensibilização, metabolização, bem como para testar a administração de drogas transdérmicas (Mathes et al., 2013; Almeida et al., 2017). A EpiSkin, por exemplo, é uma epiderme humana reconstruída *in vitro* a partir de queratinócitos humanos normais cultivados em uma matriz de colágeno na interface ar-líquido que é validada para estudos de corrosão/irritação da pele (Alépée et al., 2018; Liu et al., 2018). A viabilidade celular é o principal desfecho, porém ensaios complementares podem ser realizados, como matriz de genes, análise histológica, morfológica e liberação de citocinas (Sarmiento et al., 2012; Almeida et al., 2017).

O Modelo de pele de espessura total (Full-Thickness Skin Model - FT), conhecido comercialmente como EpiDerm-FT™ é um modelo mais elaborado que consiste de uma epiderme e derme (queratinócitos e fibroblastos) e tem sido amplamente utilizado em

tratamentos com drogas ou avaliação da sua eficácia (Mathes et al., 2013). Esse modelo tem a vantagem de fornecer tecido parede a parede, além de ter uma membrana basal semelhante ao *in vivo* quando comparado aos modelos de RHE (modelo mais simples).

A permeabilidade dos modelos de RHE é inferior à pele humana e suína, no entanto, eles são aceitos para estudos de permeação e penetração *in vitro* quando drogas são aplicadas como soluções aquosas (Asbill et al., 2000; Schäfer-Korting et al., 2008; Neupane e outros, 2020). Continuando para testes de corrosão cutânea *in vitro*, seguindo OECD TG 431, os modelos disponíveis comercialmente são: EpiSkin™ Standard Model (SM), EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE, epiCS^R e LabCyte EPI-MODEL24 SCT (OECD, 2014). Em relação à irritação cutânea *in vitro* após TG 439, os modelos utilizados são: EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (SIT), SkinEthic™ (RHE), LabCyte EPI-MODEL24 SIT, epiCS^R e Skin+^R (OHAT, 2015). Para testar produtos de proteção solar, as empresas também estão desenvolvendo modelos de pele equivalente incorporando melanócitos (por exemplo, MelanoDerm™, MatTek corp., epiCS^R -M, ATERA SAS & CellSystems GmbH, e SkinEthic™ RHPE, subsidiária da L'Oréal).

Embora os modelos de pele equivalente tenham sido usados pela indústria cosmética para testes de corrosão e irritação da pele de formulações químicas, até o momento não se sabe se esses modelos são apropriados para estudar a citotoxicidade, corrosão da pele, irritação e fototoxicidade de formulações contendo NPs de TiO₂. Por esta razão, esta revisão sistemática visa responder à seguinte questão proposta: A toxicidade das nanopartículas de TiO₂ pode ser avaliada no modelo de pele equivalente?

3.2 Metodologia

A revisão sistemática (RS) foi realizada de acordo com o Manual *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* (Higgins & Green, 2011), o *Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analyses* (PRISMA) (Moher et al., 2009) e o *Office of Health Assessment and Translation* (OHAT) (National Toxicology Program, 2015), desenvolvido pelo Programa Nacional de Toxicidade. O protocolo deste

RS foi registrado no CAMARADES em <http://www.dcn.ed.ac.uk/camarades/research.html#protocols>. Além disso, uma avaliação de confiabilidade dos estudos de toxicidade *in vitro* denominada por Ferramenta de Avaliação de Confiabilidade de Dados Toxicológicos (ToxRTool) foi seguida para aumentar a qualidade e a transparência dessa pesquisa.

3.2.1 Foco da pergunta (baseada na estratégia PICO) (Schardt et al., 2007)

- População: modelo de pele humana 3D
- Intervenções ou exposição: exposição de NPs de TiO₂ nos modelos de pele equivalente
- Comparação: modelos de pele equivalente sem exposição a NPs de TiO₂
- Resultado: Efeitos gerados pelas NPs de TiO₂ no modelo de pele equivalente: citotoxicidade, fototoxicidade, irritação e corrosão.
- Desenho do estudo: estudos *in vitro*

3.2.2 Procura da estratégia

Foi realizada uma busca eletrônica nas bases de dados das bibliotecas MEDLINE/PubMed, Science Direct, Web of Science, Scopus e SciELO até fevereiro de 2019. Somente estudos em inglês, português, espanhol ou francês foram selecionados, sem restrição de data. Além disso, foram realizadas pesquisas nas referências dos estudos incluídos (isto é, referência cruzada). Assim como estudos não publicados (literatura cinza) foram analisados nas bases de dados *Gray Literature Report* e *OpenGrey*. Foi utilizada uma estratégia de busca específica para cada banco de dados, de acordo com suas características (tabela 1).

Tabela 1. Estratégia de busca.

Bases de dados	Palavras-chave
PubMed	("3d skin model"[tiab] OR "reconstructed human skin model"[tiab] OR "human skin model"[tiab] OR "epidermis model"[tiab] OR "episkin"[tiab] OR "epidermis"[tiab] OR "skin equivalent model"[tiab] OR "reconstructed human epidermis"[tiab]) AND ("titanium dioxide" [tiab] OR "tio2"[tiab] OR "titanium"[tiab] OR "titanium" [mesh]) AND ("nanoparticles"[tiab] OR "NP"[tiab] OR "nanomaterials"[tiab] OR "nanoparticles"[Mesh] OR "metal nanoparticles" [mesh]) AND ("skin corrosion"[tiab] OR "skin irritation"[tiab] OR "toxicity"[tiab] OR "cytotoxicity"[tiab] OR "phototoxicity"[tiab] OR "irritation" [tiab] OR "corrosion"[tiab] OR "Skin Irritancy Tests"[Mesh])
Science Direct	("skin model" OR epidermis OR episkin OR "skin equivalent model" OR "reconstructed human epidermis") AND (titanium OR tio2) AND (nano*) AND (corrosion OR irritation OR toxicity OR cytotoxicity OR phototoxicity)
Web of science	("skin model" OR "epidermis model" OR "episkin" OR "skin equivalent model" OR "reconstructed human epidermis") AND ("tio2" OR "titanium") AND ("nanoparticles" OR "NP" OR "nanomaterials") AND ("skin corrosion" OR "skin irritation" OR "toxicity" OR "cytotoxicity" OR "phototoxicity" OR "irritation" OR "corrosion")
Scopus	("skin model" OR "epidermis model" OR "episkin" OR "epidermis" OR "skin equivalent model" OR "reconstructed human epidermis") AND ("tio2" OR "titanium") AND ("nano*") AND ("toxicity" OR "citotoxicity" OR "phototoxicity" OR "irritation" OR "corrosion")
Scielo	("skin model" OR "epidermis model" OR "episkin" OR "epidermis" OR "skin equivalent model" OR "reconstructed human epidermis") AND ("tio2" OR "titanium") AND ("nano*") AND ("toxicity" OR "citotoxicity" OR "phototoxicity" OR "irritation" OR "corrosion")

Grey Literature	(skin OR epidermis) AND (titanium OR tio2) AND (skin irritancy test OR *toxicity)
-----------------	---

3.2.3 Critérios de elegibilidade (OHAT)

Os critérios de inclusão e exclusão estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Critérios de inclusão e exclusão

PICO	Inclusão	Exclusão
População	Estudo <i>in vitro</i> em modelo de pele equivalente	Testes clínicos Estudos <i>in vivo</i> Estudos <i>in vitro</i> em monocamada
Exposição	Exposição de NPs de TiO ₂ ; O TiO ₂ deve estar na escala nanométrica; A suspensão de TiO ₂ pode estar em qualquer fase cristalina ou mistura	Tamanho médio na escala micrométrica

Comparação	Modelo de pele equivalente sem exposição de NPs		
Desfecho	Efeitos gerados pelas NPs no modelo de pele equivalente: citotoxicidade, fototoxicidade, irritação e corrosão	Estudos focados na caracterização e síntese de NPs	
Tipo de publicação	Os relatórios devem conter dados originais	Artigos originais (por exemplo, editoriais, cartas);	sem dados (por exemplo, resenhas, cartas);
		Outros idiomas além do português, espanhol e inglês;	
		Estudos publicados apenas em forma abstrata;	
		Capítulos de livros;	

3.2.4 Seleção de estudos, processo de triagem e extração de dados

Os títulos e os resumos dos artigos recuperados foram selecionados por dois autores/revisores (P.L.S. e L.R.O.G.) e, em seguida, foram identificadas as publicações que preenchiam os critérios de inclusão. As divergências entre os autores da revisão foram resolvidas através de uma discussão cuidadosa, e as divergências restantes foram resolvidas por um terceiro revisor (J.M.G.). Depois disso, foi obtido o texto completo dos artigos elegíveis. Finalmente, com base nos critérios de inclusão, dois autores/revisores (P.L.S. e L.R.O.G.) selecionaram independentemente os artigos de texto completo

relevantes. Além disso, as divergências entre os autores revisores foram resolvidas pelo mesmo processo utilizado na primeira fase de seleção.

Quando disponíveis, os seguintes dados foram extraídos das publicações pelos revisores (PLS e RC): ano, DOI, tipo de modelo de pele, substância de teste, estrutura cristalina das NPs de TiO₂, tamanho primário da partícula, tamanho das NPs de TiO₂ após dispersão, tempo de exposição, o resultado esperado dos controles positivos e negativos, resultado da avaliação do teste de corrosão e/ou irritação e fototoxicidade e a principal conclusão.

3.2.5 Avaliação da confiabilidade

A avaliação da confiabilidade foi realizada por dois revisores (P.L.S. e L.R.O.G.), utilizando o ToxRTool desenvolvido pelo EURL ECVAM) (K. Schneider et al., 2009). A parte *in vitro* desta ferramenta consiste em uma lista de 18 critérios. Cada critério pode ser classificado como "1" (ou seja, 'critério atendido') ou como "0" (ou seja, 'critério não atendido' ou não relatado). Esses 18 critérios estão agrupados em cinco grupos principais: I- Identificação da substância avaliada, II- Caracterização da substância avaliada, III- Descrição do desenho do estudo, IV- Documentação dos resultados do estudo e V- Plausibilidade do desenho e resultados do estudo. Uma pontuação final foi registrada para cada grupo principal de cada artigo, e uma pontuação geral para cada estudo.

Nesta ferramenta, existem alguns critérios considerados indispensáveis para a confiabilidade de um estudo, destacados em vermelho (apresentados em informações suplementares). Independentemente da pontuação geral, somente se esses critérios forem atribuídos como "1" a ferramenta classificará o estudo como uma categoria confiável (1 ou 2). Essas categorias são: 1 (confiável sem restrições), 2 (confiável com restrições), 3 (não confiável) e 4 (não atribuível).

Por fim, o ToxRTool classificou na caixa “A” a categoria na qual o artigo foi atribuído com base na soma de pontos (pontuação geral), independentemente do critério vermelho. E, em “B”, a categoria é derivada considerando os critérios vermelhos.

3.3. Resultados

3.3.1 Pesquisa dos artigos nas bases de busca

A pesquisa inicial identificou 43 artigos, incluindo 11 títulos do MEDLINE/PubMed, 13 do Science Direct, 12 do Scopus e 7 da Web of Science. A busca na literatura cinza ou do cruzamento de referências não resultou em qualquer estudo. Após a remoção das duplicatas, 31 estudos tiveram seus títulos e resumos selecionados e 24 estudos foram excluídos por não atenderem aos critérios de elegibilidade. Em seguida, a triagem de texto completo não excluiu nenhum estudo, resultando na inclusão de 7 artigos (Choi et al., 2014a; Horie et al., 2016a; Kato et al., 2014; Kim et al., 2016a; Miyani & Hughes, 2017; Park et al., 2011; Tang et al., 2018) nesta revisão sistemática (Figura 5 Diagrama de fluxo da Prisma).

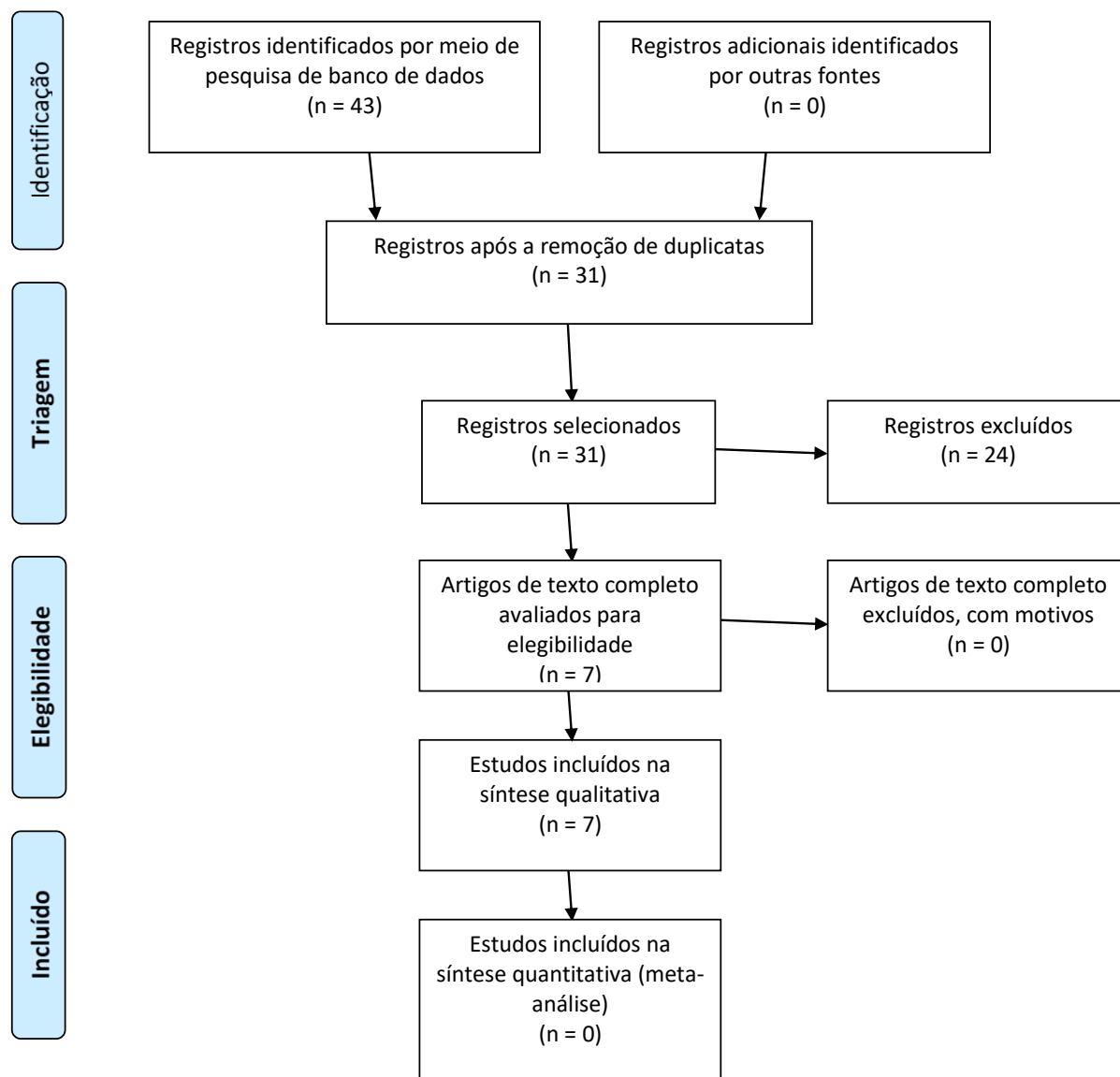


Figura 5. Fluxograma do processo de seleção de literatura.

Obtido de: *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement* (Moher et al., 2009)

3.3.2 Avaliação da Confiabilidade

Como descrito anteriormente, a avaliação da confiabilidade foi realizada usando a ferramenta ToxRTool. Pode-se observar que alguns critérios não foram atendidos pelos autores. O número de repetições e os métodos estatísticos para análise dos dados apresentados são alguns dos critérios que não foram descritos por alguns autores. Na

tabela 3 é possível observar a pontuação geral e as categorias de cada artigo selecionado. Assim, todos os artigos foram classificados na categoria A com “1”, correspondendo aos artigos considerados confiáveis sem restrições. Os artigos também foram classificados na categoria B com “1” quando todos os critérios considerados indispensáveis para o estudo foram confiáveis e atendidos.

Tabela 3. Pontuação geral e categorias dos artigos selecionados.

Autor	Pontuação geral	Categoria A	Categoria B
Park, Y. et al. (2011)	16	1	1
Choi, J. et al. (2014)	16	1	1
Kato, S. et al. (2014)	17	1	1
Horie, M. et al. (2016)	16	1	1
Miyani, V. A.; Hughes, M. F. (2017)	16	1	1
Kim, H. et al. (2016)	17	1	1

Tang, Y. et al. (2018)	18	1	1
-------------------------------	----	---	---

3.3.3 Características do Estudo

Dos sete artigos encontrados e analisados, quatro estudos utilizaram o EpiDerm™ (MatTek Corporation) (Horie et al., 2016a; Kim et al., 2016a; Miyani & Hughes, 2017; Park et al., 2011) um utilizou o EpiKutis™ (Biocell Biotechnology, China) (Tang et al., 2018) e um utilizou o KeraSkin (Modern Cell & Tissue Technology, Seul, Coréia) (Choi et al., 2014a) e o último foi desenvolvido no próprio laboratório (Kato et al., 2014). De acordo com os critérios de inclusão, todos os sete artigos usaram NPs de TiO₂ como substância de teste. Como mencionado, exibem três formas cristalinas de NPs de TiO₂: rutilo, anatase e brookita. No entanto, alguns estudos também utilizam misturas de estruturas anatase e rutilo. Dos 7 artigos selecionados, dois artigos utilizaram a estrutura cristalina rutilo (Choi et al., 2014a; Kato et al., 2014), dois artigos utilizaram a mistura (anatase e rutilo) (Kim et al., 2016a; Park et al., 2011), um artigo utilizou duas estruturas cristalinas, anatase e rutilo (Horie et al., 2016b) e dois artigos utilizaram anatase, rutilo e mistura (Miyani & Hughes, 2017; Tang et al., 2018). Alguns autores também utilizaram outras substâncias de teste, como: NPs de óxido de zinco, óxido de zinco/dióxido de titânio (Choi et al., 2014a), prata (Kim et al., 2016b; Miyani & Hughes, 2017), dióxido de cério (Miyani & Hughes, 2017), óxido de ferro (Kim et al., 2016b), óxido de alumínio (Kim et al., 2016b), poliestireno (Park et al., 2011) e fulereno-C60 aprisionado em polivinilpirrolidona (Kato et al., 2014). O tamanho primário das NPs de TiO₂ variou de 6 a 108 nm. Em relação ao tamanho dos aglomerados após a dispersão, como pode ser visto na Tabela 4, apenas três autores descreveram com precisão o tamanho das NPs (Choi et al., 2014a; Horie et al., 2016a; Tang et al., 2018) dois autores não descreveram o tamanho (Kato et al., 2014; Miyani & Hughes, 2017), um autor demonstrou o tamanho do aglomerado por imagem de microscopia eletrônica de transmissão (que é

aparentemente em torno de 200 nm (Park et al., 2011) e um autor afirma que o tamanho das NPs era de várias centenas de nanômetros (Kim et al., 2016b).

O teste de irritação da pele foi realizado em cinco artigos. Dois autores realizaram testes de corrosão e os outros dois realizaram testes de fototoxicidade. Além desses testes, na histopatologia de alguns artigos, ensaio de citocinas, ensaio de lactato desidrogenase, ensaio de imunossorvente ligado à enzima IL-8, ensaio IL-1 α , expressão relativa do gene HO-1, geração intracelular de EROs e hidroperóxidos lipídicos.

Três autores usaram a concentração de 100 μ g/mL, no entanto, cada autor utilizou diferentes tempos de exposição: 1 h (Park et al., 2011), 2 h (Tang et al., 2018) e 4 h (Horie et al., 2016a)

Além disso, um autor utilizou a concentração de 15 μ g/mL por 3 h de exposição (Kato et al., 2014), outro utilizou a concentração de 1 mg/mL por 1 h de exposição (Miyani & Hughes, 2017). Além disso, dois autores usaram o mesmo período de exposição de 3 min e 1 h. Em um estudo, a epiderme foi umedecida com água deionizada e foram adicionados 25 mg da substância teste (Kim et al., 2016b) e em outro estudo, 25% da substância teste em água deionizada foi usada (Choi et al., 2014a).

3.3.4 Resultados de toxicidade

- **Irritação na pele**

Todos os artigos que avaliaram a irritação cutânea utilizaram o ensaio de brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Choi et al., 2014a; Kim et al., 2016b; Miyani & Hughes, 2017; Park et al., 2011). Em todos os casos, as NPs de TiO₂ mostrou-se não irritante no modelo 3D, onde não foi observada redução da viabilidade celular. Em todos os estudos, os resultados foram comparados com os controles positivos e negativos, nos quais o dodecil sulfato de sódio (SDS) foi usado como controle positivo, a solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco (DPBS) e

a solução salina tamponada com fosfato (PBS) foram usadas em alguns estudos como controle negativo.

- **Corrosão da pele**

Dois autores usaram NPs de TiO₂ para avaliar a corrosão da pele (Choi et al., 2014a; Kim et al., 2016b). Choi *et al.* e Kim *et al.*, usaram hidróxido de potássio (KOH 8N) como controle positivo (Choi et al., 2014a; Kim et al., 2016b). Choi *et al.* observaram que após 3 min de exposição com KOH 8N, a viabilidade foi reduzida para 1%, enquanto a viabilidade da amostra tratada com NPs de TiO₂ foi de 94% ($\pm 3,0$). Após 60 min de exposição às NPs de TiO₂, observou-se que a viabilidade diminuiu em comparação com o tempo de 3 min, no entanto, a viabilidade foi superior a 50% (Choi et al., 2014a). Kim et al. apresentou resultados semelhantes. Eles demonstraram que após 3 min de exposição, o tratamento com 25 mg de NPs de TiO₂ levou à viabilidade de 96,3% ($\pm 2,4$), enquanto o KOH 8N reduziu a viabilidade para 9,8% ($\pm 1,6$). Após um tempo de exposição de 60 min, a viabilidade da amostra tratada com NPs de TiO₂ diminuiu para 85,3% ($\pm 3,9$) (Kim et al., 2016b)

Portanto, os dois estudos concluíram que as NPs de TiO₂ são não corrosivos, considerando que a viabilidade era maior que 50 e 15% após 3 e 30 min de exposição, respectivamente.

- **Fototoxicidade**

A avaliação da fototoxicidade das NPs de TiO₂ no modelo de pele equivalente foi realizada em dois artigos. Foram aplicados tempos variados de exposição, doses não tóxicas de UVA de 6 J/cm² (Park et al., 2011) e 40 J/cm² (Tang et al., 2018). Nos dois casos, a fototoxicidade foi avaliada pela redução da conversão mitocondrial de MTT em formazan. Os autores concluíram que as NPs de TiO₂ não exibiram fototoxicidade no modelo de pele equivalente na presença de radiação UV.

3.4 Discussão

Com o avanço da nanotecnologia, muitos produtos com materiais em nanoescala foram introduzidos em diversas áreas, como cosméticos, alimentos, medicamentos e eletrônicos (Louro et al., 2019; Lüderwald et al., 2019). Portanto, a exposição a nanomateriais está em crescimento exponencial e pode ocorrer tanto durante a síntese quanto no uso do produto. Devido à maior relação área/volume da superfície, as NPs se tornam mais (bio) reativas em comparação com os materiais a granel normal, dando origem a preocupações sobre a seu potencial toxicidade para os seres humanos (Sharifi et al., 2012; Shi et al., 2013a). As NPs de TiO_2 são amplamente utilizadas nas indústrias de cosméticos, especialmente em filtros solares como uma alternativa aos absorvedores químicos disponíveis de UV (ácido p-aminobenzóico e benzofenonas) que causam algumas reações alérgicas e/ou perturbações endócrinas. O dióxido de titânio possui três estruturas cristalinas diferentes (anatase, rutilo e brookita), no entanto, o rutilo é o mais utilizado em cosméticos, devido ao seu alto índice de refração, protegendo a pele dos efeitos nocivos dos raios ultravioleta (Martirosyan & Schneider, 2014). A Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC) classificou o dióxido de titânio como um possível agente cancerígeno humano (grupo 2B), no entanto, não há distinção quanto ao tamanho do titânio (macro, micron e/ou nanoescala). A heterogeneidade das nanopartículas de TiO_2 (distribuição granulométrica; aglomeração e agregação; morfologia, estrutura cristalina, pureza) para aplicações de filtro solar é elevada, tornando-se fortemente debatido o risco das NPs de TiO_2 (Jacobs et al., 2010).

Há muito tempo, as indústrias cosméticas estavam testando seus produtos usando testes de corrosão e irritação da pele em coelhos OCDE (OCDE, 2015). No entanto, por questões éticas (princípio dos 3Rs – Substituição, refinamento e redução de ensaios em animais), restrições científicas e econômicas para o desenvolvimento de tecidos 3D de bioengenharia da pele (Alépée et al., 2019; Caddeo et al., 2017; Liu et al., 2018; Salamanna et al., 2016) são utilizados para testar novos produtos farmacêuticos.

As principais vantagens dos tecidos 3D de bioengenharia são sua relevância fisiológica, uma vez que recapitulam o microambiente do tecido, maior reprodutibilidade

em comparação com modelos *ex vivo*, potencial preditivo superior devido ao possível uso de células humanas, juntamente com a diminuição de custos e preocupações éticas (Gholobova et al., 2018; Sarmiento, Andrade, Baptista, et al., 2012). Construções de pele de elevada qualidade (que imitam a morfologia, composição lipídica e diferenciação da pele humana nativa) estão disponíveis comercialmente.

As construções de pele equivalente disponíveis atualmente ainda não contêm todos os tipos de células essenciais (células dendríticas e macrófagos), nem integram vasos sanguíneos, nem a interferência dinâmica entre epitélio e tecido conjuntivo, essenciais para regular a morfogênese e homeostase epidérmica. Isso reforça a necessidade de construções 3D mais complexas que possam abordar estudos toxicológicos complexos. Atualmente, a principal estratégia é usar técnicas de biofabricação, como a eletrofiação e a bioimpressão, para desenvolver modelos biológicos cutâneos relevantes constituídos por tipos celulares especializados (melanócitos, adipócitos, Langherans, imunes, células-tronco, entre outros) com uma vasculatura perfundida que permite a liberação fisiológica de oxigênio e nutrientes (Mathes et al., 2014). O principal objetivo é alcançar um construto cutâneo 3D fisiológico relevante que possa ser usado para avaliação toxicológica de novas formulações cosméticas, mas também para o desenvolvimento de medicamentos anticâncer, por exemplo, reduzindo os estudos em animais.

Alguns artigos estudam o efeito do risco de NPs de TiO₂ em um modelo de pele tridimensional. Na literatura disponível, constatamos que para a avaliação do risco das NPs de TiO₂, os modelos mais utilizados são os modelos *in vitro* (células primárias e linhas celulares derivadas de diferentes órgãos/tecidos) e modelos *in vivo*. Os resultados sugerem que as NPs de TiO₂ induzem a liberação de EROs, levando à perda de funções celulares vitais, podendo levar à morte celular e se acumulam preferencialmente no fígado e baço (Carriere et al., 2016; Jacobs et al., 2010; Shi et al., 2013b; Tucci et al., 2013; Yuzhen Wang et al., 2015; Zhao et al., 2013)

Esta revisão sistemática demonstra que os modelos de pele equivalente utilizados mimetizam as propriedades histológicas, morfológicas, fisiológicas e

bioquímicas da epiderme humana. A confiabilidade desses estudos foi avaliada pelo ToxRTool e todos os 18 critérios avaliados por esta ferramenta são apresentados nas Tabelas S2–S8 (Informações Complementares). Esta tabela descreve uma simulação de um trabalho que atende a 100% dos critérios, bem como a avaliação realizada nos sete artigos selecionados (consulte a Tabela S1).

Como pode ser observado na Tabela 3, todos os artigos foram bem avaliados, no entanto, ao analisar a Tabela 4, observou-se a diversidade do desenho do estudo. Cada artigo trabalhou com a estabilidade das NPs de TiO₂ desconhecida, possivelmente possuindo aglomerados grandes e sedimentados, diferentes tempos de exposição, estruturas cristalinas e revestimentos de superfície, medidas diferentes para doses de exposição (massa, área ou número de partículas) que, na prática, resultam em dificuldade de conversão em um ao outro, bem como não caracterizou adequadamente o tamanho e a estabilidade das partículas durante a exposição celular.

Tabela 4. Extração de dados dos artigos selecionados

Autores	Park, Y. et al.	Choi, J. et al.	Kato, S. et al.	Horie, M. et al.	Miyani, V. A.; Hughes, M. F.	Kim, H. et al.	Tang, Y. et al.
Ano	2011	2014	2014	2016	2016	2016	2018
DOI	10.1016/j.jiv.2011.05.022	10.5620/ert.2014.29.e2014004	10.1166/jnm.2014.8719	10.1080/15378516.2016.1175530	10.1080/15569527.2016.1211671	10.5487/TR.2016.32.4.311	10.1016/j.tox.2018.05.010
Tipo de modelo de pele	Epiderm™	KeraSkin™	Desenvolvido no próprio laboratório	Epiderm™	Epiderm™	Epiderm™	Epikulis™
Substância teste	Nanopartículas de poliestireno e dióxido de titânio	Nanopartículas de óxido de zinco, dióxido de titânio e mistura (nanopartículas de óxido de zinco / dióxido de titânio)	Fullereno-C60 revestido com polivinilpirrolidona e nanopartículas de dióxido de titânio	Nanopartículas de dióxido de titânio	Nanopartículas de prata, dióxido de titânio e dióxido de cério	Nanopartículas de ferro, óxido de alumínio, óxido de titânio e prata	Nanopartículas de dióxido de titânio
Estrutura cristalina do TiO ₂	Mixture	Rutile	Rutile	Anatase and Rutile	Anatase, Rutile and Mixture	Mixture	Anatase, Rutile and Mixture
Tamanho primário de partícula	25 nm	21 nm	10 nm	Anatase: 6 nm and 7 nm; Rutile: 15 nm	Anatase: 25 nm and 142 nm; Rutile: 214 nm; mistura: 22 nm, 31 nm and 59 nm	21 nm	Anatase: 23 nm and 108 nm, Rutile: 121nm and Mistura: 31 nm, 52 nm and 55 nm
Tamanho do TiO ₂ após dispersão (agregado)	± 200 nm	39.4 ± 28.6 nm	Não descrito	Anatase: 252.1 nm and 323.2 nm; Rutile: 276.4 nm and 318.4 nm	Não descrito	Várias centenas de nm de tamanho	Anatase: 912 nm and 410 nm, Rutile: 121nm and Mistura: 2312 nm, 246 nm and 249 nm
Método de análise	Teste de irritação cutânea; teste de fototoxicidade cutânea	Teste de corrosão cutânea; Teste de irritação cutânea; Ensaio de citocinas e histopatologia	Geração intracelular de ROS e hidroperóxidos lipídicos	Ensaio de lactato desidrogenase, ensaio de imunoborção enzimática IL-8 e expressão relativa do gene HO-1; Teste de irritação da cutânea	Teste de irritação da cutânea	Teste de corrosão cutânea; Teste de irritação cutânea; Ensaio de IL-1α e histopatologia	Teste de fototoxicidade
Concentração de TiO ₂	100 µg/mL	25% em água deionizada	15 µg/mL	100 µg/mL	1 ng/mL	A superfície da epiderme foi umedecida com água desionizada e 25 mg da substância de teste foram adicionados	100 µg/mL
Tempo de exposição	1 hora	3 minutos e 1 hora	3 horas	4 horas	1 hora	3 minutos e 1 hora	2 horas
O resultado esperado dos controles positivo e negativo foi observado?	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Avaliação de resultados de corrosão e/ou irritação e fototoxicidade	A citotoxicidade e a fototoxicidade foram avaliadas como uma porcentagem do controle negativo. No entanto, o controle negativo exibiu a viabilidade> 50%.	Corrosão: O artigo usa OECD TG431 como referência, que diz que o material de teste é considerado corrosivo para a pele se a viabilidade for <50% após 3 min de exposição. No entanto, embora a viabilidade após 3 min de exposição seja ≥ 50%, é corrosivo se a viabilidade for <15% após 60 min de exposição. Portanto, o material não é corrosivo se a viabilidade for ≥ 50% após 3 min de exposição e ≥ 15% após 60 min de exposição. Irritação: O artigo usa OECD TG439 como referência, que afirma que o material de teste é considerado irritante para a pele se a viabilidade do tecido após a exposição / pós-incubação for ≤ 50%, e não é irritante se a viabilidade for > 50%.	Avaliação da indução da geração de ROS ao redor do exterior dos núcleos e peroxidação da membrana celular na epiderme por microscopia eletrônica.	Irritação: O artigo usa OECD TG439 como referência, que afirma que o material de teste é considerado irritante para a pele se a viabilidade do tecido após a exposição / pós-incubação for ≤ 50%, e não é irritante se a viabilidade for > 50%.	Em relação ao teste de irritação, o material de teste é considerado irritante para a pele se a viabilidade do tecido após exposição / pós-incubação for menor ou igual a 50%. Não seria irritante se a viabilidade fosse superior a 50%.	Corrosão: O artigo usa OECD TG431 como referência, que diz que o material de teste é considerado corrosivo para a pele se a viabilidade for <50% após 3 min de exposição. No entanto, embora a viabilidade após 3 min de exposição seja ≥ 50%, é corrosivo se a viabilidade for <15% após 60 min de exposição. Portanto, o material não é corrosivo se a viabilidade for ≥ 50% após 3 min de exposição e ≥ 15% após 60 min de exposição. Irritação: O artigo usa OECD TG439 como referência, que afirma que o material de teste é considerado irritante para a pele se a viabilidade do tecido após a exposição / pós-incubação for ≤ 50%, e não é irritante se a viabilidade for > 50%.	A substância de teste foi considerada fototóxica se os tecidos expostos aos UVA revelassem uma diminuição da viabilidade superior a 25% quando comparada com o controle no escuro.
Conclusão principal	Nanopartículas de poliestireno e dióxido de titânio não exibiam irritação cutânea e fototoxicidade.	Para todos os materiais de teste usados neste estudo foram considerados não corrosivos e não irritantes; Os resultados foram confirmados por IL-1α e análise histopatológica.	Observou-se que a irradiação UV de 8 J/cm ² na presença de TiO ₂ 15 ppm induziu a geração de ROS ao redor do exterior do núcleo e peroxidação lipídica da membrana celular na epiderme. No entanto, o tratamento com C60/PVP ou C60/Son suprimiu ROS intracelular e peroxidação lipídica e, posteriormente, a potência fototóxica catalisada por TiO ₂ foi reprimida de uma forma dependente da dose de C60.	A irradiação UVA não afetou o vazamento de LDH ou a secreção de IL-8 no meio de cultura, pois não foi observado aumento na expressão de HO-1, independente do tipo de nanopartícula de TiO ₂ .	As nanopartículas de prata, cério e titânio testadas podem ser classificadas como não irritantes.	Para todos os materiais de teste usados neste estudo foram considerados não corrosivos e não irritantes; Os resultados foram confirmados por IL-1α e análise histopatológica.	Para todos os materiais de teste usados neste estudo foram considerados não corrosivos e não irritantes; Os resultados foram confirmados por IL-1α e análise histopatológica.

Dos 7 artigos analisados, seis deles concluíram que as NPs de TiO_2 são não irritantes, corrosivos e não fototóxicos (Choi et al., 2014b; Kato et al., 2014; Kim et al., 2016b; Miyani & Hughes, 2017; Park et al., 2011; Tang et al., 2010). O que se verificou foi que, nos seis artigos analisados, a toxicidade das NPs de TiO_2 foi avaliada por meio do ensaio MTT, que é relatado na literatura por interferir com NPs de TiO_2 (Kroll & Hendrik, 2012; Ong et al., 2014). A interferência das NPs de TiO_2 é atribuída às propriedades de adsorção de luz da NP na mesma região espectral usada pelo MTT (Holder et al., 2012; Kroll & Hendrik, 2012; Ong et al., 2014). No entanto, as NPs também se adsorvem na superfície das células impedindo a transformação adequada das moléculas do ensaio, podendo ocorrer reações químicas entre as NPs e os compostos teste e até a liberação de íons metálicos das NPs podem modificar a atividade catalítica mitocondrial das células, alterando a leitura do MTT (Kroll et al., 2009).

Alguns autores relataram que a interferência aumenta com o aumento da concentração de NPs (Holder et al., 2012; Kroll & Hendrik, 2012; Ong et al., 2014), e enfatizam que é necessário usar concentrações de NPs que não reduzam o MTT. É importante ressaltar que, nos últimos anos, foram introduzidas extensas etapas de lavagem nos protocolos e a possível interferência das NPs de TiO_2 no ensaio MTT foi reduzida e, em alguns casos, eliminada (Kroll & Hendrik, 2012; Ong et al., 2014).

No entanto, deve-se tomar muito cuidado, pois mesmo com várias lavagens ou centrifugações, as NPs de TiO_2 podem permanecer aderidas à placa de cultura ou até adsorvidos na superfície das células. A contribuição das NPs para o sinal de absorção de luz do MTT depende também da concentração de MTT-formazan reduzido presente nas misturas MTTred/MTTox, sugerindo diferentes mecanismos de interferência que não podem ser previstos a priori (Kroll & Hendrik, 2012). Parece que metais redox-ativos com diferentes tamanhos e revestimentos podem alterar a magnitude da cinética da reação, causando diferentes níveis de interferência (Mello et al., 2020). A Figura 6 mostra um esquema de interferência de NP com o ensaio de MTT. Como é possível observar, as propriedades das NPs podem gerar artefatos e interpretações errôneas dos resultados (Guadagnini et al., 2015b; Holder et al., 2012; Kroll & Hendrik, 2012; Lammel & Sturve, 2018; Lupu & Popescu, 2013; Ong et al., 2014). Um artigo recente demonstrou que as

NPs de TiO_2 adsorvidos na superfície celular e aqueles internalizados pelas células interferem na leitura da fluorescência ao refletir/absorver parte do incidente e emitir luz (Lammel & Sturve, 2018). Isso adiciona uma nova complexidade à avaliação de risco das NPs, pois cada característica específica do tipo de célula influencia a internalização das NPs, o tráfego intracelular e o destino final.

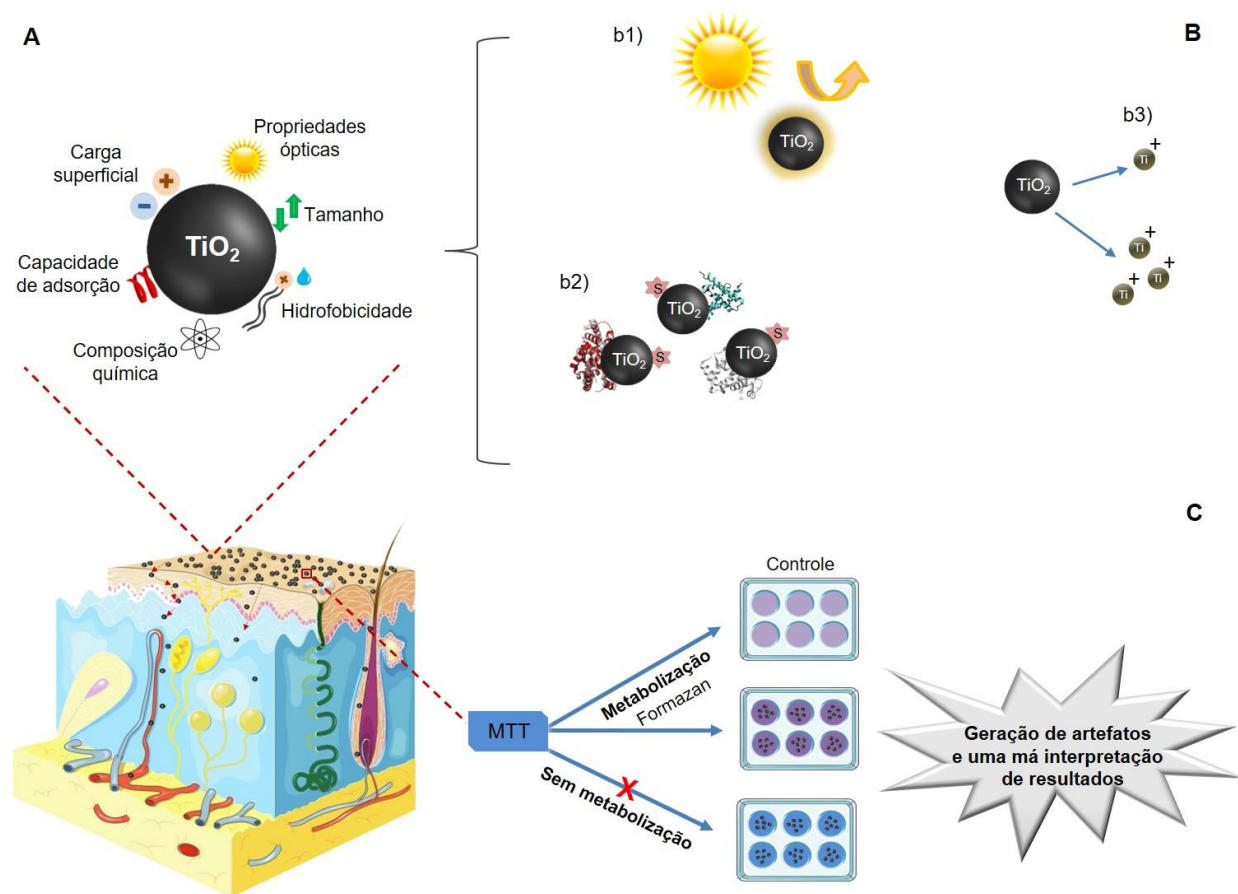


Figura 6. Esquema de ensaios toxicológicos. A) Características físico-químicas das NPs de TiO_2 que possivelmente interferem nos ensaios biológicos; que incluem B) capacidades ópticas das NPs de TiO_2 , como absorvância intrínseca e/ou fluorescência (b1); adsorção de proteínas, sais e corantes nas NPs (b2); e dissolução de NPs com a consequente liberação de íons metálicos no sobrenadante (b3). C) Teste convencional de MTT analisando NPs de TiO_2 , demonstrando que as NPs podem adsorver o corante MTT, evitando a metabolização dos reagentes. Imagem adaptada de: <https://smart.servier.com>

Além do MTT, outros ensaios biológicos interferem com as NPs de TiO₂ (consulte a Tabela S9 nas Informações Complementares). Também foi relatado que o ensaio de lactato desidrogenase (LDH) interfere com as NPs de TiO₂, uma vez que elas podem adsorver ou inativar a proteína LDH (Holder et al., 2012; Kroll & Hendrik, 2012), bem como o Vermelho neutro (NR) (Guadagnini et al., 2015b), ensaio de Alamar Blue (Lammel & Sturve, 2018; Ong et al., 2014), ensaio de 5-carboxifluoresceína diacetateacetoximetil éster (CFDA-AM) (Lammel & Sturve, 2018) e 2',7'diclorofluoresceína (DCF) (Kroll & Hendrik, 2012). Além disso, as interferências podem ser cumulativas quando, por exemplo, dois ensaios fluorométricos são utilizados nas mesmas células para quantificar um ponto final único.

A avaliação da toxicidade das NPs de TiO₂ não é uma questão trivial. Portanto, os pesquisadores precisam usar sempre que possível protocolos validados para testes de irritação da pele, corrosão e fototoxicidade com modelos de pele equivalente. Deve-se aplicar concentrações que imitam situações reais, mas ao mesmo tempo concentrações abaixo dos níveis de interferência. Sempre que é possível, introduzir centrifugação, várias lavagens ou até mesmo remover os sobrenadantes são abordagens recomendadas para reduzir a interferência. Acreditamos que, com procedimentos eficazes de lavagem, podemos esperar que as NPs não possam interagir de maneira eficaz e suficiente com o MTT, de maneira que não possa alterar significativamente os resultados, no entanto, precisamos levar em consideração que essa abordagem introduz outra preocupação com a caracterização da exposição e as métricas de dose aplicadas. As retomadas das adaptações dos ensaios devem ser verificadas caso a caso, com uma série de experimentos de controle para cada NP para obter dados confiáveis sobre a nanotoxicidade. Sugerimos também a realização de testes complementares, como avaliação de citocinas, histopatologia e avaliação da integridade da membrana celular, através da detecção da resistência elétrica transepitelial (TEER), sempre trabalhando com controles específicos.

Há muito tempo, a comunidade de nanotoxicologia abordava questões técnicas, como questões de dosagem, estado de agregação dos materiais em função do tempo. Acreditamos que para fornecer uma avaliação realista dos riscos das NPs, é necessário identificar as principais características físico-químicas que podem prever resultados toxicológicos, trabalhar com condições de exposição que imitam uma situação real e caracterizar as NPs e suas interações com sistemas biológicos (exemplo: proteína corona, sua capacidade transformacional no sistema biológico). Alterações muito sutis nas propriedades das NPs podem alterar completamente a proteína corona que é absorvida pelas NPs, resultando em mudanças surpreendentes *in vivo*. Como o grau de interferência pode ser relevante, dependendo das propriedades ópticas das NPs, da estabilidade da NP, dos testes de citotoxicidade e do tipo de teste de ponto de extremidade fluorométrico, recomenda-se o uso de mais de um ensaio *in vitro* (por exemplo, a citometria de fluxo é considerada o método com menos interferência com as NPs), especificamente com diferentes métodos de detecção e usar controles adequados (como controles negativos, seria aconselhável testar separadamente os agentes dispersantes usados como estabilizadores das NPs nas mesmas condições). Materiais de referência adequados são necessários em estudos toxicológicos e devem ser feitos esforços para avaliar mais do que a viabilidade celular (ex: ciclo celular) (Singh et al., 2019).

3.5 Conclusão

Considerando os dados obtidos por essa revisão sistemática, as NPs de TiO₂ foram consideradas não irritantes, corrosivas e não fototóxicas no modelo de pele equivalente, independentemente do tipo cristalino e do tamanho das NPs estudados. Podemos concluir que os modelos de pele equivalente podem ser usados para testar o efeito do risco das NPs de TiO₂, no entanto, enfatizamos a necessidade de protocolos padronizados com procedimentos de lavagem eficientes para remover as NPs da superfície do modelo de pele equivalente, com o intuito de evitar possíveis interferências das NPs de TiO₂ com o ensaio.

CAPÍTULO II

Desenvolvimento de modelo de epiderme humana reconstruída

4. Capítulo II: Desenvolvimento da epiderme reconstruída

4.1 Introdução

Como se sabe, a pele é a barreira mais externa entre o corpo humano e o meio ambiente e, portanto, está diariamente exposta a diferentes substâncias. Os produtos cosméticos são frequentemente aplicados na pele, e o potencial de um produto ou ingrediente causar irritação ou corrosão na pele deve ser cuidadosamente avaliado como parte do processo geral de avaliação de segurança (Díez-Sales, et al., 2018).

Avaliar a segurança de um produto cosmético não é trivial, pois depende de como esse produto é utilizado pelo consumidor, e isso influencia diretamente na quantidade de substância que pode ser absorvida pela pele ou mucosa. Foi observado que devido ao impacto irritante de alguns produtos ou substâncias, concentrações muito altas geram reações falso-positivas e podem potencialmente sensibilizar os consumidores, enquanto concentrações muito reduzidas causam resultados falso-negativos (Nigam et al., 2009; Vaibhav et al., 2021; Luz et al., 2022).

Na Europa, os cosméticos são avaliados quanto à segurança com base na avaliação de cada ingrediente individual. De acordo com o Artigo 3 do Regulamento de Cosméticos, um produto cosmético disponível para compra deve ser seguro para a saúde humana quando usado em condições normais ou razoavelmente previsíveis (Vinardell MP and Mitjans M, 2017).

Uma das responsabilidades do Comitê Científico de Segurança do Consumidor (SCCS) é recomendar um conjunto de diretrizes para que as indústrias de cosméticos considerarem ao desenvolver estudos para uso na avaliação de segurança de substâncias cosméticas (Vinardell MP and Mitjans M, 2017).

Na década de 1980, com o intuito de avaliar se essas substâncias poderiam causar irritação dérmica, foi desenvolvido o teste Draize, que é um teste in vivo que utiliza coelho (Draize, J, et al., 1944). Esse teste foi implementado como teste diretriz 404 na

Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) (OECD, 1988), e na década de 1990, também foi incluído nas normas ISO 10993 (ISO, 2010). Entretanto, devido às limitações dos resultados quando comparado com humanos, e principalmente devido as preocupações em relação ao bem-estar animal, o teste Draize foi progressivamente substituído por métodos alternativos *in vitro*, com o intuito de reduzir, refinar e substituir a experimentação animal (Russell, et al., 1959; Percie et al., 2020). A partir de março de 2013, foi oficialmente banido a utilização de animais para testar produtos cosméticos, na União Europeia. Desde então, as empresas dessa área têm o desafio de desenvolver seus produtos sem utilizar os tradicionais estudos toxicológicos em animais.

Como método alternativo, foram então desenvolvidos os modelos de pele equivalente, que mimetizam as propriedades histológicas, morfológicas, bioquímicas e fisiológicas das diferentes camadas da pele humana (Debels, et al., 2015; Caddeo e Sartori, 2017).

Em 2010, foi desenvolvido pela OECD, o guia de irritação cutânea em modelos de epiderme humana reconstruída (Reconstructed Human Epidermis – RhE) (OECD - TG 439). Esse guia, preconiza o potencial irritante baseado na viabilidade dos tecidos utilizando o ensaio de MTT. Desde a sua criação, alguns modelos foram validados e são comercializados, seguindo os requisitos de qualidade e reprodutibilidade, como os modelos da EpiSkin™ (EpiSkin Research Institute, Lyon, França), SkinEthic™ (EpiSkin Research Institute), EpiDerm™ (MatTech Co., Ashland, MA, EUA), entre outros (Moniz, et al., 2020).

No Brasil, um importante passo foi dado quando a Sociedade Científica Brasileira e o Congresso Nacional se empenharam para termos um marco regulatório de proteção aos animais para fins científicos. Atualmente, ainda existe uma grande burocracia em relação a importação de tecidos comerciais, e no Brasil, o único modelo comercializado é o modelo de RHE da EpiSkin, no entanto, eles utilizam lotes de células importadas para a sua produção. Portanto, é de extrema importância não dependermos dos modelos importados, e sim termos a competência nacional de produzir os nossos próprios

modelos. Precisamos ser capacitados em disseminar o conhecimento na temática de métodos alternativos ao uso de animais, assim como ofertar, no âmbito dos laboratórios integrantes da Rede, serviços para ensaios toxicológicos utilizando metodologias alternativas ao uso de animais. Protocolos internos para a construção desses modelos tridimensionais são necessários e vem sendo desenvolvidos por alguns grupos de pesquisa. Contudo, eles precisam ser validados para parâmetros específicos, como a irritação e corrosão (De Vecchi et al., 2018).

Assim, objetivamos implementar e avaliar a proficiência do modelo de epiderme humana reconstruída do Grupo Boticário em relação ao potencial de irritação, bem como utilizar esse modelo para avaliar a toxicidade de NPs de TiO₂.

4.2 Metodologia

4.2.1 Construção dos modelos de pele de espessura total e RHE

4.2.1.1 Construção do modelo de pele de espessura total (derme e epiderme)

Culturas primárias de fibroblastos dérmicos humanos e de queratinócitos dérmicos humanos foram utilizados. No treinamento fornecido pelo Grupo Boticário, as células utilizadas foram fornecidas por Cascade Biologics. Quando as peles foram desenvolvidas no INMETRO, foram utilizados lotes de células cedidas pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ).

Após descongelamento, os fibroblastos foram mantidos em meio de cultivo DMEM (Meio Eagle modificado por Dulbecco, Gibco), suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino, Gibco) e os queratinócitos foram mantidos em meio Epilife (Gibco) suplementado com os fatores de crescimento para queratinócito, e ambas as culturas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

Para a construção do modelo de espessura total, foi realizada a expansão das células até a passagem 5, após o descongelamento. Em seguida, foi realizada a formação da derme e posteriormente da epiderme, como mostrado na figura 7. As peles foram nutridas por meio de diferenciação e mantidas na interface ar-líquido por 11 dias para que estivessem em condições adequadas para a realização do teste de irritação cutânea *in vitro*. Todos os experimentos de pele de espessura total foram realizados em triplicata.

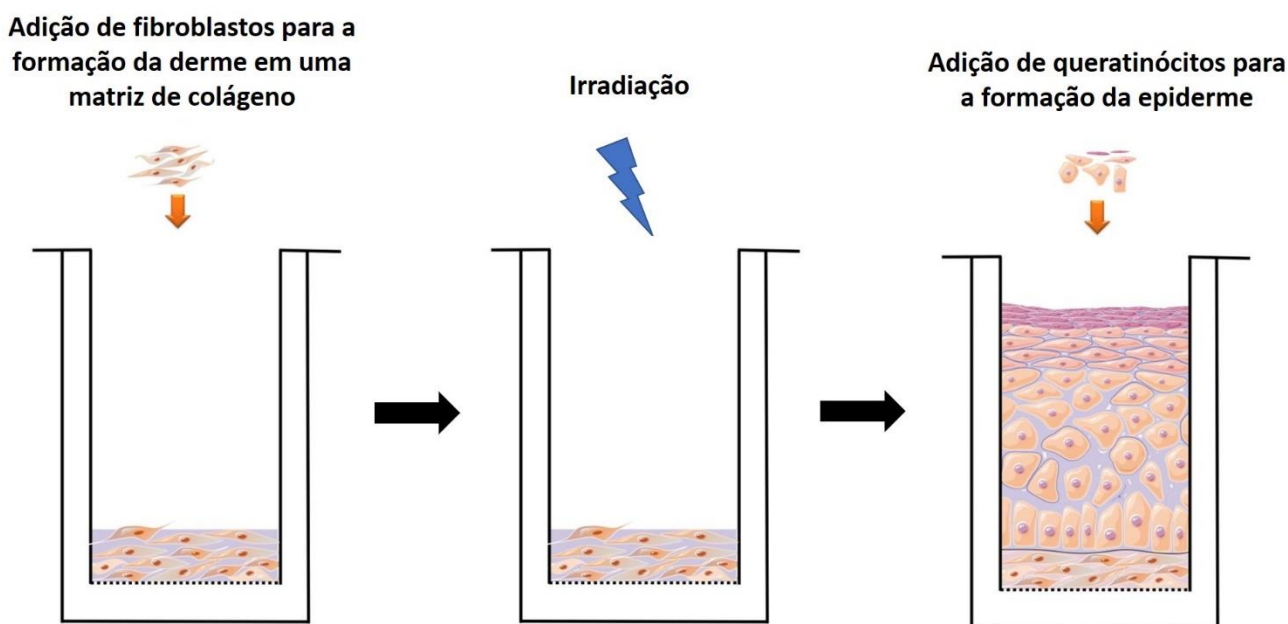


Figura 7. Esquema da construção do modelo de pele equivalente

Imagem adaptada de: <https://smart.servier.com>

4.2.1.2 Construção do modelo de epiderme humana reconstruída (RHE)

O modelo de RHE foi produzido utilizando queratinócitos primárias de 3 diferentes empresas. Foram utilizados 4 lotes de células cedidas pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), codificadas como nh-skp-KT0084, nh-skp-KT0090, nh-skp-KT0015 e nh-skp-KT0009, 2 lotes de células adquiridas da Gibco (ref: C0015C, lote: 2437268) e 1

lote de células cedidas pela Faculdade de Medicina de Petrópolis/UNIFASE, codificada como hKT MB 04. Todas as células ficaram acondicionadas em ampolas para congelamento e mantidas em nitrogênio líquido. Após descongelamento, as células foram expandidas em frascos de cultura celular de 25 e/ou 75 cm².

O meio de cultura KGM (Meio de crescimento para queratinócito, Lonza, Cat. 0000444755) suplementado com os fatores de crescimento para queratinócito, foram utilizados para cultivar os queratinócitos cedidos pelo BCRJ e pela UNIFASE, e para cultivar os lotes de queratinócitos adquiridas da Gibco, foi utilizado o meio EPILIFE (Meio de crescimento para queratinócito, Gibco, Cat. 232345). Após plaqueadas, as células foram mantidas em uma incubadora umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂, à temperatura de 37°C.

A avaliação de senescência foi realizada utilizando o kit de coloração histoquímica de células senescentes da Sigma (Cat. CS0030). Todas as imagens de morfologia celular em monocamada foram obtidas em um microscópio óptico invertido (Nikon Eclipse TS100), utilizando o programa de imagens (Leica Applications Suites – LAS EZ). As imagens de histologia do modelo pele foram obtidas em um microscópio óptico invertido da Zeiss Axiovert, utilizando o programa Zeiss AxionVision.

Para análises histológicas, os tecidos foram fixadas com formaldeído 4%, emblocados em parafina e as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina.

4.2.2 – Teste de irritação segundo o TG 439 da OECD

Para a realização do teste de irritação cutânea, o protocolo da OECD 439: *In vitro skin irritation: reconstructed human epidermis test method*, 2019, foi utilizado como base. O teste de irritação foi feito utilizando as 10 substâncias químicas descritas pelo Guia da OECD 439. Como controle positivo foi utilizado o Dodecil sulfato de sódio (SDS), e como controle negativo a Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS), e a pele sem tratamento. Para as substâncias líquidas, foram utilizados um volume fixo de 40uL, e para as substâncias sólidas foram utilizados 10mg sobre a superfície de cada pele

reconstruída (RHS), nas peles sem tratamento, foi adicionado apenas água deionizada. Após 42 minutos de exposição, as peles foram cuidadosamente lavadas com pelo menos 20mL de PBS. O PBS foi totalmente removido com o auxílio da pipeta, e o meio de pele da parte inferior foi trocado, e as peles foram incubadas por mais 42 horas.

A viabilidade celular foi avaliada com o indicador MTT (Thiazolyl Blue Tretazolium Bromide - Sigma). A solução de MTT (500 µL) na concentração de 1 mg/mL, foi adicionado em cada poço e mantido em contato com as peles por 3 horas, na ausência de luz, a 37°C e 5% de CO₂. Após incubação, a epiderme foi imediatamente acondicionada em Isopropanol (Merck) durante 16-18 horas, sob refrigeração. A leitura da absorbância foi mensurada em 570nm utilizando um espectrofotômetro (SoftMax Pro 5.4). O percentual de viabilidade celular para cada amostra testada foi calculado em relação ao controle sem tratamento. A substância foi considerada não irritante se viabilidade celular em relação ao controle fosse $\geq 50\%$, e a substância foi considerada irritante se a viabilidade celular em relação ao controle fosse $< 50\%$.

4.2.3 Avaliação da toxicidade de NPs de TiO₂

4.2.3.1 Análise do potencial de irritação e citotoxicidade de NPs de TiO₂

Os testes de irritação e de citotoxicidade foram feitos utilizando duas diferentes concentrações de NPs de TiO₂, 10 µg/mL e 100 µg/mL. Como controle positivo foi utilizado o Dodecil sulfato de sódio (SDS), e como controle negativo a Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS), e a pele sem tratamento. Foram adicionados um volume fixo de 40uL de cada amostra sobre a superfície do modelo de pele humana reconstruída (RHS), nas peles sem tratamento, foi adicionado apenas água deionizada. Para avaliação do potencial de irritação foi utilizado um tempo de 42 minutos de exposição, enquanto para a avaliação da citotoxicidade, foi utilizado um tempo de 48 horas de exposição de NPs. Após esses tempos, as peles foram cuidadosamente lavadas com

pelo menos 20mL de PBS. O PBS foi totalmente removido com o auxílio da pipeta, e o meio de pele da parte inferior foi trocado, e as peles foram incubadas por mais 42 horas.

A viabilidade celular foi avaliada da mesma forma como descrito na sessão 4.2.2. Esse estudo foi realizado em triplicata de pele, de um único experimento (modelo de RHE construída com o lote de células cedido pela UNIFASE).

4.2.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para o preparo das amostras para visualização no MEV, foi utilizado como substrato condutor o ouro. Inicialmente, os modelos de RHE construída com o lote de células cedida pela UNIFASE, e expostas a NPs de TiO₂ por 48 horas, foram aderidas em fita de carbono no suporte de amostras para MEV (*stubs*). As amostras foram observadas em um Microscópio Eletrônico de Varredura FEI Quanta FEG 450 (FEI, Eindhoven, Holanda), equipado com uma unidade EDS (EDAX), e operando com um potencial de aceleração de 10 kV. A identificação de elementos presentes na amostra foi realizada através do *software* Genesis (do sistema EDAX EDS).

4.3 Resultados

4.3.1 Treinamento para a construção do modelo de espessura total, com epiderme e derme (desenvolvida nos laboratórios do Grupo Boticário)

4.3.1.1 Avaliação da irritação cutânea *in vitro*

O primeiro modelo desenvolvido pelo Grupo Boticário foi o modelo de espessura total, com epiderme e derme. A análise do desempenho do modelo de espessura total pelo teste de irritação cutânea, pode ser realizada seguindo as diretrizes da OECD 439 (OECD No.439, 2019), que utiliza o ensaio de MTT, o qual permite observar e diferenciar

substâncias irritantes das potencialmente não irritantes. O princípio desse ensaio é medir a viabilidade celular do modelo de pele equivalente pela conversão enzimática do corante vital MTT em um sal de azul de formazana, que é medido quantitativamente após a extração dos tecidos. As substâncias químicas irritantes são identificadas por sua capacidade de diminuir a viabilidade celular em 50% ou mais, já as substâncias químicas que reduzem a viabilidade celular em menos de 50% são consideradas não irritantes.

Um teste preliminar de irritação foi realizado em triplicata utilizando três grupos experimentais: o controle positivo (SDS 5%), controle negativo (HBSS) e sem tratamento. Observamos que o modelo de pele equivalente tratado com o controle positivo não foi capaz de converter o MTT em azul de formazana. Por outro lado, as peles sem tratamento ou expostas à substância não irritante, o HBSS, produziram a formazana e apresentaram coloração arroxeadas, como é possível observar na figura 8A. Esses resultados foram confirmados pela porcentagem da viabilidade celular e pelas imagens histológicas (Figura 8B e 8C). Os valores de viabilidade foram normalizados em relação ao controle sem tratamento.

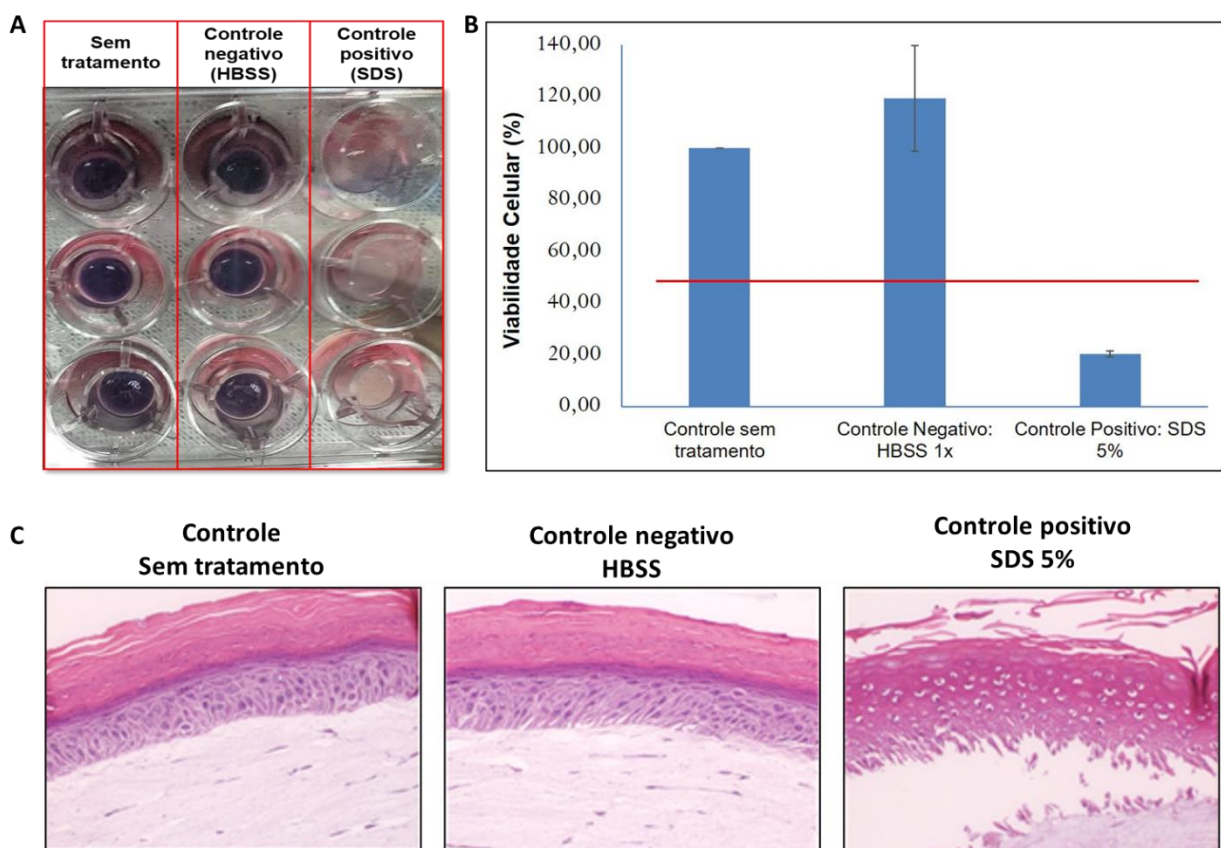


Figura 8. Modelo de pele de espessura total (epiderme e derme) desenvolvida nos laboratórios do Grupo Boticário(A) Imagem fotográfica dos modelos de pele de espessura total após o teste de irritação utilizando o indicador MTT. (B) Porcentagem da Viabilidade celular após o tratamento com os controles (negativo e positivo), normalizados em relação ao controle sem tratamento. A linha em vermelho indica o limiar entre as substâncias que são consideradas não irritantes (maior que 50%) ou irritantes (menor que 50%). (C) Imagens de histologia.

Nas imagens histológicas, é possível observar a morfologia dos modelos de pele nos controles testados. No controle sem tratamento e no controle positivo a morfologia da pele está intacta, com uma epiderme e derme estratificada e bem diferenciada, enquanto no controle negativo pode-se observar uma epiderme e derme totalmente afetada.

Esses resultados confirmam que o modelo de espessura total respondeu de forma satisfatória ao teste de irritação, conseguindo distinguir, adequadamente, a substância não irritante da irritante.

4.3.2 Construção do modelo de pele de espessura total nos laboratórios do INMETRO

O primeiro passo para a construção do modelo de pele equivalente é descongelar e expandir as células para que se tenha um número total de células suficientes para a construção do modelo. Como mencionado, os fibroblastos foram cultivados em meio DMEM High suplementado com 10% de SFB, enquanto os queratinócitos foram cultivados utilizando o meio KGM suplementados com os fatores de crescimento para queratinócitos. Através das imagens de microscopia óptica foi possível observar que as culturas estavam viáveis, com uma boa morfologia e com uma boa capacidade proliferativa. Os fibroblastos mantiveram uma morfologia alongada característica e os queratinócitos estavam fusiformes e proliferativos (figura 9).

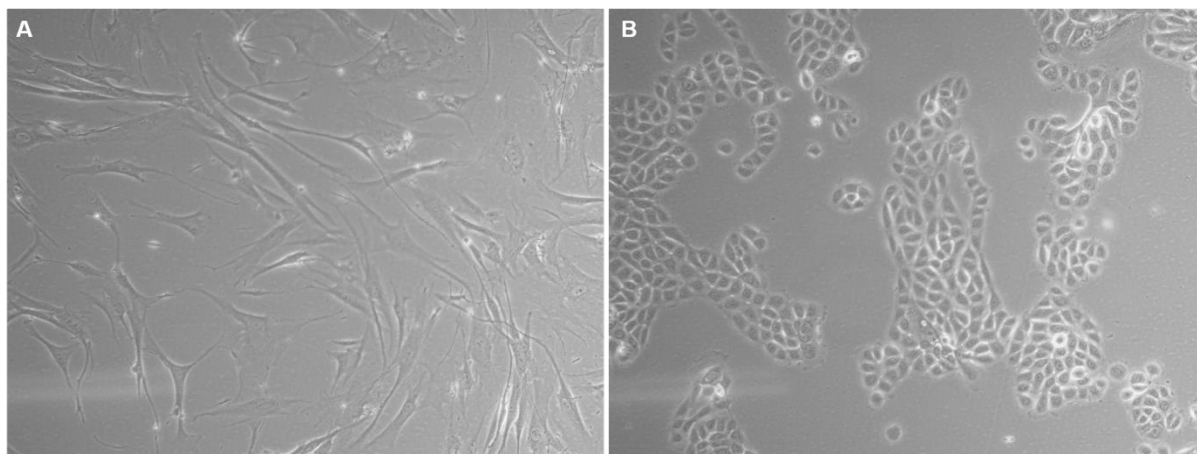


Figura 9. Imagens das culturas de células em monocamada, obtidas por microscopia óptica. (A) Fibroblastos e (B) queratinócitos.

Após expansão celular, a primeira etapa para a formação da pele é a construção da derme. Os fibroblastos são adicionados em placas de 12 poços contendo *transwell*, e são levados para uma etapa de irradiação UV, utilizando um comprimento de onda fixo de 340 nm, com o intuito de controlar o crescimento dos fibroblastos e reduzir a contração do colágeno. A epiderme é construída acima da derme com a adição dos queratinócitos,

e são necessários de 10 a 12 dias para a formação completa da pele. Em seguida, os modelos de peles foram lavados para a histologia para confirmarmos se a construção do modelo de pele de espessura total foi realizada com sucesso. Uma amostra foi fixada em parafina e a outra foi fixada por criopreservação, para tentarmos observar por qual protocolos os cortes ficariam melhor (figura 10).

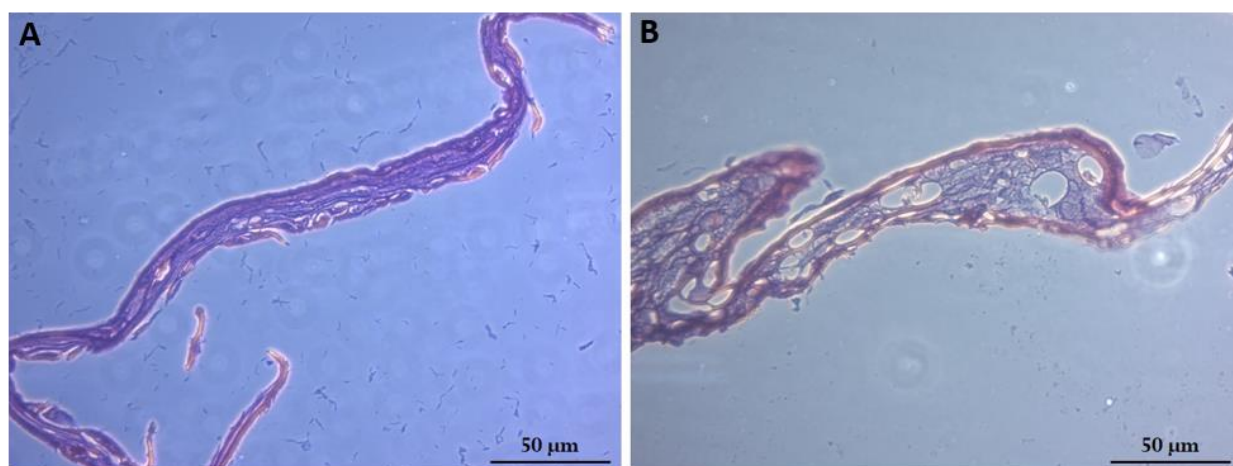


Figura 10. Imagem de histologia dos modelos de pele de espessura total desenvolvida nos laboratórios do INMETRO (A) Fixado por parafina e por (B) criopreservação.

Como observado nas imagens de histologia, em ambos os casos a pele não estava totalmente formada, e aparentemente só houve formação da epiderme. Por esse motivo, começamos a investigar qual poderia ter sido o problema para a não formação da pele, uma vez que todas as etapas foram realizadas. Após algumas investigações, descobrimos que o problema não estava na manipulação e sim na etapa de irradiação das amostras no UV. Aparentemente o nosso equipamento (Q-Sun) tinha sido ajustado de forma correta, no entanto, descobrimos que ele apresenta um comprimento de onda fixo em 340nm e a do Grupo Boticário trabalha com um espectro total de 300 a 800nm (Sun-test). Por esse motivo, não conseguimos dar continuidade a construção da pele utilizando o nosso equipamento.

4.3.3 Construção do modelo de epiderme humana reconstruída (RHE) nos laboratórios do INMETRO e avaliação da proficiência em relação ao potencial de irritação

No período em que estávamos fazendo nossos testes, o Grupo Boticário desenvolveu um modelo de pele só com epiderme (epiderme humana reconstruída - RHE). Esse modelo, além de ter um custo reduzido por utilizar apenas um tipo celular, é o modelo recomendado pela OECD 439 para testes de irritação. Como esse modelo não apresentava a camada dérmica, consequentemente não precisava da etapa de irradiação. Desta forma, o Grupo Boticário fez a transferência de tecnologia deste modelo, para verificarmos a eficiência do modelo em relação ao seu potencial de irritação. Na primeira tentativa da construção do modelo de RHE, foram feitas apenas 5 peles, com o intuito de avaliar a pele por histologia (2 peles) e fazer um teste preliminar de irritação apenas com controles: controle negativo (PBS), controle positivo (SDS) e sem tratamento (figura 11).

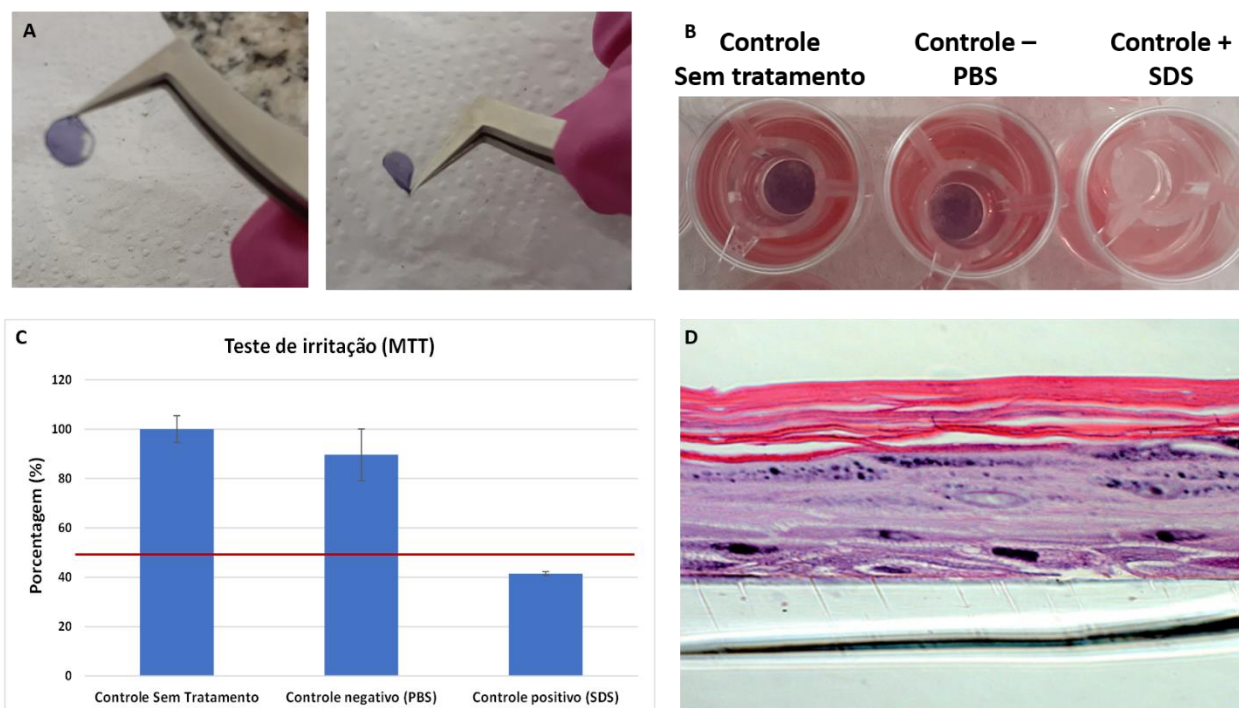


Figura 11. Primeiro modelo de epiderme humana reconstruída (RHE) desenvolvida nos laboratórios do INMETRO. (A) Imagem das peles sem os insertos. (B) Imagem dos modelos de RHE após o teste de irritação utilizando o indicador MTT. (C) Viabilidade celular dos modelos de pele equivalente após o tratamento com os controles (negativo e positivo), normalizados em relação ao controle sem tratamento. A linha em vermelho indica o limiar entre as substâncias que são consideradas não irritantes (maior que 50%) ou irritantes (menor que 50%). (D) Imagem de histologia da RHE.

A imagem de histologia confirmou a construção de uma RHE com pelo menos 4 camadas de células e estrato córneo. Após esse ensaio piloto, conseguimos dar continuidade ao teste de proficiência do modelo RHE quanto ao potencial de irritação, seguindo o guia 439 da OECD. Na tabela 5 é possível observar as 10 substâncias químicas necessárias para demonstrar a proficiência do modelo, sendo 5 substâncias não irritantes e 5 irritantes.

Tabela 5. Substâncias químicas utilizados para proficiência do modelo.

	Número da Substâncias	Substância
Não Irritantes	1	Naphthalene acetic acid
	2	Isopropanol
	3	Methyl stearate
	4	Heptyl butyrate
	5	Hexyl Salicylate
Irritantes	6	Cyclamen aldehyde
	7	1-bromohexane
	8	Potassium hydroxide (5% aq.)
	9	1-methyl-3-phenyl-1-piperazine
	10	Heptanal

Os próximos modelos de RHE construídos, foram feitos em quantidades superiores para realização de experimentos completos de proficiência em relação ao potencial de irritação (10 químicos e controles) em triplicata. Vale ressaltar que nesta tabela se encontra a numeração de cada substância química que será utilizado nos resultados seguintes.

Na figura 12 está representado o primeiro teste de irritação completo, com as 10 substâncias químicas e com os controles (teste de irritação 1), mostrando a viabilidade dos modelos de RHE após 42 minutos de exposição às substâncias química, e a imagem de histologia do controle sem tratamento.

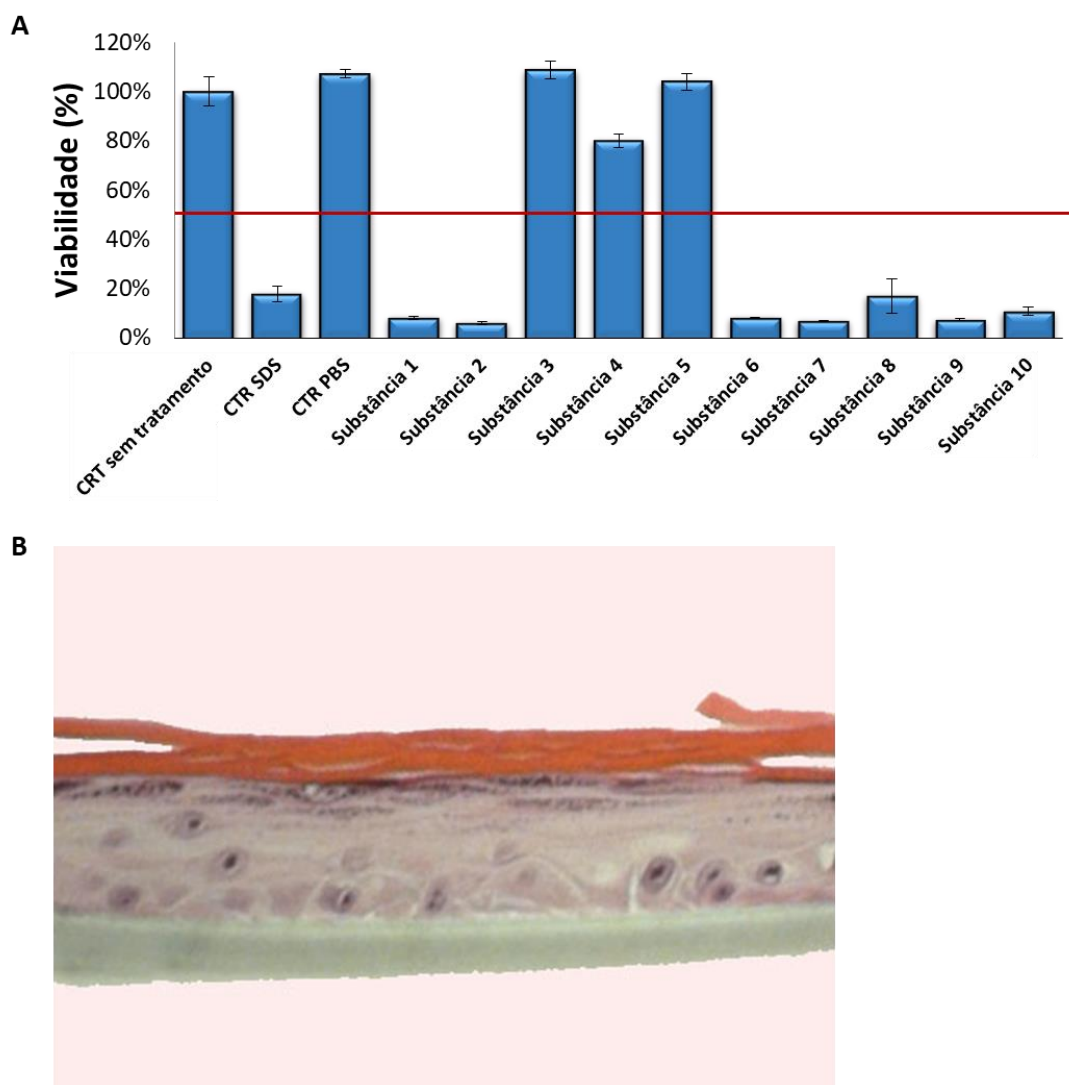


Figura 12. Teste de irritação¹. (A) Viabilidade celular dos modelos de RHE após o tratamento com as substâncias, por 42 minutos. A linha em vermelho indica o limiar entre as substâncias que são consideradas não irritantes (maior que 50%) ou irritantes (menor que 50%). (B) Imagem de histologia da RHE.

Como mencionado anteriormente, as substâncias são classificadas como não irritantes se apresentarem viabilidade celular maior ou igual a 50% e irritantes se a viabilidade for menor que 50%, e a densidade óptica ideal é superior a 0,8, de acordo com a OECD, uma vez que nosso modelo se assemelha ao modelo SkinEthic™RHE. Nesse primeiro experimento, obtivemos uma densidade óptica de 0,824 para o controle

sem tratamento, que foi utilizado para normalizar os valores de viabilidade das peles utilizadas com controle positivo, negativo e de todas as peles tratadas com as substâncias. Ao observar o resultado de viabilidade celular do nosso modelo de RHE, vemos que o modelo respondeu conforme o esperado no que se refere às substâncias irritantes. Porém, para as substâncias não irritantes, duas das cinco substâncias, a substância 1 (Naphthalene acetic acid) e a substância 2 (isopropanol), apresentaram viabilidade menor que 50%, e, portanto, elas seriam consideradas irritantes.

O resultado do segundo teste de irritação teve um comportamento semelhante ao teste de irritação 1. Entretanto, o valor de densidade óptica do controle sem tratamento foi de 0,788, ficando abaixo do recomendado (0,8). Os valores de viabilidade de todas as peles tratadas, tanto com as substâncias irritantes quanto as não irritantes, foram menores do que no teste de irritação 1. Desta forma, além das substâncias 1 e 2 se comportarem como irritantes, a substância 4 (Heptyl butyrate) que é uma substância não irritante, também apresentou viabilidade inferior a 50% se comportando como irritante (Figura 13).

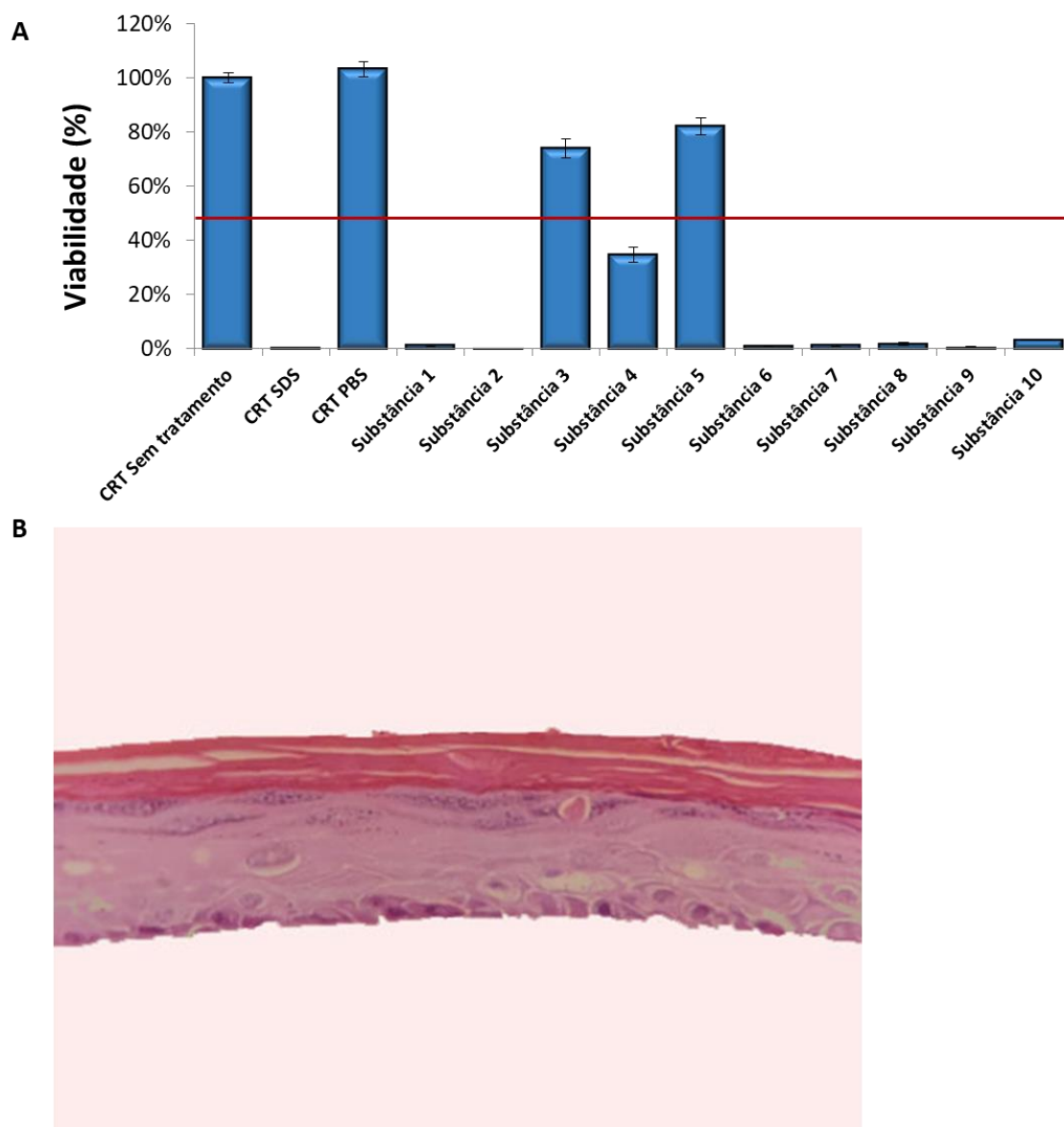


Figura 13. Teste de irritação 2. (A) Viabilidade celular dos modelos de RHE após o tratamento com as substâncias, por 42 minutos. A linha em vermelho indica o limiar entre as substâncias que são consideradas não irritantes (maior que 50%) ou irritantes (menor que 50%). (B) Imagem de histologia da RHE.

Esse resultado sugere que o estrato córneo formado desse modelo não foi suficiente para proteger as camadas vivas da pele, e, portanto, nosso protocolo precisa de constantes otimizações visando melhorar a função de barreira do estrato córneo.

Sabe-se que o tempo de cultura dos modelos de RHE na interface ar-líquido influencia na proliferação e diferenciação das células. Quanto mais tempo na interface ar-líquido, considerando condições ótimas de meio e condições de cultivo, mais as células da camada basal se proliferam e se diferenciam. Desta forma, com o passar do tempo as camadas do estrato córneo vão se acumulando e se tornam mais espessas, uma vez que não existe descamação nos modelos *in vitro*. Assim, quanto mais espesso o estrato córneo, maior a proteção das camadas basais contra a ação de substâncias nocivas a pele.

Os testes de irritação 3 e 4, obtiveram densidades ópticas muito baixas, de 0,285 e 0,425, respectivamente, sendo um indicativo de que as peles não estariam totalmente completas ou apresentavam poucas camadas. Esses resultados foram confirmados pelas imagens de histologia (Figura 14).

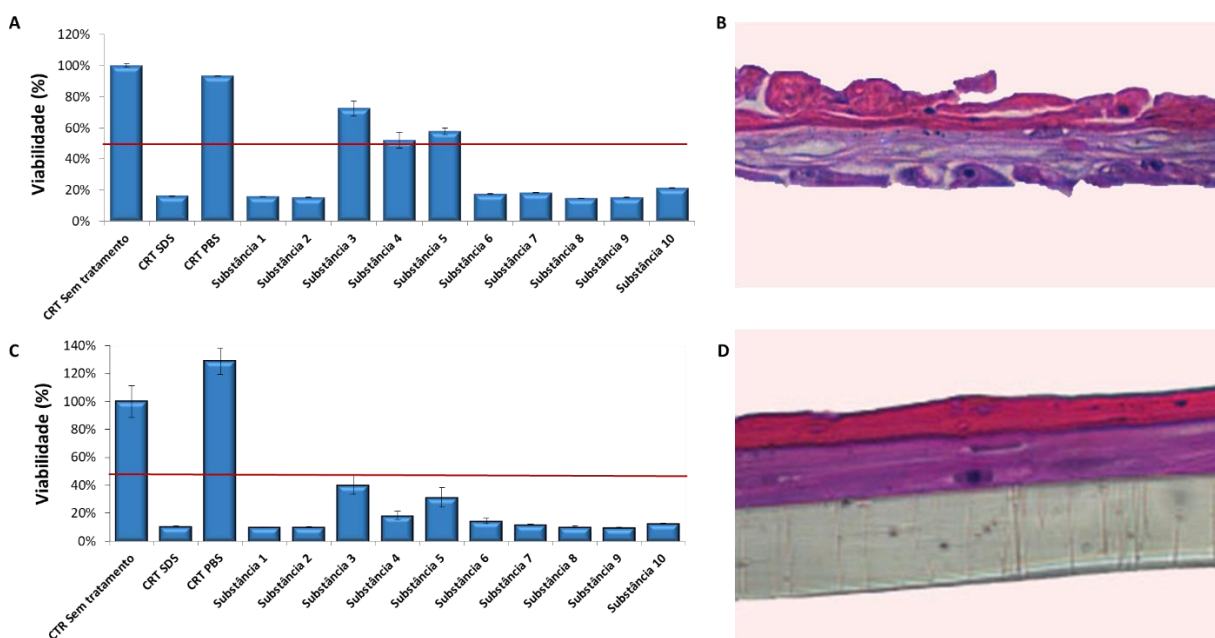


Figura 14. Teste de irritação 3 e 4. (A) Viabilidade celular dos modelos de RHE, do teste de irritação 3 e (B) imagem histologia do controle desse teste. (C) Viabilidade celular dos modelos de RHE, do teste de

irritação 4 e (B) imagem histologia do controle desse teste. A linha em vermelho indica o limiar entre as substâncias que são consideradas não irritantes (maior que 50%) ou irritantes (menor que 50%).

Como foi observado os modelos de RHE construídos não apresentaram reprodutibilidade, possivelmente devido a variabilidade dos lotes de células primárias. Para contornar esta questão foram adquiridos 2 novos lotes de células da Gibco. Entretanto, durante a expansão celular, foi observado que as células estavam com morfologia característica de uma cultura de queratinócitos, epitelióide e estavam em colônias. Além disso as células apresentaram um crescendo anormal, e só após 2 semanas do início do cultivo atingiu-se a confluência de aproximadamente 75%. Mesmo com essa observação, demos continuidade a manutenção das células com o intuito de avaliar se após a primeira passagem as células recuperariam o comportamento esperado. Entretanto, o mesmo resultado foi observado, a cultura não estava expandindo como esperado. Com o intuito de observar se o atraso no crescimento poderia estar associado a presença de células senescentes, foi realizado um ensaio de histoquímica com marcação de células destas células. Através das imagens de microscopia óptica, observamos que a maioria das células estavam coradas de azul, e, portanto, confirmando o estado de senescência (Figura 15).

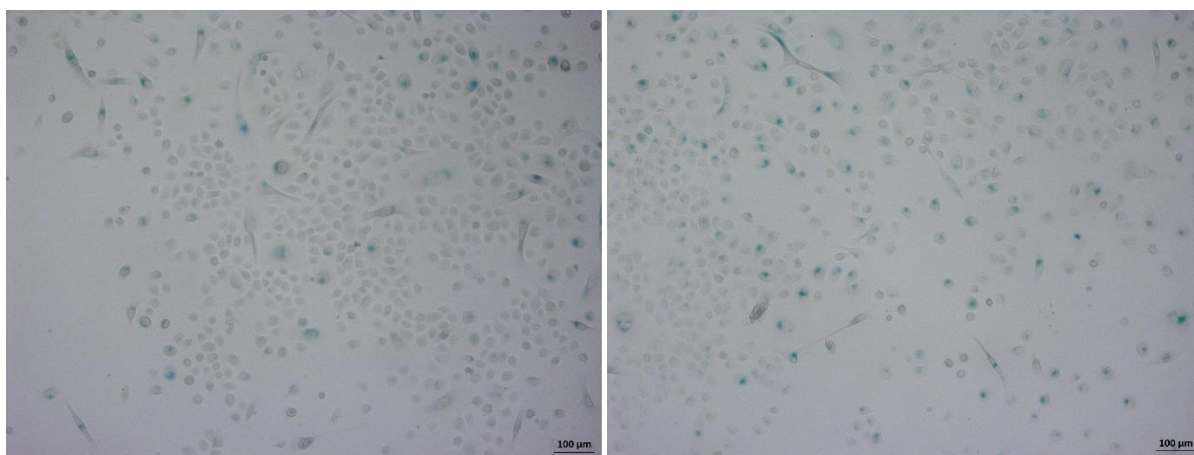


Figura 15. Imagens de microscopia óptica: Histoquímica com marcação de células senescentes.

Acreditamos que a falta de reprodutibilidade dos lotes das células obtidas possa decorrer de variações durante a execução do protocolo original de isolamento ou mesmo da característica dos doadores. Portanto, parece premente a necessidade de protocolos validados para a produção dos masterbanks de células a serem utilizadas neste tipo de ensaio posto que a inconsistência na produção dos modelos equivalentes de pele ou epiderme resultam no desperdício de recursos financeiros e tempo, além de contribuir para controvérsia na literatura e insegurança junto aos reguladores.

O Boticário avaliou o efeito do tempo, 7 a 10 dias, de exposição da cultura na interfase ar-líquido (tempo de diferenciação) na construção do modelo de RHE (figura 16).

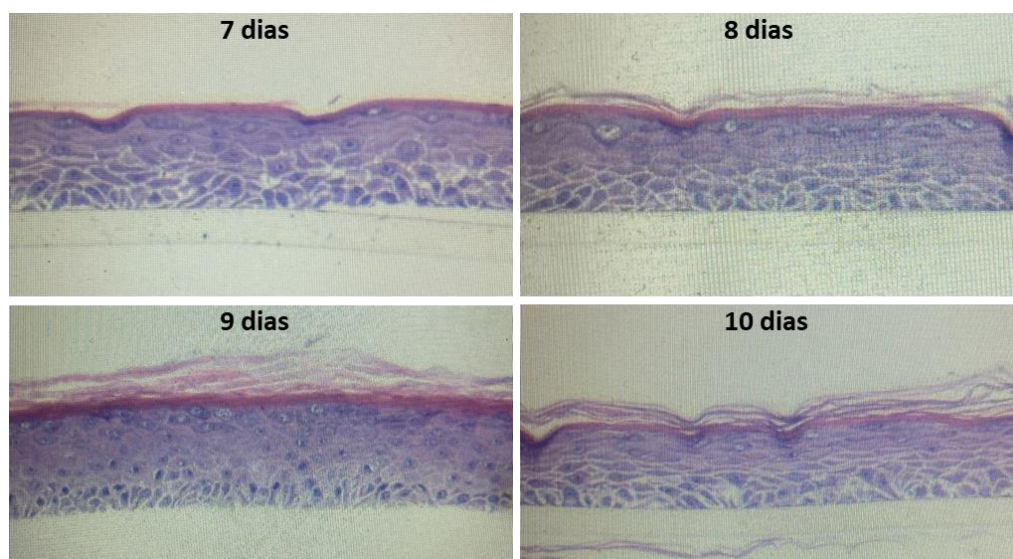


Figura 16. Imagens de histologia do modelo de RHE em diferentes tempos de diferenciação.

(Imagem cedida pelo Grupo Boticário)

Como é possível observar na figura 16, as peles construídas com 8 e 9 dias de diferenciação possuíam mais camadas viáveis de células do que nos outros dias. Portanto, a partir destes resultados, o protocolo foi novamente otimizado para ser

construído com 8 ou 9 dias de diferenciação ao invés de 11 dias, como estava sendo utilizado anteriormente.

Após o estabelecimento deste protocolo e com o intuito de confirmar o efeito da variabilidade dos lotes de células, conseguimos um lote de queratinócitos na Faculdade de Medicina de Petrópolis – UNIFASE. Esse lote de célula foi obtido e processado, seguindo um protocolo próprio do laboratório. Na figura 17, encontra-se o resultado do último teste de irritação realizado até o momento (teste de irritação 5), utilizando o protocolo de 9 dias de diferenciação.

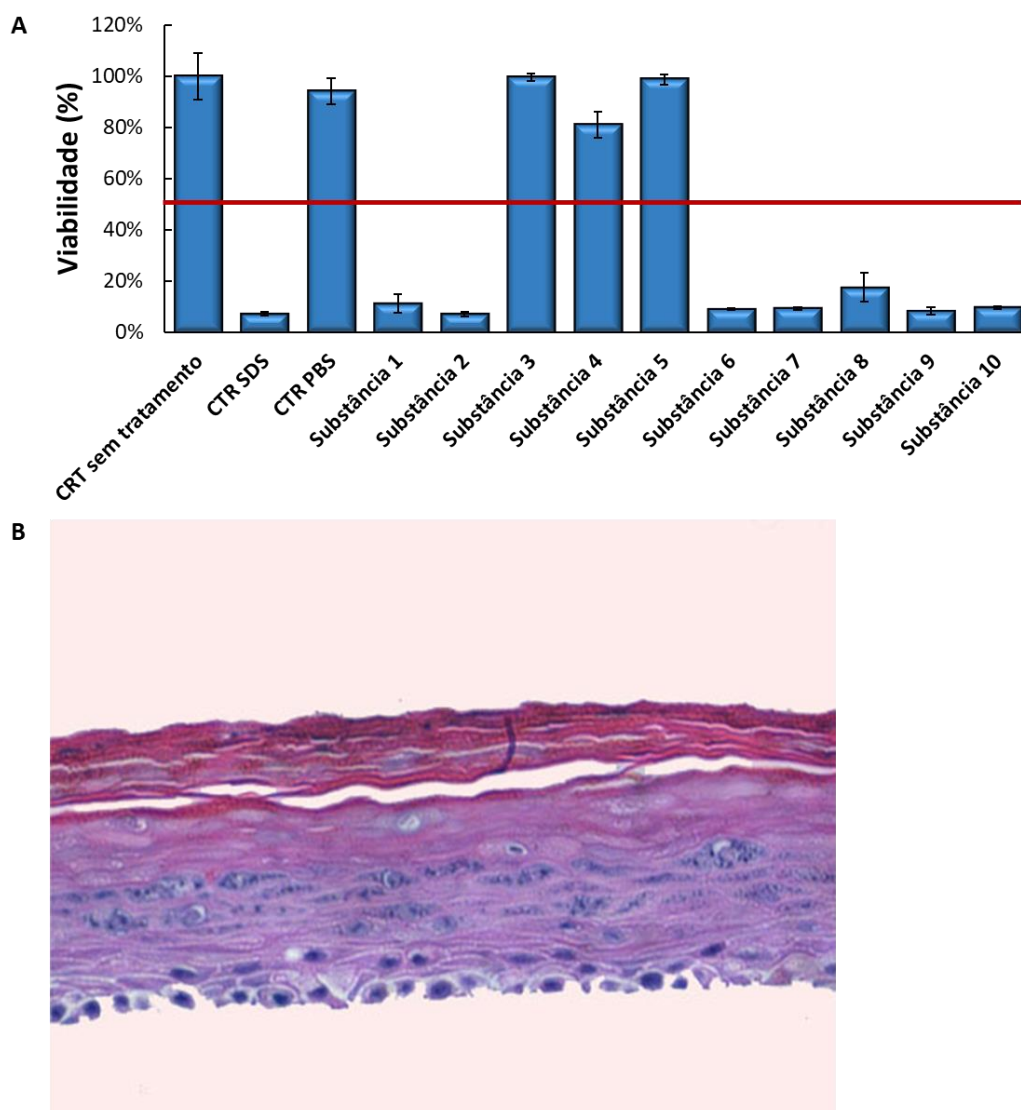


Figura 17. Teste de irritação 5. (A) Viabilidade celular dos modelos de RHE após o tratamento com as substâncias, por 42 minutos. A linha em vermelho indica o limiar entre as substâncias que são consideradas não irritantes (maior que 50%) ou irritantes (menor que 50%). (B) Imagem de histologia da RHE.

Observamos um modelo de RHE com múltiplas camadas e um estrato córneo bem formado, o que proporcionou uma densidade óptica obtida nesse modelo superior aos outros modelos construídos anteriormente, com uma DO de 0,949. Também observamos o mesmo comportamento quanto ao percentual de viabilidade, ou seja, o mesmo efeito dos produtos químicos testados, para cada preparação realizada, o mesmo

perfil de resposta foi proporcionado por cada composto. Até o momento não conseguimos identificar uma explicação plausível para o fato de duas substâncias classicamente não irritantes se comportarem como irritantes. Contudo, a imagem de histologia confirma os resultados obtidos pelo Grupo Boticário no estudo com diferentes tempos de diferenciação.

4.3.3.1 Avaliação da toxicidade das NPs de TiO₂ no modelo de RHE

Para este estudo, as NPs de TiO₂ na fase cristalina rutilo foram adquiridas comercialmente e utilizadas de forma a mimetizar as NPs empregadas em protetores solares. A caracterização físico-química dessas NPs em meio aquoso e em meio de cultivo KGM, após dispersão, foram previamente descritos (Sanches, et al., 2019).

Para avaliar a toxicidade das NPs de TiO₂, utilizamos o mesmo protocolo do teste de irritação para substâncias químicas. Nesse ensaio, utilizamos dois diferentes tempos de exposição, 42 minutos, que é o mesmo tempo utilizados para avaliar a o potencial de irritação das substâncias químicas e 48 horas, que foi o tempo utilizado nos estudos anteriores, em duas diferentes concentrações, 10 µg/mL e 100 µg/mL (Figura 18).

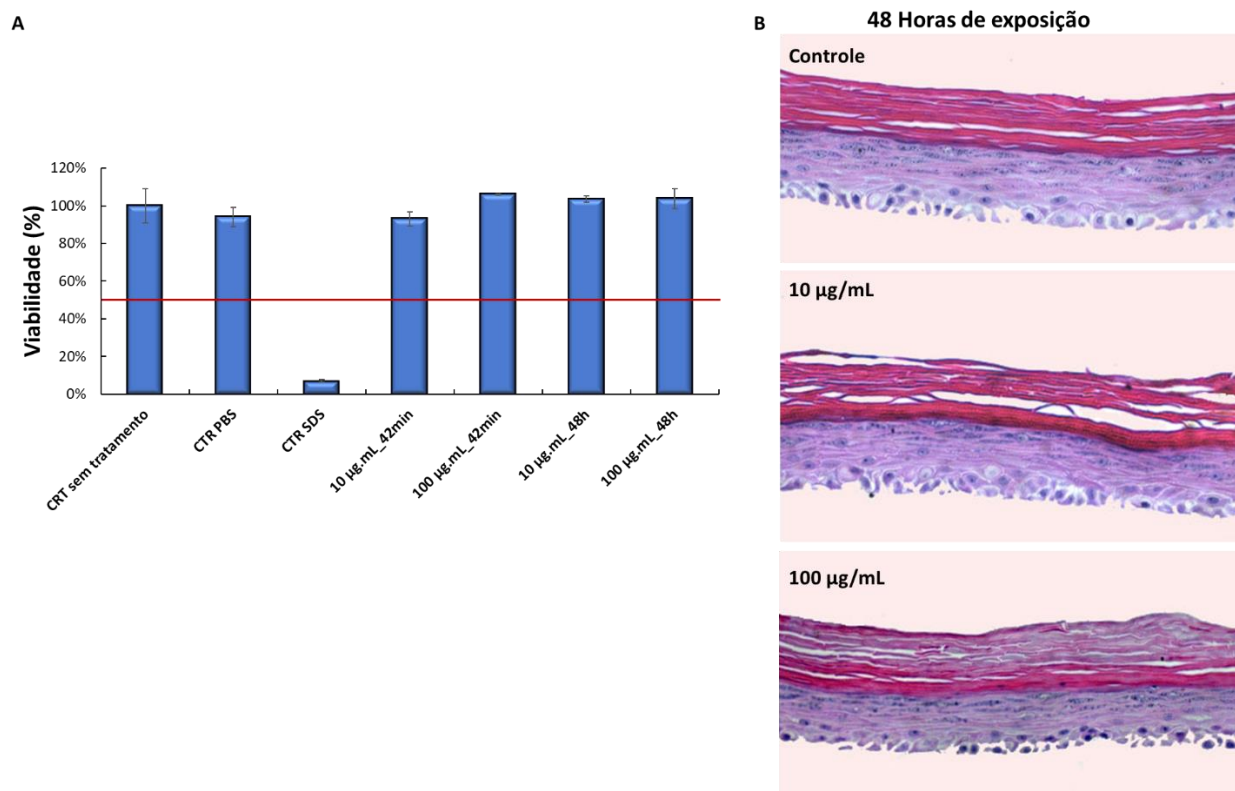


Figura 18. Avaliação da toxicidade de NPs de TiO_2 . (A) Viabilidade celular dos modelos de RHE após exposição de 10 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ de NPs de TiO_2 , por 42 minutos e 48 horas. A linha em vermelho indica o limiar entre as substâncias que são consideradas não irritantes (maior que 50%) ou irritantes (menor que 50%). (B) Imagens de histologia dos modelos de RHE do controle e após exposição de 10 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ de NPs de TiO_2 , por 48 horas.

De acordo com esse resultado, não houve diferenças significativas na viabilidade das peles tratadas com as diferentes concentrações de NPs de TiO_2 , e nos dois tempos estudados. As imagens de histologia após 48 horas de exposição, que foi o tempo máximo de exposição, confirmam os resultados de viabilidade, corroborando resultados prévios de que as NPs de TiO_2 não são irritantes nem causam toxicidade na pele, bem como não alteram a estrutura morfológica da pele, mesmo em grandes concentrações.

A Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada ao Detector de espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS) permitiu avaliar a morfologia e a possível

presença de NPs de TiO_2 nos modelos de RHEs expostos a diferentes concentrações de NPs (Figura 19).

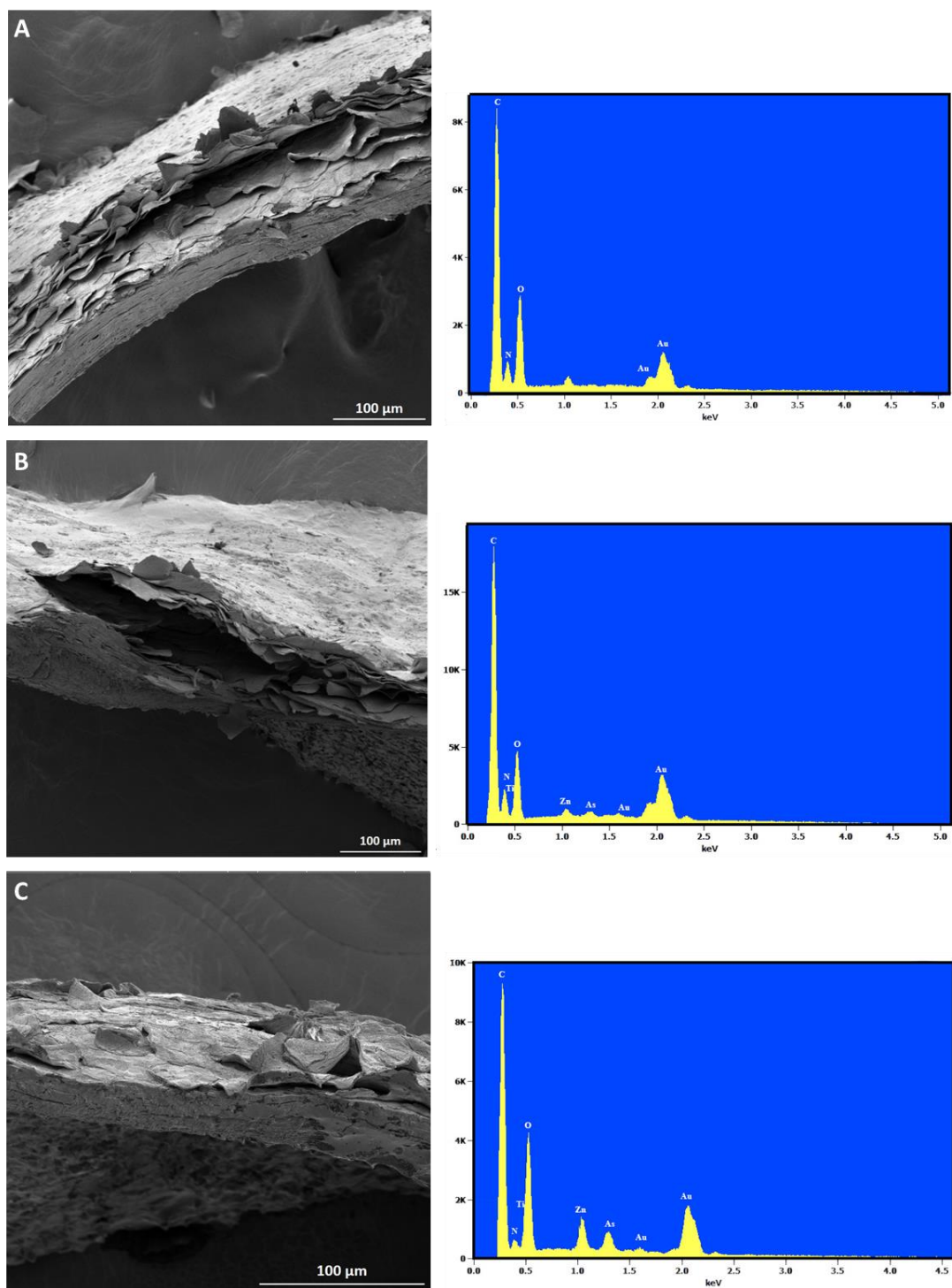


Figura 19. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura acoplados a EDS dos modelos de RHE expostas a diferentes concentrações de NPs de TiO_2 . (A) Controle, (B) 10 $\mu\text{g/mL}$ e (C) 100 $\mu\text{g/mL}$.

Ao lado de cada imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura, estão os respectivos espectros de EDS mostrando a composição química presente na amostra. A presença de titânio não foi observada em nenhuma das amostras, apresentando 0% em todas as situações. Levando-se em consideração que a suspensão de NPs é exposta na superfície do modelo, foi realizado uma imagem apenas da superfície do modelo de RHE que foi exposta a 100 µg/mL de NP de TiO₂, como é possível observar na figura 20.

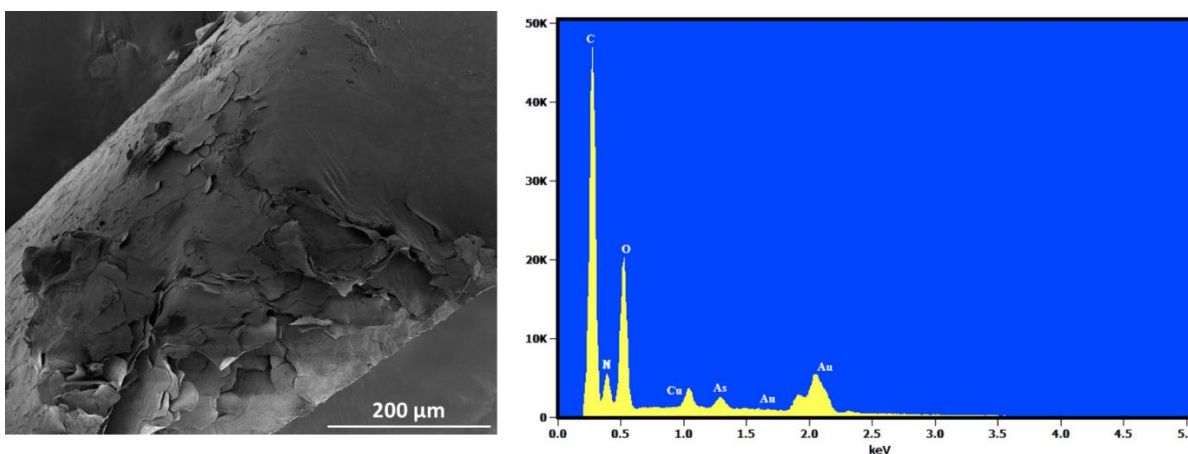


Figura 20. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura acoplados a EDS da superfície do modelo de RHE expostas 100 µg/mL de NPs de TiO₂

De acordo com esse resultado, aparentemente não houve acúmulo de NPs TiO₂ na superfície dos modelos de RHE. Não é afirmar que houve internalização das NPs. A internalização poderá ser identificada em estudos adicionais utilizando Microscopia Eletrônica de Transmissão.

4.4 Discussão

4.4.1 Construção e implementação do modelo de pele de espessura total

O desenvolvimento de modelos de pele equivalente tem se tornado um grande desafio para diversos pesquisadores, levando-se em consideração seu uso como métodos alternativos aos animais, principalmente nas indústrias químicas e de cosméticos (Debels et al., 2015; Caddeo et al., 2017; Uwe, et al. 2019) .

Nos últimos anos, diversos estudos têm sido realizados com o intuito de desenvolver métodos alternativos a experimentação em animais para os testes de irritação cutânea e ocular, e, portanto, muitas alternativas para a realização desses testes se encontram disponíveis, principalmente para os testes de Draize (Vinardell & Mitjans, 2008; Mathes et al., 2014; Moniz, et al. 2020).

Neste capítulo começamos demonstrando as etapas de aprendizagem da construção do modelo de pele de espessura total, formados por derme e epiderme, seguido de um teste preliminar de irritação utilizando um controle positivo, um negativo e um controle sem tratamento. Aparentemente, pelas imagens histológicas, o modelo de pele de espessura total do Grupo Boticário apresentou a histologia do modelo de pele de espessura total semelhante a pele humana nativa. O estrato córneo desses modelos deve sempre proporcionar uma função de barreira semelhante à da pele nativa, com o intuito de serem utilizados como uma valiosa ferramenta para a avaliação da toxicidade cutânea (Corsini et al., 2014; Molinari et al., 2013).

O modelo de pele de espessura total do Grupo Boticário apresentou o comportamento esperado frente à exposição aos controles positivo e negativo, SDS e PBS, sugerindo que esse modelo possui um estrato córneo robusto, suficiente para resistir a penetração rápida de produtos químicos. As imagens de histologia confirmaram a robustez do estrato córneo assim como foi possível observar e diferenciar a derme da epiderme e suas diferentes camadas, tendo efeito do SDS ocorrido entre a derme e epiderme. A capacidade dos modelos de pele para distinguir entre produtos químicos

irritante e não irritantes também reflete na qualidade da função de barreira desses modelos (Chermnykh, et al. 2020; Justine e Simon, 2022).

Contudo, não foi possível reproduzir esse modelo de espessura total nos laboratórios do INMETRO. A primeira dificuldade encontrada na construção desse modelo ocorreu na fase de irradiação de UV, onde não conseguimos reproduzir as condições de exposição à radiação UV adequadas e necessária como previsto no protocolo original. Após a formação da derme e antes da adição dos queratinócitos para a formação da epiderme, alguns pesquisadores utilizam em seus protocolos uma etapa de irradiação para controlar o crescimento dos fibroblastos, pela inativação da proliferação, evitando que estes se sobreponham ao crescimento e diferenciação dos queratinócitos. Vale ressaltar que essa etapa é utilizada para inativar ou reduzir a proliferação dos fibroblastos e não para a morte celular, tendo em vista que essa camada é utilizada como uma “camada alimentadora” e de sustentação para o crescimento e diferenciação dos queratinócitos.

Maas-Szabowski *et al.* afirmaram que os fibroblastos humanos interrompem sua duplicação utilizando uma dose de irradiação de 70 Gy (Maas-Szabowski et al., 2003). Entretanto, foi demonstrado que qualquer dose variando entre 70 a 150 Gy, podem ser utilizadas sem alterações significativas na viabilidade, para a inativação dos fibroblastos, servindo como camada de sustentação para o desenvolvimento dos queratinócitos (Yoshito, 2011). Alguns pesquisadores também demonstraram a construção de modelos de pele equivalente sem a utilização da etapa de irradiação. No entanto, para a construção desses modelos que visam a associação de derme e epiderme, faz-se necessário a utilização de uma matriz extracelular, geralmente matrizes tridimensionais de colágeno, para evitar que os fibroblastos invadam os limites da epiderme (Ramasamy, et al., 2021).

Devido as diferenças nos equipamentos de irradiação utilizados pelo Grupo Boticário e pelo INMETRO, tentamos implementar a construção do modelo de pele de espessura total utilizando diferentes doses de irradiação. Alternativamente, tentamos implementar a construção do modelo sem a utilização da irradiação, sempre com o

objetivo de reconstruir um modelo similar ao desenvolvido pelo Grupo Boticário. Entretanto, não tivemos sucesso e essas abordagens foram descartadas.

4.4.2 Implementação do modelo de epiderme reconstruída (RHE)

Como mencionado anteriormente, durante o tempo de implementação do modelo de pele de espessura total, com epiderme e derme no INMETRO, o Grupo Boticário desenvolveu um modelo de pele só com epiderme (epiderme humana reconstruída - RHE). Como esse modelo não apresentava a camada dérmica, conseqüentemente não precisava da etapa de irradiação. Portanto, houve a transferência de tecnologia deste modelo para o INMETRO, para verificarmos a eficiência do modelo em relação ao seu potencial de irritação.

Os modelos RHE são os mais vendidos comercialmente, uma vez que são utilizados para avaliar um grande número de testes, como os testes de irritação, corrosão, genotoxicidade, fototoxicidade, administração de medicamentos transdérmicas, testes de sensibilização e metabolização da pele, enquanto os modelos conhecidos como modelos de Espessura Total (FT), que são os modelos constituídos por epiderme e derme, são geralmente usados para avaliar a eficácia de medicamentos (Mathes et al., 2014; Moniz et al. 2020). Entretanto, os testes de irritação e corrosão são considerados como as principais categorias para avaliar possíveis efeitos adversos na pele devido a exposição tópica a produtos químicos e cosméticos. As substâncias corrosivas danificam irreversivelmente a pele, enquanto as substâncias irritantes geram uma reação inflamatória local reversível, que é causada pelo sistema imunológico inato do tecido afetado. Alguns tipos de produtos químicos desencadeiam uma resposta irritante após repetidas exposições à mesma área da pele, e alguns produtos químicos podem causar irritação após uma única exposição. Por esse motivo, os requisitos regulatórios atuais concentram-se em avaliar o potencial de irritação aguda de cosméticos e produtos químicos para prevenir possíveis riscos.

Até o momento, 7 modelos de RHE foram oficialmente registrados na OCDE. Assim como a pele nativa, o modelo de RHE é formada por um epitélio escamoso estratificado que se diferenciam e migram formando as camadas da epiderme. Sofrem progressivas mudanças no seu conteúdo e morfologia e, eventualmente há a transformação de células poligonais vivas em células achatadas mortas, denominado como estrato córneo (Wikramanayake, et al., 2014; Mathes et al., 2014; Moniz et al. 2020). O primeiro modelo de RHE construído no INMETRO, mostrou ser similar aos desenvolvidos pelo Grupo Boticário, e com isso, conseguimos dar continuidade e avaliar o modelo em relação ao potencial de irritação, seguindo as diretrizes da OECD 439.

Em relação aos modelos de RHE validados pela OECD 439, foi observado que a espessura entre os modelos de pele equivalente utilizados para avaliar a irritação dérmica variava. O modelo EpiDerm® apresenta uma epiderme variando entre 7 e 14 camadas (83-100 μm) com um estrato córneo de 16 a 25 camadas (12-28 μm). O modelo Episkin™ apresenta uma epiderme variando de 7 a 10 camadas celulares (24-69 μm) e um estrato córneo de 15 a 24 camadas (17-37 μm), o modelo SkinEthic™, apresenta uma epiderme com 5 a 9 camadas de células (23-59 μm) e um estrato córneo com 14 a 24 camadas (15-32 μm) (Anderson e Shive, 2012; OECD 2019). De acordo com as imagens histológicas, observamos que nosso modelo de RHE, quando apresentou densidade óptica superior a 0,8, mostrou ser similar ao modelo SkinEthic™, em relação ao número de camadas e espessura.

Se observarmos os 5 lotes de peles desenvolvidas para o teste de irritação, independentemente se a pele foi totalmente desenvolvida ou não, é possível notar um mesmo perfil na viabilidade celular. As substâncias 1 (ácido naftaleno acético) e a substância 2 (isopropanol), em todos os experimentos de irritação, se comportaram como falso-positivos, uma vez que são substâncias não irritantes. Tentamos entender através da literatura o possível motivo dessas substâncias terem se comportado como falso negativo, contudo, encontramos apenas 1 artigo que demonstrou em uma das três triplicatas de experimentos independentes, um valor da viabilidade inferior a 50% para o ácido naftaleno acético (Pedrosa *et al.*, 2017). Acreditamos que o isopropanol, por ser uma substância líquida e ser muito permeável, possa ter passado pelas laterais dos

insertos e atingiu as camadas basais da pele, e por esse motivo, contribuiu para a diminuição da viabilidade.

Com exceção dessas duas substâncias, observamos que o modelo de RHE construído nesse trabalho, quando apresentando uma densidade óptica superior a 0,8, exibiu uma performance equivalente às peles recomendadas pelos guias da OECD 439. Assim, o modelo aqui avaliado apresenta-se promissor para estudos que avaliem a segurança da pele em relação a substâncias químicas.

Em geral, para a construção de modelos de pele equivalente, são utilizadas células isoladas de restos cirúrgicos de prepúcio de crianças, pois estas possuem um melhor potencial para expansão e diferenciação quando comparados de células oriundas de adultos. Sabendo-se deste fato, nosso trabalho foi todo desenvolvido com células de doadores de no máximo 7 anos de idade. Deste modo, a idade dos doadores não parece justificar o comportamento heterogêneo observado nos diferentes lotes/origens das células.

Nossos resultados confirmaram a necessidade de se utilizar para a construção de modelos de pele equivalente, lotes de células processadas de forma correta, e seguindo minuciosamente os protocolos de processamento e condições de cultivo celular, tais como, congelamento, descongelamento, número de passagens, entre outras boas práticas, com o intuito de minimizar o risco de induzir alterações na produção e, conseqüentemente, causar respostas heterogêneas (Coecke *et al.*, 2005; Carias *et al.*, 2018). Novamente, enfatizamos a importância de seguir padrões definidos para garantir que os dados resultantes sejam rigorosos e reprodutíveis. O Documento de Orientação sobre Boas Práticas do Método In Vitro (GIVIMP - *Guidance Document on Good In Vitro Method Practices*), foi desenvolvido com a finalidade de ajudar a reduzir as incertezas nas previsões de segurança química, derivadas de métodos *in vitro* baseados em células e tecidos. Com este intuito, eles fornecem dez aspectos importantes relacionados ao trabalho *in vitro*, entre elas, estão os papéis e responsabilidades; considerações de qualidade; instalações; aparelhos, materiais e reagentes; sistemas de teste; teste e

referência/ itens de controle; procedimentos operacionais padrão (POPs); desempenho do método; relatórios de resultados; armazenamento e retenção de registros e materiais.

O desenvolvimento de modelos de RHEs vem sendo a alguns anos, um grande desafio para muitos pesquisados (Lemper et. al., 2014; Wikramanayake, et al., 2014; Mathes et al., 2014; Moniz et al. 2020). Levando-se em consideração que nosso país possui limitações alfandegárias, o domínio dessa tecnologia é de extrema importância com impacto na nossa soberania, representando um avanço não só para as indústrias cosméticas, mas também um avanço para entender melhor os processos biológicos da pele (De Wever et al., 2015 , Groeber et al., 2016 , Mewes et al., 2016)

4.4.3 Avaliação da toxicidade de NPs de TiO₂

Anteriormente nosso grupo demonstrou a internalização de NPs de TiO₂ (na fase cristalina rutilo) tanto nos queratinócitos quanto nos fibroblastos primários da pele humana, em monocamada (Sanches, et al., 2019). Desta forma, um dos intuitos desse projeto foi avaliar se as mesmas NPs de TiO₂ alteravam a morfologia dos modelos de RHE e se podiam ser internalizadas, levando-se em consideração que esses modelos superam as limitações dos modelos em monocamada (2D) e mimetizam as propriedades histológicas, morfológicas, bioquímicas e fisiológicas das diferentes camadas da pele nativa (Kim et al., 2016; Bo, et al. 2022).

O estudo de internalização de NPs em modelos de pele tridimensional é de relevante, levando-se em consideração que a avaliação da toxicidade dessas NPs, disponíveis na literatura, utilizam o modelo *in vitro* em monocamada. Atualmente ainda existem pouquíssimos estudos da avaliação da toxicidade de NPs de TiO₂ nos modelos de pele equivalente (Yurong Wang et al., 2015; Zhao et al., 2013; Abbasi-Oshaghi, 2019).

Como mencionado anteriormente, existe uma grande contradição em relação ao efeito citotóxico das NPs de TiO₂. Ao mesmo tempo que muitos estudos mostram que as NPs de TiO₂ não geram toxicidade e não são irritantes, como demonstrado no artigo de

revisão sistemática, outros estudos sugerem que as NPs de TiO_2 induzem a liberação de EROs, levando à perda das funções vitais, podendo levar à morte celular (Carriere et al., 2016; Jacobs et al., 2010; Shi et al., 2013b; Tucci et al., 2013; Yuzhen Wang et al., 2015; Zhao et al., 2013; Wu et al., 2020).

Após a reprodução com sucesso do modelo de RHE, conseguimos avaliar a possível toxicidade das NPs de TiO_2 utilizando o ensaio de MTT, assim como foi realizado para avaliar o potencial de irritação das substâncias químicas, em dois diferentes tempos de exposição, 42 minutos e 48 horas. Nossos resultados confirmam que não houve redução da viabilidade celular em quaisquer tempos estudados, tanto na avaliação de irritação 42 minutos, quanto na avaliação de toxicidade, 48 horas, mesmo na maior concentração, corroborando artigos prévios que avaliaram a irritação dérmica de NPs de TiO_2 no artigo de revisão sistemática (Choi et al., 2014; Kim et al., 2016; Park et al., 2011; Miyani & Hughes, 2017). Esses resultados também foram confirmados pelas imagens de histologia e de Microscopia Eletrônica de Varredura, mostrando que não houve alteração na morfologia das peles nas diferentes concentrações de NPs.

Alguns trabalhos mostram a interferência de NPs de TiO_2 em muitos métodos de análise, e o ensaio de MTT, é um deles. A interferência das NPs de TiO_2 é atribuída às propriedades de adsorção de luz da NP na mesma região espectral usada pelo MTT (Guadagnini et al., 2015b; Holder et al., 2012; Kroll & Hendrik, 2012; Lammel & Sturve, 2018; Lupu & Popescu, 2013; Ong et al., 2014). A interferência acontece quando as NPs entram em contato direto com a solução de MTT, como acontece por exemplo em exposição de NPs em culturas de células em monocamada, que mesmo com muitas lavagens, para a remoção das NPs das membranas das células, grande parte das NPs permanece aderidas no plástico/poço. No caso dos modelos de pele equivalente, isso não ocorre, pois as peles ficam em insertos, e a exposição é feita em cima da pele. Após o tempo de exposição, as peles são lavadas 3 vezes, e a solução de MTT é adicionada no fundo do poço, e não sobre a pele, eliminando o contato do MTT, com as NPs. Após o tempo necessário para que ocorra a conversão enzimática do corante vital MTT em um sal de azul de formazana, as peles são removidas dos insertos e adicionadas na solução reveladora, no nosso caso, o isopropanol.

Além disso, mostramos que efetuamos eficientes etapas de lavagem, para remover as NPs de TiO₂ da superfície das peles, de modo que não foi detectado nenhum sinal de NPs TiO₂ nas análises de EDS, mesmo na concentração mais alta de NPs. Contudo, para observar se houve internalização de NPs, será necessário avaliar essas amostras por Microscopia Eletrônica de Transmissão.

4.5 Conclusão

Estes resultados sugerem que o modelo de RHE do grupo Boticário pode ser um modelo promissor para ensaios *in vitro* de irritação cutânea, assim como também para aplicações em outras áreas de pesquisa básica e aplicada como alternativa aos testes realizados em animais. A grande dificuldade observada neste trabalho, foi a dificuldade de utilizar lotes de células que proporcionassem a efetiva reconstrução da epiderme. As razões para essa variabilidade podem decorrer de diversos fatores como falhas na padronização ou realização do método para isolamento e expansão celular. Este fato acarreta grande perda de tempo e dinheiro. Por esse motivo, concluímos que o ideal é que a própria empresa ou instituto processe o tecido doado, utilizando sempre o mesmo método de isolamento e expansão celular, de modo a estocar lotes de células reprodutivos, para esta finalidade.

Atingindo esse objetivo, esse modelo atende os requisitos necessários para que seja submetido a testes de validação Inter laboratorial, assim como certamente poderá representar um grande avanço em métodos alternativos no Brasil.

Em relação as, concluímos que a exposição da RHE a diferentes concentrações de NPs de TiO₂ não promoveu irritação ou perda de viabilidade celular corroborando estudos prévios.

5. Trabalhos futuros

Para finalizar este projeto, e com o intuito de uma futura publicação, mais um lote do modelo de RHE será construído, seguindo o último protocolo de construção do modelo, que utiliza um período de 8 a 9 dias de diferenciação, para a construção total da pele. Desta forma, teremos uma duplicata de experimentos independente. Além da avaliação da irritação das substâncias químicas e das NPs de TiO₂, será realizado uma imuno-histoquímica do modelo de RHE utilizando o padrão ouro da OECD, com marcação de citoqueratina 10, citoqueratina 14, filagrina e involucrina. Assim como também será realizado uma avaliação do perfil de citocinas e Microscopia Eletrônica de Transmissão para avaliar possível internalização de NPs.

6. Dificuldades encontradas durante o desenvolvimento deste projeto

O acordo inicial entre o Grupo Boticário e o INMETRO foi de que o Grupo Boticário forneceria o treinamento da doutoranda relativamente ao desenvolvimento do modelo de pele equivalente para que posteriormente o mesmo fosse validado, não havendo, portanto, transferência de tecnologia. Desta forma, o modelo seria construído nos laboratórios do Grupo Boticário e em seguida, enviado por correio, para o INMETRO, para que houvesse a validação do modelo de acordo com a diretriz da OCDE 439. Entretanto, a logística da transferência dos modelos de pele equivalente do Paraná para o Rio de Janeiro não ocorreu com sucesso considerando o risco do modelo perder a viabilidade durante o transporte. Por este motivo, ocorreu uma alteração no plano de trabalho da aluna sendo introduzida a etapa de construção do modelo nos laboratórios do INMETRO.

Como mencionado anteriormente, as construções dos primeiros modelos de pele equivalente no INMETRO não foram bem-sucedidos, devido a etapa de irradiação UV, utilizado para a formação da derme. O equipamento de irradiação disponível apresenta um comprimento de onda fixo em 340nm, diferente da utilizada pelo Grupo Boticário, que trabalha com um espectro total de 300 a 800nm. E por esse motivo, tivemos que

implementar um novo modelo de epiderme humana reconstituída (RHE), com o intuito de eliminar as etapas de irradiação, o que, no final, também simplifica o protocolo sem impacto significativo nos resultados.

A pandemia de COVID-19 representou outro contratempo. A obrigatoriedade do confinamento, levou à interrupção dos trabalhos que estavam sendo realizados. Com o intuito de maximizar o tempo disponibilizado pelo confinamento, nosso grupo escreveu outro artigo de revisão, no formato de Revisão de Escopo, com o objetivo de compreender se as respostas celulares provenientes dos nanomateriais são mediadas por vesículas extracelulares. Esse período também foi utilizado para ampliar o conhecimento, como por exemplo, através de vídeos conferências.

7. Referências

- Abbasi-Oshaghi, Ebrahim; Mirzaei, Fatemeh; Pourjafar, Mona (2019). NLRP3 inflammasome, oxidative stress, and apoptosis induced in the intestine and liver of rats treated with titanium dioxide nanoparticles: in vivo and in vitro study. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 14(), 1919–1936.
- Alépée, N., Grandidier, M. H., & Cotovio, J. (2019). Usefulness of the EpiSkin™ reconstructed human epidermis model within Integrated Approaches on Testing and Assessment (IATA) for skin corrosion and irritation. *Toxicology in Vitro*, 54, 147–167. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.09.015>
- Almeida, A., Sarmento, B., & Rodrigues, F. (2017). Insights on in vitro models for safety and toxicity assessment of cosmetic ingredients. In *International Journal of Pharmaceutics* (Vol. 519, Issues 1–2, pp. 178–185). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.01.024>
- Amina, Sundus Jabeen; Guo, Bin (2020). A Review on the Synthesis and Functionalization of Gold Nanoparticles as a Drug Delivery Vehicle. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 15(), 9823–9857. doi:10.2147/IJN.S279094
- Anderson, J. M., & Shive, M. S. (2012). Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 64, Issue SUPPL., pp. 72–82). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.004>
- Antoine, E. E., Vlachos, P. P., & Rylander, M. N. (2014). Review of collagen i hydrogels for bioengineered tissue microenvironments: Characterization of mechanics, structure, and transport. In *Tissue Engineering - Part B: Reviews* (Vol. 20, Issue 6, pp. 683–696). Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2014.0086>
- Asha, Anika Benozir (2020). Nanomaterials Properties. *Polymer Science and Nanotechnology*, 343–359.
- Ashna Gauthaman, Anand Krishnan, M.S. Anju, Lynda V. Thomas, Naresh Kasoju, Anugya Bhatt. (2022). Three-dimensional bioprinting of skin tissue equivalents using natural polymers as bioinks for potential applications in wound repair. *From Basic Concepts to Emerging Trends*, 187-206.
- Awais Hameed, Gull Rida Fatima, Kainat Malik, Ayesha Muqadas, M.Fazal-ur-Rehman. (2019). Scope of Nanotechnology in Cosmetics: Dermatology and Skin Care Products. *Journal of Medicinal and Chemical Sciences*, (2) 9-16.
- Bayda, Samer; Adeel, Muhammad; Tuccinardi, Tiziano; Cordani, Marco; Rizzolio, Flavio (2019). The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules*, 25(1), 112. doi:10.3390/molecules25010112

- Bo Ram Mok, Su-Ji Shon, A Ram Kim, Carolyne Simard-Bisson, Israël Martel, Lucie Germain, Dong Hyun Kim and Jung U Shin. (2022). Structural and Functional Validation of a Full-Thickness Self-Assembled Skin Equivalent for Disease Modeling. *Pharmaceutics*, 14(6).
- Bondioli, E., Fini, M., Veronesi, F., Giavaresi, G., Tschon, M., Cenacchi, G., Cerasoli, S., Giardino, R., & Melandri, D. (2014). Development and evaluation of a decellularized membrane from human dermis. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 8(4), 325–336. <https://doi.org/10.1002/term.1530>
- BraCVAM. (2013). Centro Brasileiro para Validação de Métodos Alternativos. https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=1188&Itemid=214
- Caddeo, S., Boffito, M., & Sartori, S. (2017). Tissue engineering approaches in the design of healthy and pathological in vitro tissue models. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 5, Issue AUG). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2017.00040>
- Cannon, C. L., Neal, P. J., Southee, J. A., Kubilus, J., & Klausner, M. (1994). New epidermal model for dermal irritancy testing. *Toxicology in Vitro*, 8(4), 889–891. [https://doi.org/10.1016/0887-2333\(94\)90095-7](https://doi.org/10.1016/0887-2333(94)90095-7)
- Carias, R. B., Menezes, K., Takamori, E. R. & Borojevic, R. (2018). Qualidade dos produtos de terapias avançadas: requisitos de células extensamente manipuladas usadas em terapias celulares e em bioengenharia. *Vigilância Sanitária em Debate* 6, 84.
- Carriere, M., Sauvaigo, S., Douki, T., Ravanat, J., Lésions, L., Alpes, U. G., Lésions, L., & Néel, L. (2016). Impact of nanoparticles on DNA repair processes: current knowledge and working hypotheses. 1–11. <https://doi.org/10.1093/mutage/gew052>
- Chermnykh, Elina S.; Alpeeva, Elena V.; Vorotelyak, Ekaterina A. (2020). Transglutaminase 3: The Involvement in Epithelial Differentiation and Cancer. *Cells*, 9(9), 1996.
- Choi, J., Kim, H., Choi, J., Oh, S. M., Park, J., & Park, K. (2014). Skin corrosion and irritation test of sunscreen nanoparticles using reconstructed 3D human skin model. *Environmental Health and Toxicology*, 29, e2014004. <https://doi.org/10.5620/eh.2014.29.e2014004>
- Coecke, S.; Balls, M.; Bowe, G.; Davis, J.; Gstraunthaler, G.; Hartung, T.; Hay, R.; Merten, O. W. (2005). Price, A.; Schechtman, L.; Stacey, G.; Stokes, W. Guidance on good cell culture practice: a report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. *Altern Lab Anim*, v. 33, n. 3, p. 261-87.

COMMISSION IMPLEMENTING DECISION of 25 November 2013 on Guidelines on Annex I to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products (Text with EEA relevance) (2013/674/EU). (2013).

Corsini, E., Papale, A., Galbiati, V., & Roggen, E. L. (2014). Safety evaluation of cosmetic ingredients: In vitro opportunities for the identification of contact allergens. In *Cosmetics* (Vol. 1, Issue 1, pp. 61–74). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cosmetics1010061>

Costa, A., Eberlin, S., Clerici, S. P., & Abdalla, B. M. Z. (2015). Avaliação in vitro da eficácia anti-inflamatória, protetora da barreira cutânea e redutora da hipersensibilidade cutânea de quatro sabonetes líquidos disponíveis no Brasil. *Surgical and Cosmetic Dermatology*, 7(2), 123–128. <https://doi.org/10.5935/scd1984-8773.2015722>

Debels, H., Hamdi, M., Abberton, K., & Morrison, W. (2015). Dermal matrices and bioengineered skin substitutes: A critical review of current options. In *Plastic and Reconstructive Surgery - Global Open* (Vol. 3, Issue 1, p. e284). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/GOX.0000000000000219>

De Vecchi, R.; Dakic, V.; Mattos, G.; Rigauadeau, A.-S. et al. (2018). Implementation, availability and regulatory status of an OECD accepted Reconstructed Human Epidermis model in Brazil. *Vigilância Sanitária em Debate*, 6, p. 64, 02/28 2018.

De Wever, B., Goldberg, A., Eskes, C., Roggen, E., Vanparys, P., Schröder, K., Le Varlet, B., Maibach, H., Beken, S., De Wilde, B., Turchina, C., Bogaert, G., Bogaert, J.-P., (2015). “open source”-based engineered human tissue models: a new gold standard for Nonanimal testing through openness, transparency, and collaboration, promoted by the ALEXANDRA Association. *Appl. in Vitro. Toxicol.* 1, 5–9. <http://dx.doi.org/10.1089/aivt.2014.0011>.

Dianzani, C., Zara, G. P., Maina, G., Pettazzoni, P., Pizzimenti, S., Rossi, F., Gigliotti, C. L., Ciamporzero, E. S., Daga, M., Barrera, G., & Zhang, J. H. (2014). Drug Delivery Nanoparticles in Skin Cancers. <https://doi.org/10.1155/2014/895986>

Didar Baimanov, et al. (2022) In situ analysis of nanoparticle soft corona and dynamic evolution. *Nature Communications*,13.

Dijkhoff, I. M., Drasler, B., Karakocak, B. B., Petri-Fink, A., Valacchi, G., Eeman, M., & Rothen-Rutishauser, B. (2020). Impact of airborne particulate matter on skin: a systematic review from epidemiology to in vitro studies. *Particle and Fibre Toxicology*, 17(1). Díez-Sales O, Náchter A, Merino M e Merino V. (2018). Alternative Methods to Animal Testing in Safety Evaluation of Cosmetic Products. *Analysis of Cosmetic Products* (Second Edition), Pages 551-584.

Doke, S. K., & Dhawale, S. C. (2015). Alternatives to animal testing: A review. In *Saudi Pharmaceutical Journal* (Vol. 23, Issue 3, pp. 223–229). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.11.002>

- Dowling, A. P. (2004). Development of nanotechnologies. *Materials Today*, 7(12), 30–35 | 10.1016/S1369-7021(04)00628-5.
- Draize, J., Woodard, G., Calvery, H., (1944). Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharmacol.*
- Dréno, B., Alexis, A., Chuberre, B., & Marinovich, M. (2019). Safety of titanium dioxide nanoparticles in cosmetics. In *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* (Vol. 33, Issue S7, pp. 34–46). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jdv.15943>
- Edwards, P. P., & Thomas, J. M. (2007). Gold in a Metallic Divided State — From Faraday to Present-Day Nanoscience. *ChemInform*, 38(39). <https://doi.org/10.1002/chin.200739223>
- Ehrenberg, M. S., Friedman, A. E., Finkelstein, J. N., Oberdörster, G., & McGrath, J. L. (2009). The influence of protein adsorption on nanoparticle association with cultured endothelial cells. *Biomaterials*, 30(4), 603–610. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.09.050>
- Faraday, M. (1857). The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. In *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* (Vol. 147).
- Farjami,_Afsane; Salatin, Sara; Jafari,_Samira; Mahmoudian,_Mohammad; Jelvehgari, Mitra. (2021). Factors that determine cutaneous penetration and cellular absorption of nanocarriers: a new hope for clinical development. *Current Pharmaceutical Design*, 27, 4315-4329(15).
- Foroozandeh, P., & Aziz, A. A. (2015). Merging Worlds of Nanomaterials and Biological Environment: Factors Governing Protein Corona Formation on Nanoparticles and Its Biological Consequences. *Nanoscale Research Letters*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s11671-015-0922-3>
- Gholobova, D., Gerard, M., Decroix, L., Des, L., Callewaert, N., & Annaert, P. (2018). Human tissue-engineered skeletal muscle: a novel 3D in vitro model for drug disposition and toxicity after intramuscular injection. December 2017, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30123-3>
- Gledhill, K., Guo, Z., Umegaki-Arao, N., Higgins, C. A., Itoh, M., & Christiano, A. M. (2015). Melanin transfer in human 3D skin equivalents generated exclusively from induced pluripotent stem cells. *PLoS ONE*, 10(8), e0136713. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136713>
- Groeber, F., Schober, L., Schmid, F.F., Traube, A., Kolbus-Hernandez, S., Daton, K., Hoffmann, S., Petersohn, D., Schäfer-Korting, M., Walles, H., Mewes, K.R., (2016). Catch-up validation study of an in vitro skin irritation test method based on an open

- source reconstructed epidermis (phase II). *Toxicol. in Vitro* 36, 254–261. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2016.07.008>.
- Guadagnini, R., Halamoda Kenzaoui, B., Walker, L., Pojana, G., Magdolenova, Z., Bilanicova, D., Saunders, M., Juillerat-Jeanneret, L., Marcomini, A., Huk, A., Dusinska, M., Fjellsbø, L. M., Marano, F., & Boland, S. (2015). Toxicity screenings of nanomaterials: challenges due to interference with assay processes and components of classic in vitro tests. *Nanotoxicology*, 9(sup1), 13–24. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.829590>
- Hanawa, T. (2019). Titanium-tissue interface reaction and its control with surface treatment. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 7, Issue JUL). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00170>
- Hao, F., Jin, X., Liu, Q. S., Zhou, Q., & Jiang, G. (2017). Epidermal Penetration of Gold Nanoparticles and Its Underlying Mechanism Based on Human Reconstructed 3D Episkin Model. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 9(49), 42577–42588. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b13700>
- Higgins, J., & Green, S. (2011). *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions Version 5.1.0 [updated March 2011]*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Available from www.handbook.cochrane.org.
- Hoffmann, J., Heisler, E., Karpinski, S., Losse, J., Thomas, D., Siefken, W., Ahr, H. J., Vohr, H. W., & Fuchs, H. W. (2005). Epidermal-skin-test 1000 (EST-1000) - A new reconstructed epidermis for in vitro skin corrosivity testing. *Toxicology in Vitro*, 19(7), 925–929. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.06.010>
- Holder, A. L., Goth-Goldstein, R., Lucas, D., & Koshland, B. K. (2012). Particle-induced artifacts in the MTT and LDH viability assays. *Chem Res Toxicol*, 25(9), 1885–1892. <https://doi.org/10.1021/tx3001708>. Particle-induced
- Hong, F., Yu, X., Wu, N., & Zhang, Y. Q. (2017). Progress of: In vivo studies on the systemic toxicities induced by titanium dioxide nanoparticles. In *Toxicology Research* (Vol. 6, Issue 2, pp. 115–133). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c6tx00338a>
- Horie, M., Sugino, S., Kato, H., Tabei, Y., Nakamura, A., & Yoshida, Y. (2016). Does photocatalytic activity of TiO₂ nanoparticles correspond to photo-cytotoxicity? Cellular uptake of TiO₂ nanoparticles is important in their photo-cytotoxicity. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 26(4), 284–294. <https://doi.org/10.1080/15376516.2016.1175530>
- Hristozov, D., Gottardo, S., Critto, A., & Marcomini, A. (2012). Risk assessment of engineered nanomaterials: A review of available data and approaches from a regulatory perspective. In *Nanotoxicology* (Vol. 6, Issue 8, pp. 880–898). <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.626534>

- Hubrecht, R. C. and Cáster, E. (2019). The 3Rs and___humane experimental technique: implementing change . *Animals*, 9(10), 754.
- International Organization for Standardization. (2017). ISO/TS 20477:2017: Nanotechnologies — Standard terms and Their Definition for Cellulose Nanomaterial. International Organization for Standardization. http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/
- ISO 10993-10. (2010). Biological evaluation of medical devices—part 10: Tests for irritation and delayed-type hypersensitivity. International Organization for Standardization, Geneva.
- Jacobs, J. F., van de Poel, I., & Osseweijer, P. (2010). Sunscreens with Titanium Dioxide (TiO₂) Nano-Particles: A Societal Experiment. *NanoEthics*, 4(2), 103–113. <https://doi.org/10.1007/s11569-010-0090-y>
- Jayaram, D. T., Runa, S., Kemp, M. L., & Payne, C. K. (2017). Nanoparticle-induced oxidation of corona proteins initiates an oxidative stress response in cells. *Nanoscale*, 9(22), 7595–7601. <https://doi.org/10.1039/c6nr09500c>
- Julia de Toledo Bagatin, Denisse Esther Mallaupoma Camarena, Luciana Harumi Osaki, Vanessa M. Freitas, Renaira Oliveira da Silva, Juliana C. Lago Nold, Silvy Stuchi Maria-Engler. (2023). Bioprinted and manual human epidermis production: A compared performance for skin irritation tests *Bioprinting*, 29.
- Justine Victoria Sullivan e Simon Myers. (2022). Skin Structure and Function, Wound Healing and Scarring. *Plastic Surgery - Principles and Practice*, 1-14.
- Kannadhasan S., Nagarajan R. and Kanagaraj Venusamy. (2023). Recent Trends in Nanomaterials: Challenges and Opportunities. *Computer-Assisted Learning for Engaging Varying Aptitudes: From Theory to Practice*.
- Karimi, Mahsan; Sadeghi, Rohollah; Kokini, Jozef. (2018). Human exposure to nanoparticles through trophic transfer and the biosafety concerns that nanoparticle-contaminated foods pose to consumers. *Trends in Food Science & Technology*, 75, 129-145.
- Kato, S., Aoshima, H., Saitoh, Y., & Miwa, N. (2014). Fullerene-C60 derivatives prevent UV-irradiation/ TiO₂-induced cytotoxicity on keratinocytes and 3D-skin tissues through antioxidant actions. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14(5), 3285–3291. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24734542>
- Kim, H., Choi, J., Lee, H., Park, J., Yoon, B.-I., Jin, S. M., & Park, K. (2016). Skin Corrosion and Irritation Test of Nanoparticles Using Reconstructed Three-Dimensional Human Skin Model, EpiDerm TM. *Toxicological Research*, 32(4), 311–316. <https://doi.org/10.5487/TR.2016.32.4.311>

- Kongsong, P., Sikong, L., Niyomwas, S., & Rachpech, V. (2014). Photocatalytic antibacterial performance of glass fibers thin film coated with N-doped SnO₂/TiO₂. *The Scientific World Journal*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/869706>
- Kroll, A., & Hendrik, M. (2012). Interference of engineered nanoparticles with in vitro toxicity assays. 1123–1136. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0837-z>
- Kroll, A., Pillukat, M. H., Hahn, D., & Schnekenburger, J. (2009). Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72(2), 370–377. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.08.009>
- Lammel, T., & Sturve, J. (2018). NanoImpact Assessment of titanium dioxide nanoparticle toxicity in the rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) liver and gill cell lines RTL-W1 and RTgill-W1 under particular consideration of nanoparticle stability and interference with fluorometric assays. *NanoImpact*, 11(December 2017), 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2018.01.001>
- Leli Zeng, B. H. Jaswanth Gowda, Mohammed Gulzar Ahmed, Mohammed A. S. Abourehab, Zhe-Sheng Chen, Changhua Zhang, Jia Li & Prashant Kesharwani. (2023). Advancements in nanoparticle-based treatment approaches for skin cancer therapy. *Molecular Cancer*, 22.
- Lemper, M., De Paepe, K., Rogiers, V. (2014). Practical problems encountered during the cultivation of an open-source reconstructed human epidermis model on a polycarbonate membrane and protein quantification. *Skin Pharmacol. Physiol.* 27, 106–112. <http://dx.doi.org/10.1159/000351814>.
- Li, L., Fukunaga-Kalabis, M., & Herlyn, M. (2011). The three-dimensional human skin reconstruct model: A tool to study normal skin and melanoma progression. *Journal of Visualized Experiments*, 54. <https://doi.org/10.3791/2937>
- Liang Shang, Xinglu Zhou, Jiarui Zhang, Yujie Shi, and Lei Zhong. (2021). Metal Nanoparticles for Photodynamic Therapy: A Potential Treatment for Breast Cancer. *Molecules*, 26(21): 6532. Lisa Pokrajac, et al. (2021). Nanotechnology for a Sustainable Future: Addressing Global Challenges with the International Network. *Sustainable Nanotechnology. ACS Nano*, 15, 12, 18608–18623. Liu, Fan; Wang, Xiaohong (2020). Synthetic Polymers for Organ 3D Printing. *Polymers*, 12(8), 1765. doi:10.3390/polym12081765
- Liu, Fan; Wang, Xiaohong (2020). Synthetic Polymers for Organ 3D Printing. *Polymers*, 12(8), 1765. doi:10.3390/polym12081765
- Liu, W., Zhou, W., Liu, S., Zhang, C., Huang, S., Li, Y., & Hui, K. S. (2018). Electrical impedance performance of metal dry bioelectrode with different surface coatings. *Sensors and Actuators, A: Physical*, 269, 515–523. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2017.12.006>

- Lohmann, N., Schirmer, L., Atallah, P., Wandel, E., Ferrer, R. A., Werner, C., Simon, J. C., Franz, S., & Freudenberg, U. (2017). Glycosaminoglycan-based hydrogels capture inflammatory chemokines and rescue defective wound healing in mice. *Science Translational Medicine*, 9(386), eaai9044. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aai9044>
- Louro, H., Saruga, A., Santos, J., & Silva, M. J. (2019). Biological impact of metal nanomaterials in relation to their physicochemical characteristics. *Toxicology in Vitro*, 56, 172–183. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.01.018>
- Lüderwald, S., Dackermann, V., Seitz, F., Adams, E., Feckler, A., Schilde, C., Schulz, R., & Bundschuh, M. (2019). Science of the Total Environment A blessing in disguise? Natural organic matter reduces the UV light-induced toxicity of nanoparticulate titanium dioxide. *Science of the Total Environment*, 663, 518–526. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.282>
- Lupu, A. R., & Popescu, T. (2013). Toxicology in Vitro The noncellular reduction of MTT tetrazolium salt by TiO₂ nanoparticles and its implications for cytotoxicity assays. *Toxicology in Vitro*, 27(5), 1445–1450. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.03.006>
- Luz Fonacier, David Frankel, Stephanie Mawhirt. (2022). Contact allergens for the allergist. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 128, 6, 629-644.
- Maas-Szabowski, N., Stark, H.-J., & Fusenig, N. E. (2003). Cell Interaction and Epithelial Differentiation. In *Culture of Epithelial Cells* (pp. 31–63). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471221201.ch2>
- Mahmoudi, M. (2018). Debugging Nano–Bio Interfaces: Systematic Strategies to Accelerate Clinical Translation of Nanotechnologies. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 36, Issue 8, pp. 755–769). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.02.014>
- Magdalena Bauer, Magdalena Metzger, Marvin Corea, Barbara Schädli, Johannes Grillari and Peter Dungal. (2022). Novel 3D-Printed Cell Culture Inserts for Air–Liquid Interface Cell Culture. *Life*, 12(8), 1216.
- Martirosyan, A., & Schneider, Y. J. (2014). Engineered nanomaterials in food: Implications for food safety and consumer health. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 11, Issue 6, pp. 5720–5750). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijerph110605720>
- Mason, B. N., Starchenko, A., Williams, R. M., Bonassar, L. J., & Reinhart-King, C. A. (2013). Tuning three-dimensional collagen matrix stiffness independently of collagen concentration modulates endothelial cell behavior. *Acta Biomaterialia*, 9(1), 4635–4644. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.08.007>
- Mathes, S. H., Ruffner, H., & Graf-Hausner, U. (2014). The use of skin models in drug development. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vols. 69–70, pp. 81–102). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.12.006>

- Mello, D. F., Trevisan, R., Rivera, N., Geitner, N. K., di Giulio, R. T., Wiesner, M. R., Hsu-Kim, H., & Meyer, J. N. (2020). Caveats to the use of MTT, neutral red, Hoechst and Resazurin to measure silver nanoparticle cytotoxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 315, 108868. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108868>
- Messner, S., Agarkova, I., Moritz, W., & Kelm, J. M. (2013). Multi-cell type human liver microtissues for hepatotoxicity testing. *Archives of Toxicology*, 87(1), 209–213. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0968-2>
- Mewes, K.R., Fischer, A., Zoller, N.N., Laubach, V., Bernd, A., Jacobs, A., van Rompay, A., Liebsch, M., Pirow, R., Petersohn, D., (2016). Catch-up validation study of an in vitro skin irritation test method based on an open source reconstructed epidermis (phase I). *Toxicol. in Vitro*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2016.07.007>.
- Miyani, V. A., & Hughes, M. F. (2017). Assessment of the in vitro dermal irritation potential of cerium, silver, and titanium nanoparticles in a human skin equivalent model. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 36(2), 145–151. <https://doi.org/10.1080/15569527.2016.1211671>
- Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., & Altman, D. G. (2009). Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. *PLoS Med*, 6(7), 1–6.
- Molinari, J., Eskes, C., Andres, E., Remoué, N., Sá-Rocha, V. M., Hurtado, S. P., & Barrichello, C. (2013). Improved procedures for in vitro skin irritation testing of sticky and greasy natural botanicals. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 27(1), 441–450. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.08.002>
- Moniz, Tânia; Costa Lima, Sofia A.; Reis, Salette (2020). Human skin models: from healthy to disease mimetic systems characteristics and applications. *British Journal of Pharmacology*, 15184.
- Monteiro-Riviere, N. A., Wiench, K., Landsiedel, R., Schulte, S., Inman, A. O., & Riviere, J. E. (2011). Safety evaluation of sunscreen formulations containing titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in UVB sunburned skin: An In vitro and in vivo study. *Toxicological Sciences*, 123(1), 264–280. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr148>
- Morganti, P. (2010). Use and potential of nanotechnology in cosmetic dermatology. In *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* (Vol. 3, pp. 5–13). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/ccid.s4506>
- Naess, E. M., Hofgaard, A., Skaug, V., Gulbrandsen, M., Danielsen, T. E., Grahnedt, S., Skogstad, A., & Holm, J. Ø. (2016). Titanium dioxide nanoparticles in sunscreen penetrate the skin into viable layers of the epidermis: A clinical approach. In *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine* (Vol. 32, Issue 1, pp. 48–51). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/phpp.12217>

- Nagarajan, P., Gudde, R., & Srinivasan, R. (Eds.). (2021). *Fundamentals of Laboratory Animal Science: Principles and Practices*. doi:10.1007/978-981-16-0987-9
- National Toxicology Program. (2015). Handbook for conducting a literature-based health assessment using OHAT approach for systemic review and evidence integration. 1–98. https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/ohat/pubs/handbookjan2015_508.pdf
- Neupane, R., Boddu, S. H. S., Renukuntla, J., Babu, R. J., & Tiwari, A. K. (2020). Alternatives to biological skin in permeation studies: Current trends and possibilities. In *Pharmaceutics* (Vol. 12, Issue 2, p. 152). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020152>
- Nigam PK. (2009). Adverse reactions to cosmetics and methods of testing. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*.
- OECD. (1988). Tripartite biocompatibility guidance for medical devices. *Int. J. Toxicol.* 7, 504–507)
- OECD No. 431. (2015). Test No. 431: In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method. In Test No. 431: In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method. OECD. <https://doi.org/10.1787/9789264242753-en>
- OECD No.439. (2019). Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD. <https://doi.org/10.1787/9789264242845-en>
- Okamoto, T., & Yamaguchi, I. (2003). Optical Absorption Study of the Surface Plasmon Resonance in Gold Nanoparticles Immobilized onto a Gold Substrate by Self-Assembly Technique. *Journal of Physical Chemistry B*, 107(38), 10321–10324. <https://doi.org/10.1021/jp034537l>
- Ong, K. J., McCormack, T. J., Clark, R. J., Ede, J. D., Ortega, V. A., Felix, L. C., Dang, M. K. M., Ma, G., Fenniri, H., Veinot, J. G. C., & Goss, G. G. (2014). Widespread Nanoparticle-Assay Interference: Implications for Nanotoxicity Testing. 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090650>
- Panzarini, Elisa; Mariano, Stefania; Carata, Elisabetta; Mura, Francesco; Rossi, Marco; Dini, Luciana (2018). Intracellular Transport of Silver and Gold Nanoparticles and Biological Responses: An Update. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5), 1305.
- Park, Y.-H., Jeong, S. H., Yi, S. M., Choi, B. H., Kim, Y.-R., Kim, I.-K., Kim, M.-K., & Son, S. W. (2011). Analysis for the potential of polystyrene and TiO₂ nanoparticles to induce skin irritation, phototoxicity, and sensitization. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 25(8), 1863–1869. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.05.022>

- Pelclova, D., Navratil, T., Kacerova, T., Zamostna, B., Fenclova, Z., Vlckova, S., & Kacer, P. (2019). NanoTiO₂ sunscreen does not prevent systemic oxidative stress caused by UV radiation and a minor amount of NanoTiO₂ is absorbed in humans. *Nanomaterials*, 9(6), 888. <https://doi.org/10.3390/nano9060888>
- Pedrosa, Tatiana do Nascimento; Catarino, Carolina Motter; Pennacchi, Paula Comune; Assis, Sílvia Romano de; Gimenès, Fabrícia; Consolaro, Márcia Edilaine Lopes; Barros, Silvia Berlanga de Moraes; Maria-Engler, Silvya Stuchi (2017). A new reconstructed human epidermis for in vitro skin irritation testing. *Toxicology in Vitro*, 42(), 31–37. doi:10.1016/j.tiv.2017.03.010).
- Percie du Sert, Nathalie; Ahluwalia, Amrita; Alam, Sabina; Avey, Marc T.; Baker, Monya; Browne, William J.; Clark, Alejandra; Cuthill, Innes C.; Dirnagl, Ulrich; Emerson, Michael; Garner, Paul; Holgate, Stephen T.; Howells, David W.; Hurst, Viki; Karp, Natasha A.; Lazic, Stanley E.; Lidster, Katie; MacCallum, Catriona J.; Macleod, Malcolm; Pérola, Esther J.; Petersen, Ole H.; Rawle, Frances; Reynolds, Penny; Rooney, Kieron; Sena, Emily S.; Silberberg, Shai D.; Steckler, Thomas; Würbel, Hanno; Boutron, Isabelle (2020). Relatando pesquisas com animais: Explicação e elaboração das diretrizes ARRIVE 2.0. *PLOS Biology*, 18(7)
- Ponec, M., Boelsma, E., Gibbs, S., & Mommaas, M. (2002). Characterization of reconstructed skin models. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 15(SUPPL. 1), 4–17. <https://doi.org/10.1159/000066682>
- Ponec, M., Boelsma, E., Weerheim, A., Mulder, A., Bouwstra, J., & Mommaas, M. (2000). Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models. *International Journal of Pharmaceutics*, 203(1–2), 211–225. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(00\)00459-2](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00459-2)
- Ponec, M., Weerheim, A., Kempenaar, J., Mulder, A., Gooris, G. S., Bouwstra, J., & Mommaas, A. M. (1997). The formation of competent barrier lipids in reconstructed human epidermis requires the presence of vitamin C. *Journal of Investigative Dermatology*, 109(3), 348–355. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12336024>
- Rafaela García-Álvarez e María Vallet-Regí; (2021). Hard and Soft Protein Corona of Nanomaterials: Analysis and Relevance. *Nanomaterials*, 11, 888
- Ramasamy, Srinivas; Davoodi, Pooya; Vijayavenkataraman, Sanjairaj; Teoh, Jia Heng; Thamizhchelvan, Anbu Mozhi; Robinson, Kim Samirah; Wu, Bin; Fuh, Jerry Y.H.; DiColandrea, Teresa; Zhao, Helen; Lane, Ellen Birgitte; Wang, Chi-Hwa (2021). Optimized construction of a full thickness human skin equivalent using 3D bioprinting and a PCL/collagen dermal scaffold. *Bioprinting*, 21.
- Randall, M. J., Jüngel, A., Rimann, M., & Wuertz-Kozak, K. (2018). Advances in the biofabrication of 3D skin in vitro: Healthy and pathological models. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 6, Issue OCT). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00154>

- Raunio, H. (2011). In silico toxicology non-testing methods. *Frontiers in Pharmacology*, JUN. <https://doi.org/10.3389/fphar.2011.00033>
- Research and Markets. (2016). Titanium Dioxide (TiO₂) - A Global Market Overview. <https://www.researchandmarkets.com/reports/3801998/titanium-dioxide-tio2-a-global-market-overview>
- Ribeiro, A. R., Gemini-Piperni, S., Travassos, R., Lemgruber, L., Silva, R. C., Rossi, A. L., Farina, M., Anselme, K., Shokuhfar, T., Shahbazian-Yassar, R., Borojevic, R., Rocha, L. A., Werckmann, J., & Granjeiro, J. M. (2016). Trojan-Like Internalization of Anatase Titanium Dioxide Nanoparticles by Human Osteoblast Cells. *Scientific Reports*, 6(1), 23615. <https://doi.org/10.1038/srep23615>
- Ribeiro, A. R., Leite, P. E., Falagan-Lotsch, P., Benetti, F., Micheletti, C., Budtz, H. C., Jacobsen, N. R., Lisboa-Filho, P. N., Rocha, L. A., Kühnel, D., Hristozov, D., & Granjeiro, J. M. (2017). Challenges on the toxicological predictions of engineered nanoparticles. *NanoImpact*, 8, 59–72. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2017.07.006>
- Russell, W.M.S., Burch, R.L., Hume, C.W., (1959). *The Principles Of Humane Experimental Technique*.
- Sahana, T. G., & Rekha, P. D. (2018). Biopolymers: Applications in wound healing and skin tissue engineering. In *Molecular Biology Reports* (Vol. 45, Issue 6, pp. 2857–2867). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4296-3>
- Salamanna, F., Contartese, D., Maglio, M., & Fini, M. (2016). A systematic review on in vitro 3D bone metastases models: A new horizon to recapitulate the native clinical scenario, 7(28).
- Salmiah Kasolang, Wan Afiqah Adlina, Norhanifah Abdul Rahman, Nik Roselina Nik Roseley. (2020). Common skin disorders: A review. *Jurnal Tribologi* 25, 59-82
- Sanches, P. L., Souza, W., Gemini-Piperni, S., Rossi, A. L., Scapin, S., Midlej, V., Sade, Y., Leme, A. F. P., Benchimol, M., Rocha, L. A., Carias, R. B. V., Borojevic, R., Granjeiro, J. M., & Ribeiro, A. R. (2019). Rutile nano-bio-interactions mediate dissimilar intracellular destiny in human skin cells. *Nanoscale Advances*, 1(6), 2216–2228. <https://doi.org/10.1039/c9na00078j>
- Sant, S., & Johnston, P. A. (2017). The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery. In *Drug Discovery Today: Technologies* (Vol. 23, pp. 27–36). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2017.03.002>
- Sarmiento, B., Andrade, F., Baptista, S., & Rodrigues, F. (2012). Cell-based in vitro models for predicting drug permeability. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol*, 8, 607–621.
- Sarmiento, B., Andrade, F., da Silva, S. B., Rodrigues, F., das Neves, J., & Ferreira, D. (2012). Cell-based in vitro models for predicting drug permeability. In *Expert Opinion*

on Drug Metabolism and Toxicology (Vol. 8, Issue 5, pp. 607–621).
<https://doi.org/10.1517/17425255.2012.673586>

Schäfer-Korting, M., Bock, U., Diembeck, W., Düsing, H. J., Gamer, A., Haltner-Ukomadu, E., Hoffmann, C., Kaca, M., Kamp, H., Kersen, S., Kietzmann, M., Korting, H. C., Krächter, H. U., Lehr, C. M., Liebsch, M., Mehling, A., Müller-Goymann, C., Netzlaff, F., Niedorf, F., ... Weimer, M. (2008). The use of reconstructed human epidermis for skin absorption testing: Results of the validation study. *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*, 36(2), 161–187.
<https://doi.org/10.1177/026119290803600207>

Schardt, C., Adams, M. B., Owens, T., Keitz, S., & Fontelo, P. (2007). Utilization of the PICO framework to improve searching PubMed for clinical questions. *BMC Medical Informatics and Decision Making*, 7(16), 1–6.

Schneider, K., Schwarz, M., Burkholder, I., Kopp-Schneider, A., Edler, L., Kinsner-Ovaskainen, A., Hartung, T., & Hoffmann, S. (2009). “ToxRTool”, a new tool to assess the reliability of toxicological data. *Toxicology Letters*, 189(2), 138–144.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.05.013>

Schwirn, K., Tietjen, L., & Beer, I. (2014). Why are nanomaterials different and how can they be appropriately regulated under REACH? In *Environmental Sciences Europe* (Vol. 26, Issue 1, p. 4). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1186/2190-4715-26-4>

Semenzin, E., Lanzellotto, E., Hristozov, D., Critto, A., Zabeo, A., Giubilato, E., & Marcomini, A. (2015). Species sensitivity weighted distribution for ecological risk assessment of engineered nanomaterials: The n-TiO₂ case study. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(11), 2644–2659. <https://doi.org/10.1002/etc.3103>

Sethi, D., Pal, A., Sakthivel, R., Pandey, S., Dash, T., Das, T., & Kumar, R. (2014). Water disinfection through photoactive modified titania. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 130, 310–317.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.12.003>

Shakeel, M., Jabeen, F., Shabbir, S., Asghar, M. S., Khan, M. S., & Chaudhry, A. S. (2016). Toxicity of Nano-Titanium Dioxide (TiO₂-NP) Through Various Routes of Exposure: a Review. In *Biological Trace Element Research* (Vol. 172, Issue 1, pp. 1–36). Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0550-x>

Sharifi, S., Behzadi, S., Laurent, S., & Forrest, M. L. (2012). Chem Soc Rev Toxicity of nanomaterials. 2323–2343. <https://doi.org/10.1039/c1cs15188f>

Sharma, S., Sharma, R. K., Gaur, K., Torres, J. F. C., Loza-Rosas, S. A., Torres, A., Saxena, M., Julin, M., & Tinoco, A. D. (2019). Fueling a hot debate on the application of TiO₂ nanoparticles in sunscreen. In *Materials* (Vol. 12, Issue 14, p. 2317). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ma12142317>

- Shetti, N. P., Bukkitgar, S. D., Reddy, K. R., Reddy, C. V., & Aminabhavi, T. M. (2019). Nanostructured titanium oxide hybrids-based electrochemical biosensors for healthcare applications. In *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (Vol. 178, pp. 385–394). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.03.013>
- Shi, H., Magaye, R., Castranova, V., & Zhao, J. (2013). Titanium dioxide nanoparticles: A review of current toxicological data. *Particle and Fibre Toxicology*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-15>
- Shima Tavakoli e Agnes S. Klar; (2021). Bioengineered Skin Substitutes: Advances and Future Trends. *Applied Sciences*. 11, 1493.
- Shukla, R. K., Kumar, A., Vallabani, N. V. S., Pandey, A. K., & Dhawan, A. (2014). Titanium dioxide nanoparticle-induced oxidative stress triggers DNA damage and hepatic injury in mice. *Nanomedicine*, 9(9), 1423–1434. <https://doi.org/10.2217/nnm.13.100>
- Singh, A. V., Laux, P., Luch, A., Sudrik, C., Wild, A., Santamauro, G., Bill, J., & Sitti, M. (2019). Review of emerging concepts in nanotoxicology: opportunities and challenges for safer nanomaterial design. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 0(0), 000. <https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1566425>
- Ströbel, S., Buschmann, N., Neeladkandhan, A., Messner, S., & Kelm, J. M. (2016). Characterization of a novel in vitro 3D skin microtissue model for efficacy and toxicity testing. *Toxicology Letters*, 258, S156–S157. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.06.1596>
- Suhail, S., Sardashti, N., Jaiswal, D., Rudraiah, S., Misra, M., & Kumbar, S. G. (2019). Engineered Skin Tissue Equivalents for Product Evaluation and Therapeutic Applications. *Biotechnology Journal*, 1900022.
- Suresh Sagadevan, Shahla Imteyaz, Baranya Murugan, Jayasingh Anita Lett, Nanthini Sridewi, Getu Kassegn Weldegebrieal, Is Fatimah and Won-Chun Oh. (2022) A comprehensive review on green synthesis of titanium dioxide nanoparticles and their diverse biomedical applications. *Green Processing and Synthesis*, 11.
- Swapnil M. Patil, Niraj R. Rane, Paul O. Bankole, Prakash Krishnaiah, Yongtae Ahn, Young- Kwon Park, Krishna Kumar Yadav, Mahammed A. Amin, Byong-Hun Jeon. (2022). An assessment of micro- and nanoplastics in the biosphere: A review of detection, monitoring, and remediation technology. *Chemical Engineering Journal*, 430, Part 2, 132913.
- Szymanski, Lukasz; Jederka, Krystyna; Cios, Aleksandra; Ciepelak, Martyna; Lewicka, Aneta; Stankiewicz, Wanda; Lewicki, Slawomir (2020). A Simple Method for the Production of Human Skin Equivalent in 3D, Multi-Cell Culture. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(13), 4644.
- Tan, M. H., Commens, C. A., Burnett, L., & Snitch, P. J. (1996). A pilot study on the percutaneous absorption of microfine titanium dioxide from sunscreens. *Australasian Journal of Dermatology*, 37(4), 185–187. <https://doi.org/10.1111/j.1440-0960.1996.tb01050.x>

- Tang, Y., Cai, R., Cao, D., Kong, X., & Lu, Y. (2018). Photocatalytic production of hydroxyl radicals by commercial TiO₂ nanoparticles and phototoxic hazard identification. *Toxicology*, 407(January), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.05.010>
- Tang, Y., Li, X. L., Xu, S., Fan, X. Y., Huang, Y. Y., Yang, F. G., Jin, C., & Yang, Y. J. (2010). Cellular Toxicity of TiO₂ Nanoparticles in Anatase and Rutile Crystal Phase. *Biological Trace Element Research*, 141(1–3), 3–15. <https://doi.org/10.1007/s12011-010-8707-0>
- Taurozzi, J. S., Hackley, V. A., & Wiesner, M. R. (2013). A standardised approach for the dispersion of titanium dioxide nanoparticles in biological media. *Nanotoxicology*, 7(4), 389–401. <https://doi.org/10.3109/17435390.2012.665506>
- Téllez-Soto, Claudio A.; Pereira Silva, Michely G.; dos Santos, Laurita; de O. Mendes, Thiago; Singh, Priyanka; Fortes, Sabrina A.; Favero, Priscila; Martin, Ailton A. (2021). In vivo determination of dermal water content in chronological skin aging by confocal Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 112(), 103196.
- Thales de A. Tréz. (2015). The characterization of the use of animals in teaching from the perception of students of biological and health sciences. <https://doi.org/10.1590/S0104-59702015000300012>
- Tiwari, N., Osorio Blanco, E., Sonzogni, A., Esporrín-Ubieto, D., Wang, H., & Calderon, M. (2021). Nanocarriers para aplicações na pele: onde estamos? *Angewandte Chemie International Edition*.
- Torchilin, V. P. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 4, Issue 2, pp. 145–160). <https://doi.org/10.1038/nrd1632>
- Tucci, P., Porta, G., Agostini, M., Dinsdale, D., Iavicoli, I., Cain, K., Finazzi-Agró, A., Melino, G., & Willis, A. (2013). Metabolic effects of TiO₂ nanoparticles, a common component of sunscreens and cosmetics, on human keratinocytes. *Cell Death and Disease*, 4(3), e549–e549. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.76>
- Uboldi, C., Urbán, P., Gilliland, D., Bajak, E., Valsami-Jones, E., Ponti, J., & Rossi, F. (2016). Role of the crystalline form of titanium dioxide nanoparticles: Rutile, and not anatase, induces toxic effects in Balb/3T3 mouse fibroblasts. *Toxicology in Vitro*, 31, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.11.005>
- Uwe Marx, et al. (2019). Biology-Inspired Microphysiological Systems to Advance Patient Benefit and Animal Welfare in Drug Development. *ALTEX*, 37(3): 365–394.
- Vaibhav Garg; Bruce Brod; Anthony A. Gaspari; (2021). Teste de contato: usos, sistemas, riscos/benefícios e seu papel no manejo do paciente com dermatite de contato. *Clínicas de Dermatologia*.
- Valdman-Grinshpoun, Y., Ben-Amitai, D., & Zvulunov, A. (2012). Barrier-restoring therapies in atopic dermatitis: Current approaches and future perspectives. In

- Vertuani S., Cesa E., Battistin M., Ziosi P. and Manfredini S. (2022). Safe by Design of nanomaterials in industrial production processes: nanomaterials in the cosmetic field. *Mater. Sci. Eng.* 1265 012007.
- Vinardell, M. P., & Mitjans, M. (2008). Alternative methods for eye and skin irritation tests: An overview. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(1), 46–59. <https://doi.org/10.1002/jps.21088>
- (Vinardell MP and Mitjans M. (2017). Alternative Methods to Animal Testing for the Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients: An Overview. *Cosmetics*.
- Vitoretì, A. B. F., Vaz, R.,; Pena, A. L. ;, Raphael, E. ;, Ferrari, J. L. ;, & Schiavon, M. A. (2017). Titanium dioxide application in solar cells (Vol. 2017, Issue 4). <http://rvq.s bq.org.br>
- Wang, S. Q., & Tooley, I. R. (2011). Photoprotection in the era of nanotechnology. In *Seminars in cutaneous medicine and surgery* (Vol. 30, Issue 4, pp. 210–213). <https://doi.org/10.1016/j.sder.2011.07.006>
- Wang, Yurong, Cui, H., Zhou, J., Li, F., Wang, J., Chen, M., & Liu, Q. (2015). Cytotoxicity, DNA damage, and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(7), 5519–5530. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3717-7>
- Wang, Yuzhen, Xu, R., He, W., Yao, Z., Li, H., Zhou, J., Tan, J., Yang, S., Zhan, R., Luo, G., & Wu, J. (2015). Three-Dimensional Histological Structures of the Human Dermis. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 21(9), 932–944. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2014.0578>
- Wikramanayake, T. C.; Stojadinovic, O.; Tomic-canic, M. (2014). Epidermal Differentiation in Barrier Maintenance and Wound Healing. *Advances in WoundCare*, v. 3, n. 3, p. 272–280.
- Wilson, R. (2008). The use of gold nanoparticles in diagnostics and detection. *Chemical Society Reviews*, 37(9), 2028–2045. <https://doi.org/10.1039/b712179m>
- Wu, Aiguo; Ren, Wenzhi (2020). TiO₂ Nanoparticles. Applications in Nanobiotechnology and Nanomedicine, 67–103.
- Wu, F., & Hicks, A. L. (2020). Estimating human exposure to titanium dioxide from personal care products through a social survey approach. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 16(1), 10–16. <https://doi.org/10.1002/ieam.4197>
- Wu, Tianshu; Tang, Meng (2017). A resposta inflamatória às nanopartículas de prata e dióxido de titânio no sistema nervoso central. *Nanomedicina*.

- Xu, M., Li, J., Iwai, H., Mei, Q., Fujita, D., Su, H., Chen, H., & Hanagata, N. (2012). Formation of nano-bio-complex as nanomaterials dispersed in a biological solution for understanding nanobiological interactions. *Scientific Reports*, 2(1), 406. <https://doi.org/10.1038/srep00406>. Yaqoob, Sundas Bahar; Adnan, Rohana; Rameez Khan, Raja Muhammad; Rashid, Mohammad (2020). Gold, Silver, and Palladium Nanoparticles: A Chemical Tool for Biomedical Applications. *Frontiers in Chemistry*, 8(), 376–. doi:10.3389/fchem.2020.00376
- Yifeng Cao, Xinyan Dong, and Xuepeng Chen. (2022). Polymer-Modified Liposomes for Drug Delivery: From Fundamentals to Applications. *Pharmaceutics*, 14(4): 778.
- Yoo, Jounghyun; Kim, Hyemin; Chang, Heemin; Park, Wonchan; Hahn, Sei Kwang; Kwon, Woosung (2020). Biocompatible Organosilica Nanoparticles with Self-encapsulated Phenyl Motifs for Effective UV Protection. *ACS Applied Materials & Interfaces*.
- Yoshito, D. (2011). Cultivo e irradiação de fibroblastos humanos em meio enriquecido com lisado de plaquetas para obtenção de camada de sustentação em cultura de células da epiderme.
- Zannatul Ferdous and Abderrahim Nemmar. (2020). Health Impact of Silver Nanoparticles: A Review of the Biodistribution and Toxicity Following Various Routes of Exposure. *Int. J. Mol. Sci*, 21(7), 2375.
- Zanoni, Michele; Cortesi, Michela; Zamagni, Alice; Arienti, Chiara; Pignatta, Sara; Tesei, Anna (2020). Modeling neoplastic disease with spheroids and organoids. *Journal of Hematology & Oncology*, 13(1), 97
- Zhao, Y., Howe, J. L. C., Yu, Z., Leong, D. T., Chu, J. J. H., Loo, J. S. C., & Ng, K. W. (2013). Exposure to titanium dioxide nanoparticles induces autophagy in primary human keratinocytes. *Small*, 9(3), 387–392. <https://doi.org/10.1002/smll.201201363>
- Ziental, D., Czarczynska-Goslinska, B., Mlynarczyk, D. T., Glowacka-Sobotta, A., Stanisz, B., Goslinski, T., & Sobotta, L. (2020). Titanium dioxide nanoparticles: Prospects and applications in medicine. In *Nanomaterials* (Vol. 10, Issue 2, p. 387). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nano10020387>

8. Anexo 1: Artigo de Revisão sistemática



Toxicity Evaluation of TiO₂ Nanoparticles on the 3D Skin Model: A Systematic Review

OPEN ACCESS

Edited by:

Jianbo Jia,
Guangzhou University, China

Reviewed by:

Xiaofei Zhou,
Hebei Agricultural University, China
Hainan Sun,
Shandong University, China

*Correspondence:

José Mauro Granjeiro
jmgranjeiro@gmail.com
Ana Rosa Lopes Ribeiro
analopes0781@gmail.com

†Present address:

Ana Rosa Lopes Ribeiro,
3B's Research Group, Research
Institute on Biomaterials,
Biodegradables and Biomimetics,
Headquarters of the European
Institute of Excellence on Tissue
Engineering and Regenerative
Medicine, University of Minho,
Guimarães, Portugal

Specialty section:

This article was submitted to
Nanobiotechnology,
a section of the journal
Frontiers in Bioengineering and
Biotechnology

Received: 23 December 2019

Accepted: 12 May 2020

Published: 10 June 2020

Citation:

Sanches PL, Geaquinto LRO, Cruz R,
Schuck DC, Lorencini M, Granjeiro JM
and Ribeiro ARL (2020) Toxicity
Evaluation of TiO₂ Nanoparticles on
the 3D Skin Model: A
Systematic Review.
Front. Bioeng. Biotechnol. 8:575.
doi: 10.3389/fbioe.2020.00575

Priscila Laviola Sanches^{1,2}, Luths Raquel de Oliveira Geaquinto^{2,3}, Rebecca Cruz⁴,
Desirée Cigaran Schuck⁵, Márcio Lorencini⁵, José Mauro Granjeiro^{1,2,3,4*} and
Ana Rosa Lopes Ribeiro^{1,3*†}

¹ Postgraduate Program in Translational Biomedicine, University of Grande Rio, Duque de Caxias, Brazil, ² Directory of
Metrology Applied to Life Sciences, National Institute of Metrology, Quality and Technology, Duque de Caxias, Brazil,

³ Postgraduate Program in Biotechnology, National Institute of Metrology Quality and Technology, Duque de Caxias, Brazil,

⁴ Fluminense Federal University, Rio de Janeiro, Brazil, ⁵ Pesquisa e Desenvolvimento, Grupo Boticário, Curitiba, Brazil

Titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs) are regularly used in sunscreens because of their photoprotective capacity. The advantage of using TiO₂ on the nanometer scale is due to its transparency and better UV blocking efficiency. Due to the greater surface area/volume ratio, NPs become more (bio)-reactive giving rise to concerns about their potential toxicity. To evaluate the irritation and corrosion of cosmetics, 3D skin models have been used as an alternative method to animal experimentation. However, it is not known if this model is appropriate to study skin irritation, corrosion and phototoxicity of nanomaterials such as TiO₂ NPs. This systematic review (SR) proposed the following question: Can the toxicity of TiO₂ nanoparticles be evaluated in a 3D skin model? This SR was conducted according to the Preliminary Report on Systematic Review and Meta-Analysis (PRISMA). The protocol was registered in CAMARADES and the ToxRTool evaluation was performed in order to increase the quality and transparency of this search. In this SR, 7 articles were selected, and it was concluded that the 3D skin model has shown to be promising to evaluate the toxicity of TiO₂ NPs. However, most studies have used biological assays that have already been described as interfering with these NPs, demonstrating that misinterpretations can be obtained. This review will focus in the possible efforts that should be done in order to avoid interference of NPs with biological assays applied in 3D *in vitro* culture.

Keywords: titanium dioxide, nanoparticles, 3D skin model, alternative method, toxicity

INTRODUCTION

The development of the nanotechnology area, concerning to the nanomaterials production, is in exponential growth (Wang and Tooley, 2011). According to the International Organization for Standardization (ISO), nanomaterial is defined as natural, incidental or manufactured material containing particles (unbound, aggregated, agglomerated state), where 50% or more of the particles, have one or more external dimensions in the size range between 1 and 100 nm (Potočnik, 2011; International Organization for Standardization, 2017).

Due to their nano dimensions, they can effectively have electrical, thermal, and mechanical features, desirable for several applications (Davis et al., 2010; Louro et al., 2019; Lüderwald et al., 2019). Consequently, the human exposure to nanoparticles (NPs) increased as a result of their use in industries such as: food, pharmaceutical, cosmetic, biomedical (medical devices: implants, prostheses, controlled drug delivery systems), aeronautics, textiles as well as environmental engineering (Kongsong et al., 2014; Sethi et al., 2014; Semenzin et al., 2015; Miyani and Hughes, 2016; Hanawa, 2019; Shetti et al., 2019).

Regarding cosmetics, it is already known that many products contain various types of nanometric materials such as: gold, zinc oxide, titanium dioxide, nanotubes, fullerenes, among others (Morganti, 2010). Some of the referred nanostructures were introduced in sunscreens, with the final goal of protecting skin from solar radiation, reducing the chances of melanoma and also early skin aging (Wolf et al., 2001; Rampaul et al., 2007). NPs are among the best photoprotective agents since they are able to block the ultraviolet radiation incidence (González et al., 2008). Currently, titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs) are the nanostructures mostly used in commercially available sunscreens, due to their ability to reflect and spread ultraviolet A (UVA, 320–400 nm) and ultraviolet B (UVB, 290–320 nm) rays, protecting against sunburn and photoaging (Monteiro-Riviere et al., 2011; Martirosyan and Schneider, 2014). TiO₂ was previously classified as an inert particle, unable to be absorbed by the skin (Nohynek et al., 2007). When these sunscreens were created, TiO₂ was used in the micrometric scale, being visible in the skin as an opaque layer. With the advancement of nanotechnology and aiming to solve this undesirable visual effect, TiO₂ NPs were introduced in the formulations. The EU's Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) approved nanometric titanium dioxide (in the three crystalline forms) to be considered safe for use in cosmetic products intended for application on healthy, intact or sunburnt skin. As UV filter it can be introduced in cosmetic formulations at a maximum concentration of 25%, except in applications that may lead to exposure of the end user's lungs by inhalation. The benefits of using TiO₂ NPs is their high surface area, increased properties of scattering and reflection of ultraviolet rays and transparency in visible light (Wiesenthal et al., 2011). In contrast, this size reduction of TiO₂, increases their chances of internalization by skin cells with possible biological consequences to consumers.

Some *in vitro* literature already described that TiO₂ NPs induce toxicity, inflammation and genetic modifications that is enhanced upon UVA and UVB exposure (Jin et al., 2011; Shi et al., 2013; Tucci et al., 2013; Zhao et al., 2013; Wang et al., 2014). The possible mechanisms of toxicity include oxidative stress, where TiO₂ NPs trigger the formation of reactive oxygen species (ROS) in different dermal cell lines (Tucci et al., 2013; Zhao et al., 2013; Wang et al., 2014; Foroozandeh and Aziz, 2015). ROS involvement in oxidative DNA damage, in human epidermal, HaCaT cells (Shukla et al., 2014) and human dermal fibroblasts (Saqib et al., 2012) was already reported. Resuming dermal toxicity is associated with ROS generation, oxidative stress, and collagen depletion that promote skin aging (Wu et al., 2009). Actually, the strategy in the sunscreen industry is to coat

nano-TiO₂ in order to minimize their potential toxicity (Dréno et al., 2019). Compounds such as: silica, alumina, cetylphosphate, manganese dioxide, triethoxycaprylsilane, PEG among others, contribute to making sunscreens more passive, improving their ability of capture or inhibit the formation of free radicals' species as well as to restrain NPs penetration in the skin (Filipe et al., 2009; Osmond and McCall, 2010; Smijs and Pavel, 2011). These alterations in NPs surface characteristics give rise to the need of a new set of physicochemical characterization, *in vitro* and *in vivo* evaluation, since surface modification regulates both inter-particle and cell-NP interactions, mediating corona formation that is widely known to induce specific cellular responses such as cellular uptake, intracellular trafficking, accumulation and biodistribution (Oberdörster et al., 2005; Filipe et al., 2009; Osmond and McCall, 2010; Foroozandeh and Aziz, 2015; Ribeiro et al., 2017; Sanches et al., 2019). Results suggest that benefitting from a physical barrier in the form of a coating minimizes ROS formation and consequent dermal toxicity (Yu et al., 2020).

The *in vitro* and *in vivo* data regarding the potential of dermal absorption and/or penetration of TiO₂ NPs from sunscreens exhibit controversial results. Although several articles describe the opposite (Filipe et al., 2009; Senzui et al., 2010; Crosera et al., 2015), the penetration of TiO₂ NPs in healthy as well as in damaged or lesioned skin (such as in cases of scarring, sunburn and depilated skin) is demonstrated in the scientific community (Tan et al., 1996; Lekki et al., 2007; Gontier et al., 2008; Schneider M. et al., 2009; Lin et al., 2011; Monteiro-Riviere et al., 2011; Larese Filon et al., 2013; Gulson et al., 2015; Shakeel et al., 2016; Touloumes et al., 2020), with damaged or lesioned skin being more susceptible to TiO₂ NPs penetration (Tan et al., 1996; Lekki et al., 2007; Gontier et al., 2008; Schneider M. et al., 2009; Lin et al., 2011; Monteiro-Riviere et al., 2011; Larese Filon et al., 2013; Gulson et al., 2015; Shakeel et al., 2016; Touloumes et al., 2020). Prolonged application of TiO₂ NPs sunscreens in healthy human skin, reveal the detection of titanium levels in the epidermis and dermis of patients (Tan et al., 1996; Lin et al., 2011; Gulson et al., 2015; Næss et al., 2015; Shakeel et al., 2016). Recently, although the study has some limitations (few number of volunteers), Pelclova et al. using highly sensitive characterization techniques detected TiO₂ NPs in plasma and urine after 6 to 48 h after sunscreen exposure, demonstrating that TiO₂ NPs can pass the healthy protective layers of human skin and enter in blood circulation, even with lower exposure times of sunscreen application (Pelclova et al., 2019). The penetration of NPs is not exclusive to TiO₂ NPs, with Brian Gulson et al. reporting also the detection of zinc oxide used in sunscreens in human blood and urine (Gulson et al., 2010). From our point of view, and also already stated by OECD report that evaluate the *in vitro* methods for human hazard assessment of nanomaterials (Organisation for Economic Co-operation Development, 2018), there exist many critical points in the available literature that contribute to all the controversy regarding TiO₂ NPs penetration in human skin. It is important to refer that several factors such as: the model employed (animal, human with variations in gender), size, chemical composition and coating of NPs, site of application, particle solubility, dose and number of applications, period of the study, the flexion motion of skin, UV exposure

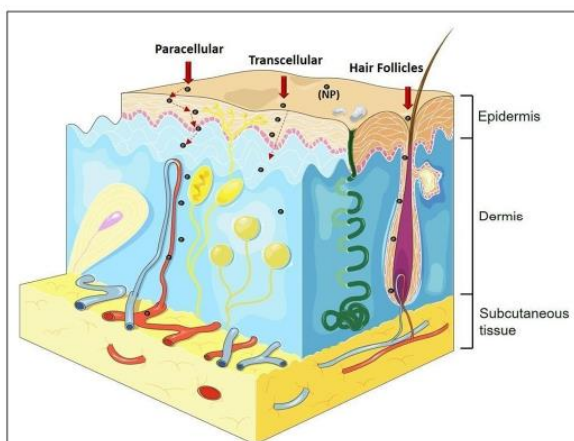


FIGURE 1 | Different pathways of nanoparticle penetration. Paracellular transport (between cells), transcellular transport (inside the cells), transport by hair follicles, sweat glands, skin folds or a combination of all. Image adapted from: <https://smart.servier.com>.

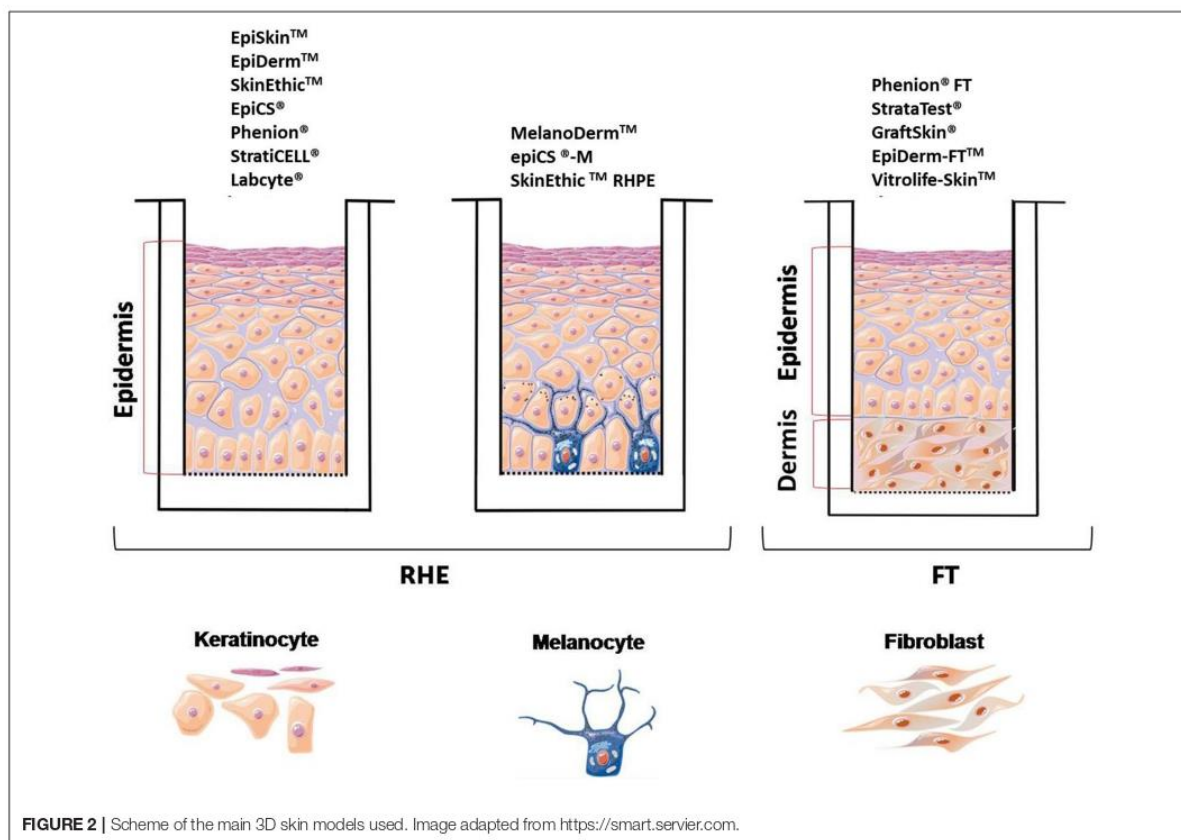
among others, influence the dermal penetration of nanoparticles (Gulson et al., 2015; Shakeel et al., 2016). To the best of our knowledge, most of the studies are performed with a strong variety of conditions and methodologies, where no standardized protocols and reference nanomaterials are used. More important is that the characterization techniques used to evaluate NPs skin penetration were sometimes entering in the detection limit of the equipment, contribute to all this controversy.

The mechanism of penetration of sunscreen nanoparticles was not clarified, however, it is suggested that TiO₂ NPs can be absorbed follow different pathways that include the transcellular and paracellular transports, as well as hair follicles (transappendageal), sweat glands, skin folds or a combination of all, as shown in **Figure 1** (Filipe et al., 2009; Wu et al., 2009). The fact that upon skin penetration, NPs can reach the bloodstream, and then undergo translocation to various distant tissues and organs, suggest that prolonged time exposure to NPs, may pose a health risk to consumers (Lademann et al., 1999; Baroli et al., 2007; Lekki et al., 2007; Saquib et al., 2012; Shakeel et al., 2016).

As previously described, there are already many *in vitro* (using 2D models) and *in vivo* (using animals) studies on the cytotoxicity and genotoxicity effect of TiO₂ NPs. However, cosmetic industries are using alternative methods, such as 3D skin reconstructed models, due to ethical, scientific and economic considerations. The EU cosmetic legislation is working toward the abolition of animal testing for cosmetics and their ingredients (Evans et al., 2016; Salamanna et al., 2016; Caddeo et al., 2017; Alépée et al., 2018; Owen et al., 2018). In fact, 3D engineered models mimicking human tissues are under development to overcome the limitations of 2D *in vitro* models regarding their limited predictivity (Verneti et al., 2017). Currently, there are commercially available 3D skin models as well as in-house constructs with several

levels of biological complexity. **Figure 2** exhibits some of the commercially available models.

The simplest model consists of an epidermis where only keratinocytes are used, it is known as reconstructed human epidermis (RHE) and it is commercially available as EpiDermTM (MatTek Corp), EpiSkinTM and SkinEthicTM (a subsidiary of L'Oréal). They make use of reconstructed human epidermis, which closely mimics the histological, morphological, biochemical, and physiological properties of the epidermal layer of human skin (Kim et al., 2016). The advantage of RHE models is that they contain all the epidermal layers of skin, with the main disadvantage of, it is not always possible to distinguish the basale, spinosum and granulosum stratum, important issue for penetration studies. Also, a low intra-batch variation and sometimes a high inter-batch variation is observed (Mathes et al., 2013; Almeida et al., 2017). In April 2007, EpiSkinTM and EpiDermTM models were approved by ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) to replace *in vivo* rabbit skin irritation test. They are also used for other regulatory purposes, such as *in vitro* skin irritation (OECD TG 439) and skin corrosion (OECD TG 431) tests of cosmetic ingredients. An update in 2019 was made to include two additional models namely SkinEthicTM and epiCS[®] (OECD, 2014, 2019). Besides that, these models are widely used for phototoxicity, genotoxicity, sensitization, metabolism tests as well as to test the administration of transdermal drugs (Mathes et al., 2013; Almeida et al., 2017). EpiSkin, for example, is an *in vitro* reconstructed human epidermis from normal human keratinocytes cultured on a collagen matrix at the air-liquid interface that is validated for skin corrosion/irritation studies (Alépée et al., 2018; Liu et al., 2018). Cell viability is the main endpoint, however complementary assays can be performed, such as gene array, histological, morphological analysis and cytokine release (Sarmiento et al., 2012; Almeida et al., 2017). The Full-Thickness Skin Model (FT), commercially known as EpiDerm-FTTM is a more elaborated model that consists of an epidermis and dermis (keratinocytes and fibroblasts) and has been widely used in drug or efficacy treatments (Mathes et al., 2013). This model has the advantage of providing wall-to-wall tissue, as well as having a basal membrane similar to *in vivo* when compared to RHE models (simplest model). The permeability of RHE models is inferior to human and pig skin, however they are accepted to test *in vitro* permeation and penetration studies when drugs are applied as aqueous solutions (Asbill et al., 2000; Schäfer-Korting et al., 2008; Neupane et al., 2020). Resuming for *in vitro* skin corrosion tests following OECD TG 431, the commercially available models are: EpiSkinTM Standard Model (SM), EpiDermTM SCT, SkinEthicTM RHE, epiCS[®], and LabCyte EPI-MODEL24 SCT (OECD, 2014). Regarding *in vitro* skin irritation following TG 439 the used models are: EpiSkinTM (SM), EpiDermTM (SIT), SkinEthicTM (RHE), LabCyte EPI-MODEL24 SIT, epiCS[®] and Skin+[®] (OHAT, 2015). In order to test sun care products companies are also developing 3D skin models incorporating melanocytes (e.g., MelanoDermTM, MatTek corp.; epiCS[®]-M, ATERA SAS & CellSystems GmbH; and SkinEthicTM RHPE subsidiary of L'Oréal). Although 3D skin models have been used by the cosmetic industry for corrosion



and skin irritation testing of chemical formulations, to the date it is not known whether these models are appropriate for studying the cytotoxicity, skin corrosion, irritation, and phototoxicity of formulations containing TiO₂ NPs. For this reason, this systematic review aims to answer the following proposed question: Can the toxicity of TiO₂ nanoparticles be assessed in the 3D skin model?

MATERIALS AND METHODS

This systematic review (SR) was conducted in accordance with the *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* (Higgins and Green, 2011), the Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines (Moher et al., 2009) and the Office of Health Assessment and Translation (OHAT) handbook (OHAT, 2015), which was developed by National Toxicity Program. The protocol of this SR was registered in CAMARADES at <http://www.dcn.ed.ac.uk/camarades/research.html#protocols>. Also, a reliability assessment of *in vitro* toxicity studies named Toxicological data Reliability Assessment Tool (ToxRTTool), was followed to increase the quality and transparency of this search.

Focused Question (Based on PICO Strategy) (Schardt et al., 2007)

- Population 3D skin model
- Interventions or exposure of TiO₂ NPs in the 3D model
- Comparison 3D model without TiO₂ NPs exposure
- Outcome Effects generated by TiO₂ NPs in the 3D skin model: cytotoxicity, phototoxicity, irritation, corrosion.
- Study design *in vitro* studies.

Search Strategy

An electronic search was carried out in the MEDLINE/PubMed, Science Direct, Web of Science, Scopus and SciELO library databases up to February 2019. Only studies in English, Portuguese, Spanish, or French were selected, without date restriction. In addition, searches in the references of the included studies (i.e., cross-referencing) were conducted. Furthermore, unpublished studies (i.e., gray literature) were analyzed in the Gray Literature Report and OpenGrey databases. A specific search strategy was used for each database, according to its characteristics (Table 1).

Eligibility Criteria (OHAT)

The inclusion and exclusion criteria are stated in Table 2.

TABLE 1 | Search strategy.

Databases	Keywords
PubMed	("3d skin model"[tiab] OR "reconstructed human skin model"[tiab] OR "human skin model"[tiab] OR "epidermis model"[tiab] OR "episkin"[tiab] OR "epidermis"[tiab] OR "skin equivalent model"[tiab] OR "reconstructed human epidermis"[tiab] AND ("titanium dioxide"[tiab] OR "tio2"[tiab] OR "titanium"[tiab] OR "titanium"[mesh]) AND ("nanoparticles"[tiab] OR "NP"[tiab] OR "nanomaterials"[tiab] OR "nanoparticles"[Mesh] OR "metal nanoparticles"[mesh]) AND ("skin corrosion"[tiab] OR skin "irritation"[tiab] OR "toxicity"[tiab] OR "cytotoxicity"[tiab] OR "phototoxicity"[tiab] OR "irritation"[tiab] OR "corrosion"[tiab] OR "Skin Irritancy Tests"[Mesh])
Science Direct	("skin model" OR epidermis OR episkin OR "skin equivalent model" OR "reconstructed human epidermis") AND (titanium OR tio2) AND (nano) AND (corrosion OR irritation OR toxicity OR cytotoxicity OR phototoxicity)
Web of science	("skin model" OR "epidermis model" OR "episkin" OR "skin equivalent model" OR "reconstructed human epidermis") AND ("tio2" OR "titanium") AND ("nanoparticles" OR "NP" OR "nanomaterials") AND ("skin corrosion" OR "skin irritation" OR "toxicity" OR "cytotoxicity" OR "phototoxicity" OR "irritation" OR "corrosion")
Scopus	("skin model" OR "epidermis model" OR "episkin" OR "epidermis" OR "skin equivalent model" OR "reconstructed human epidermis") AND ("tio2" OR "titanium") AND ("nano") AND ("toxicity" OR "citotoxicity" OR "phototoxicity" OR "irritation" OR "corrosion")
Scielo	("skin model" OR "epidermis model" OR "episkin" OR "epidermis" OR "skin equivalent model" OR "reconstructed human epidermis") AND ("tio2" OR "titanium") AND ("nano") AND ("toxicity" OR "citotoxicity" OR "phototoxicity" OR "irritation" OR "corrosion")
Gray Literature	(skin OR epidermis) AND (titanium OR tio2) AND (skin irritancy test OR toxicity)

Study Selection, Screening Process, and Data Extraction

Titles and abstracts of the retrieved articles were screened by two authors/reviewers (PS and LG) and then publications that fulfilled the inclusion criteria were identified. Disagreements between the reviewing authors were resolved through careful discussion, and any remaining disagreements were resolved by a third reviewer (JMG). After that, full text of eligible articles was obtained. Finally, based on the inclusion criteria two authors/reviewers (PS and LG) independently screened and selected the relevant full-text articles. Furthermore, disagreements between the reviewing authors were resolved through the same process used in the first selection phase.

When available, the following data were extracted from the publications by the reviewers (PS and RC): year, DOI, type of skin model, test substance, the crystalline structure of TiO₂ NPs, primary particle size, size of the TiO₂ after dispersion, exposure time, the expected outcome of the positive and negative controls, results in the evaluation of corrosion and/or irritation and phototoxicity and main conclusion.

TABLE 2 | Inclusion and exclusion criteria.

PECO	Inclusion	Exclusion
Population	<i>In vitro</i> study in 3D skin model	Clinical trials <i>In vivo</i> studies <i>In vitro</i> studies of monolayer culture
Exposure	Exposure of TiO ₂ NPs TiO ₂ must have nanometric size TiO ₂ suspensions in any crystalline phase or mixture	Average size in micrometric scale
Comparison	3D model without NPs exposure	
Outcome	Effects generated by NPs in the 3D skin model: cytotoxicity, phototoxicity, irritation, and corrosion	Studies focusing on the characterization and synthesis of NPs
Publication type	Reports must contain original data	Articles with no original data (e.g., editorials, reviews, letters) Languages other than Portuguese, Spanish and English Studies published in abstract form only Book chapters

Assessment of Reliability

The reliability assessment was done by two reviewers (PS and LG), using the ToxRTool developed by the European Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) (Schneider K. et al., 2009). The *in vitro* part of this tool consists of a list of 18 criteria. Each criterion can be graded as "1" (i.e., "criterion met") or as "0" (i.e., "criterion not met" or not reported). Those 18 criteria are grouped in five major groups: I-Test substance identification, II-Test system characterization, III-Study design description, IV-Study results documentation and V-Plausibility of study design and results. A final score was then recorded for each major group of each article, and an overall score was recorded for each study.

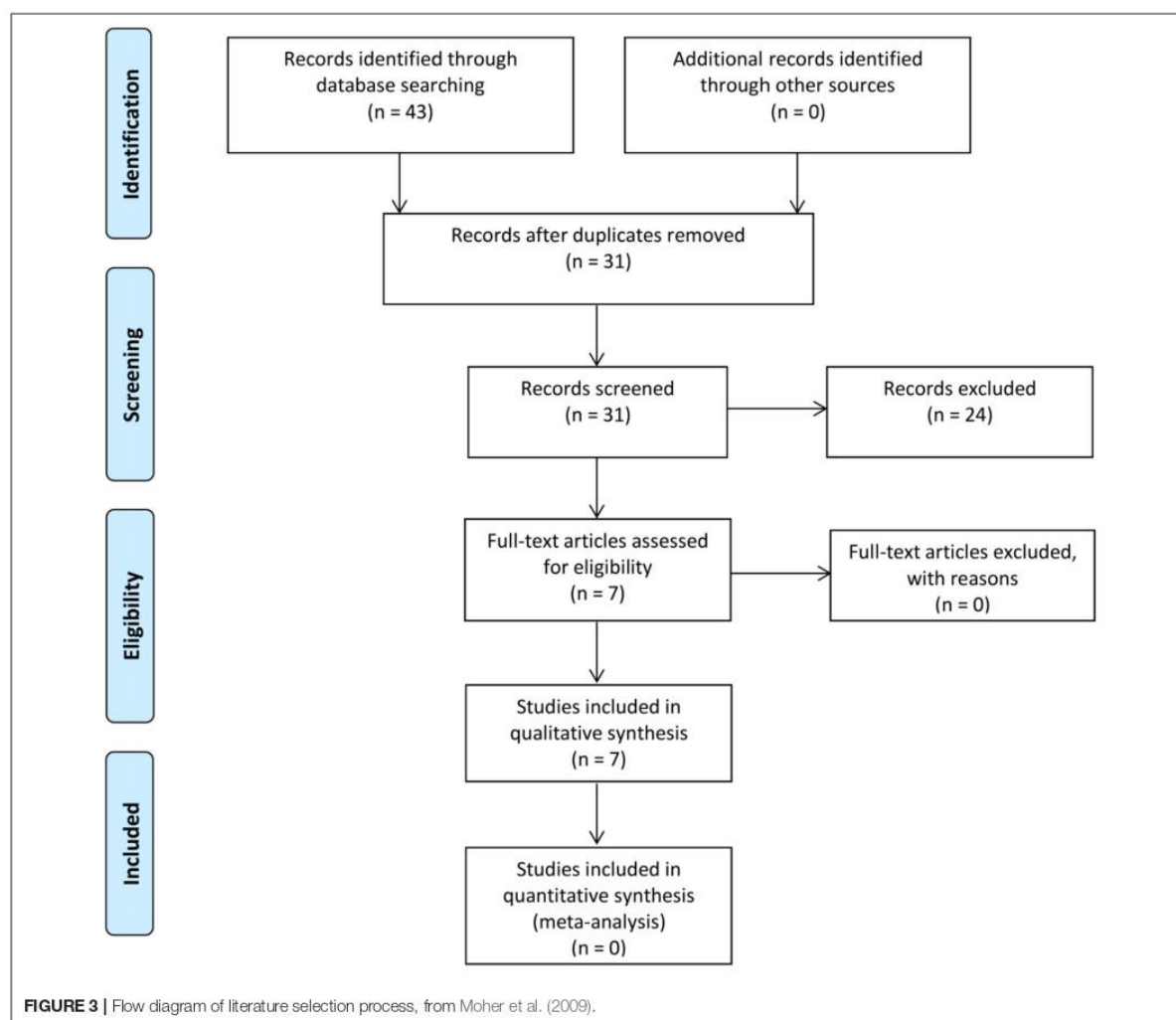
In this tool, there are some criteria considered indispensable for a study to be reliable, and they are highlighted in red (presented in **Supplementary Information**). Independently of the overall score, only if these criteria are assigned as "1" the tool will rate the study as a reliable category (1 or 2). Those categories are: 1 (reliable without restrictions), 2 (reliable with restrictions), 3 (not reliable) and 4 (not assignable).

Finally, ToxRTool classified under "A" box the category in which the article was assigned based on the sum of points (overall score), regardless the red criteria. And, under "B" the category is derived considering the red criteria.

RESULTS

Search

The initial search identified 43 articles, comprising 11 titles from MEDLINE/PubMed, 13 from Science Direct, 12 from Scopus,



and 7 from Web of Science. The search in the gray literature or cross-referencing did not yield any studies. After duplicates removal, 31 studies had their titles and abstracts screened, and 24 studies were excluded because they did not meet the eligibility criteria. Then, the full-text screening did not exclude any studies, resulting in 7 included articles (Park et al., 2011; Choi et al., 2014; Kato et al., 2014; Horie et al., 2016; Kim et al., 2016; Miyani and Hughes, 2016; Tang et al., 2018) in this systematic review (Figure 3 Prisma Flow diagram).

Assessment of Reliability

As described previously, the reliability assessment was done using the ToxRTool tool. It can be observed that a few criteria were not met by the authors. The number of replicates and the statistical methods for data analysis given is some of the criteria that have not been described by some authors.

In Table 3 it is possible to observe the general punctuation and categories of each selected article. Thus, all articles were classified in category A with “1,” which corresponded to that the articles that were considered as reliable without restrictions. Articles were also classified in category B with “1” when all criteria considered indispensable for the study was reliable and attended.

Study Characteristics

From the seven articles found and analyzed, four studies used EpiDermTM (MatTek Corporation) (Park et al., 2011; Horie et al., 2016; Kim et al., 2016; Miyani and Hughes, 2016), one used the EpiKutisTM (Biocell Biotechnology, China) (Tang et al., 2018), one used KeraSkin (Modern Cell & Tissue Technology, Seoul, Korea) (Choi et al., 2014) and the last one was developed in their own laboratory (Kato et al., 2014). According to the inclusion

TABLE 3 | General punctuation and categories of the selected articles.

References	Overall score	Category A	Category B
Park et al. (2011)	16	1	1
Choi et al. (2014)	16	1	1
Kato et al. (2014)	17	1	1
Horie et al. (2016)	16	1	1
Miyani and Hughes (2016)	16	1	1
Kim et al. (2016)	17	1	1
Tang et al. (2018)	18	1	1

criteria, all seven articles used TiO₂ NPs as test substance. As it is well known, TiO₂ NPs exhibits three crystalline forms: rutile, anatase, and brookite. However, some studies also use mixtures of anatase and rutile structures. From the selected articles, two articles used the rutile crystalline structures (Choi et al., 2014; Kato et al., 2014), two articles used the mixture (anatase and rutile) (Park et al., 2011; Kim et al., 2016), one article used two crystalline structures, anatase and rutile (Horie et al., 2016), and two articles used anatase, rutile, and mixture (Miyani and Hughes, 2016; Tang et al., 2018). Some authors have also used other test substances such as: NPs of zinc oxide, zinc oxide/titanium dioxide (Choi et al., 2014), silver (Kim et al., 2016; Miyani and Hughes, 2016), cerium dioxide (Miyani and Hughes, 2016), iron oxide (Kim et al., 2016), aluminum oxide (Kim et al., 2016), polystyrene (Park et al., 2011) and polyvinylpyrrolidone-entrapped fullerene-C₆₀ (Kato et al., 2014).

The primary size of the TiO₂ NPs ranged from 6 to 108 nm. Regarding the size of agglomerates after dispersion, as it can be seen in **Table 4**, only three authors precisely described NPs size (Choi et al., 2014; Horie et al., 2016; Tang et al., 2018), two authors did not describe the size (Kato et al., 2014; Miyani and Hughes, 2016), one author demonstrated the agglomerate size by transmission Electron Microscopy image (which is apparently around 200 nm (Park et al., 2011) and one author states that the size of NPs was several hundred nanometers (Kim et al., 2016).

The skin irritation test was performed in five articles. Two authors have done corrosion tests, and the other two performed phototoxicity tests. In addition to these tests, in some article's histopathology, cytokine assay, lactate dehydrogenase assay, IL-8 enzyme-linked immunosorbent assay, IL-1 α assay, relative HO-1 gene expression, intracellular ROS-generation, and lipid hydroperoxides were performed.

Three authors used the concentration of 100 μ g/mL, however, each author used different exposure times: 1 h (Park et al., 2011), 2 h (Tang et al., 2018) and 4 h (Horie et al., 2016). In addition, one author used the concentration of 15 μ g/mL for 3 h of exposure (Kato et al., 2014), another used the concentration of 1 mg/mL for 1 h of exposure (Miyani and Hughes, 2016). Furthermore, two authors used the

same exposure period of 3 min and 1 h. In one study the epidermis was moistened with deionized water and 25 mg of the test substance (Kim et al., 2016) and in another study, 25% of the test substance in deionized water was used (Choi et al., 2014).

Toxicity Results

Skin Irritation

All articles that assessed skin irritation used 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Park et al., 2011; Choi et al., 2014; Kim et al., 2016; Miyani and Hughes, 2016). In all cases, TiO₂ NPs was shown to be non-irritating on the 3D model, where no reduction in cell viability was observed. In all studies, the results were compared with the positive and negative controls, where Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) was used as a positive control, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) and Phosphate Buffered Saline (PBS) were used in some studies as a negative control.

Skin Corrosion

Two authors used TiO₂ NPs to evaluate skin corrosion (Choi et al., 2014; Kim et al., 2016). Choi et al. and Kim et al., used potassium hydroxide (8N KOH) as a positive control (Choi et al., 2014; Kim et al., 2016). Choi et al. observed that after 3 min of exposure with 8N KOH the viability was reduced to 1%, while the TiO₂ NPs treated sample viability was 94% ($\pm$ 3.0). After 60 min of TiO₂ NPs exposure, it was observed that the viability reduced in comparison to the time of 3 min, however, the viability was higher than 50% (Choi et al., 2014). Kim et al. presented similar results. They demonstrated that after 3 min of exposure, treatment with 25 mg of TiO₂ NPs led to the viability of 96.3% ($\pm$ 2.4) while 8N KOH reduced viability to 9.8% ($\pm$ 1.6). After an exposure time of 60 min, the viability of the treated sample with TiO₂ NPs decreased to 85.3% ($\pm$ 3.9) (Kim et al., 2016). Therefore, the two studies concluded that TiO₂ NPs are non-corrosive, considering that viability was >50 and 15% after 3 and 30 min of exposure, respectively.

Phototoxicity

The assessment of TiO₂ NPs phototoxicity in the 3D skin model was performed in two articles. It was applied variable exposition times, non-toxic doses of UVA of 6 J/cm² (Park et al., 2011) and 40 J/cm² (Tang et al., 2018). In both cases, phototoxicity was evaluated by the reduction of mitochondrial conversion of MTT to formazan. The authors concluded that TiO₂ NPs did not exhibit phototoxicity in the 3D skin model in the presence of UV radiation.

DISCUSSION

With the advancement of nanotechnology, many products with nanoscale materials have been introduced in several areas such as cosmetics, food, drugs and electronics (Louro et al., 2019; Lüderwald et al., 2019). Therefore, exposure to nanomaterials is in exponential growth, and can occur both during the synthesis as well as in the use of the final product. Due to the greater surface

TABLE 4 | Extraction of data from selected articles.

Authors	Park et al. (2011)	Choi et al. (2014)	Kato et al. (2014)	Horie et al. (2016)	Miyani and Hughes (2016)	Kim et al. (2016)	Tang et al. (2018)
Year	2011	2014	2014	2016	2016	2016	2018
DOI	10.1016/j.tiv.2011.05.022	10.5620/eht.2014.29.e2014004	10.1166/jm.2014.8719	10.1080/15376516.2016.1175530	10.1080/15569527.2016.1211671	10.5487/TR.2016.32.4.311	10.1016/j.tox.2018.05.010
Type of skin model	EpiDerm™	KeraSkin™	Developed in own laboratory	EpiDerm™	EpiDerm™	EpiDerm™	EpiKuitis™
Test substance	Polystyrene and Titanium dioxide nanoparticles	Zinc oxide nanoparticles, Titanium dioxide nanoparticles and Mixture (Zinc oxide/Titanium dioxide nanoparticles)	Polyvinylpyrrolidone-entrapped fullerene-C60 and Titanium dioxide nanoparticles	Titanium dioxide nanoparticles	Silver nanoparticles, Titanium dioxide nanoparticles and Cerium dioxide nanoparticles	Iron nanoparticles, Aluminum oxide nanoparticles, Titanium oxide nanoparticles and Silver nanoparticles	Titanium dioxide nanoparticles
Crystalline structure of TiO ₂	Mixture	Rutile	Rutile	Anatase and Rutile	Anatase, Rutile and Mixture	Mixture	Anatase, Rutile and Mixture
Primary particle size	25 nm	21 nm	10 nm	Anatase: 6 nm and 7 nm; Rutile: 15 nm	Anatase: 25 nm and 142 nm; Rutile: 214 nm; Mixture: 22 nm, 31 nm and 59 nm	21 nm	Anatase: 23 nm and 108 nm, Rutile: 21 nm and Mixture: 31 nm, 52 nm and 55 nm
Size of the TiO ₂ after dispersion (aggregate)	± 200 nm	39.4 ± 28.6 nm	Not described	Anatase: 252.1 nm and 323.2 nm; Rutile: 276.4 nm and 318.4 nm	Not described	Several hundred nm in size	Anatase: 912 nm and 410 nm, Rutile: 121 nm and Mixture: 2312 nm, 246 nm and 249 nm
Analysis method	Skin irritation test; skin phototoxicity test	Skin Corrosion Test; Skin Irritation Test; Cytokine Assay and Histopathology	Intracellular ROS-Generation and Lipid Hydroperoxides	Lactate dehydrogenase assay, IL-8 enzyme-linked immunosorbent assay and relative HO-1 gene expression; Skin Irritation Test	Skin irritation test	Skin Corrosion Test; Skin Irritation Test; IL-1α assay and histopathology	Phototoxicity test
Substance concentration of TiO ₂	100 µg/mL	25% in deionized water	15 µg/mL	100 µg/mL	1 mg/ml	The epidermis surface was moistened with deionized water and 25 mg of the test substance was added	100 µg/mL
Exposure time	1 h	3 min and 1 h	3 h	4 h	1 h	3 min and 1 h	2 h
The expected outcome of the positive and negative controls was observed?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

(Continued)

TABLE 4 | Continued

Authors	Park et al. (2011)	Choi et al. (2014)	Kato et al. (2014)	Horie et al. (2016)	Miyani and Hughes (2016)	Kim et al. (2016)	Tang et al. (2018)
Results evaluation of corrosion and/or irritation and phototoxicity	Cytotoxicities and phototoxicity were assessed as a percentage of the negative control. However, the negative control exhibits the viability > 50%.	Corrosion: The article uses OECD TG431 as a reference, which says that the test material is considered to be corrosive to the skin if the viability is <50% after 3 min exposure. However, although the viability after 3 min exposure is ≥ 50%, it is corrosive if the viability is < 15% after 60 min exposure. Therefore, the material is non-corrosive if the viability is ≥ 50% after 3 min exposure and ≥ 15% after 60 min exposure. Irritation: The article uses OECD TG439 as a reference, which says that test material is considered to be irritant to skin if the tissue viability after exposure/post-incubation is ≤ 50%, and is non-irritant if the viability is > 50%.	Evaluation of the induction of ROS-generation around the outside of nuclei and peroxidation of cell membrane in the epidermis by electron microscopy.	Irritation: The article uses OECD TG439 as a reference, which says that test material is considered to be irritant to skin if the tissue viability after exposure/post-incubation is ≤ 50%, and is non-irritant if the viability is > 50%.	Regarding the irritation test, the test material is considered to be irritant to skin if the tissue viability after exposure/post-incubation is less than or equal to 50%. It would be non-irritant if the viability is more than 50%.	Corrosion: The article uses OECD TG431 as a reference, which says that the test material is considered to be corrosive to the skin if the viability is <50% after 3 min exposure. However, although the viability after 3 min exposure is ≥ 50%, it is corrosive if the viability is < 15% after 60 min exposure. Therefore, the material is non-corrosive if the viability is ≥ 50% after 3 min exposure and ≥ 15% after 60 min exposure. Irritation: The article uses OECD TG439 as a reference, which says that test material is considered to be irritant to skin if the tissue viability after exposure/post-incubation is ≤ 50%, and is non-irritant if the viability is > 50%.	The test substance was considered phototoxic if the UVA exposed tissues revealed a decrease in viability exceeding 25% when compared with the dark control.

(Continued)

TABLE 4 | Continued

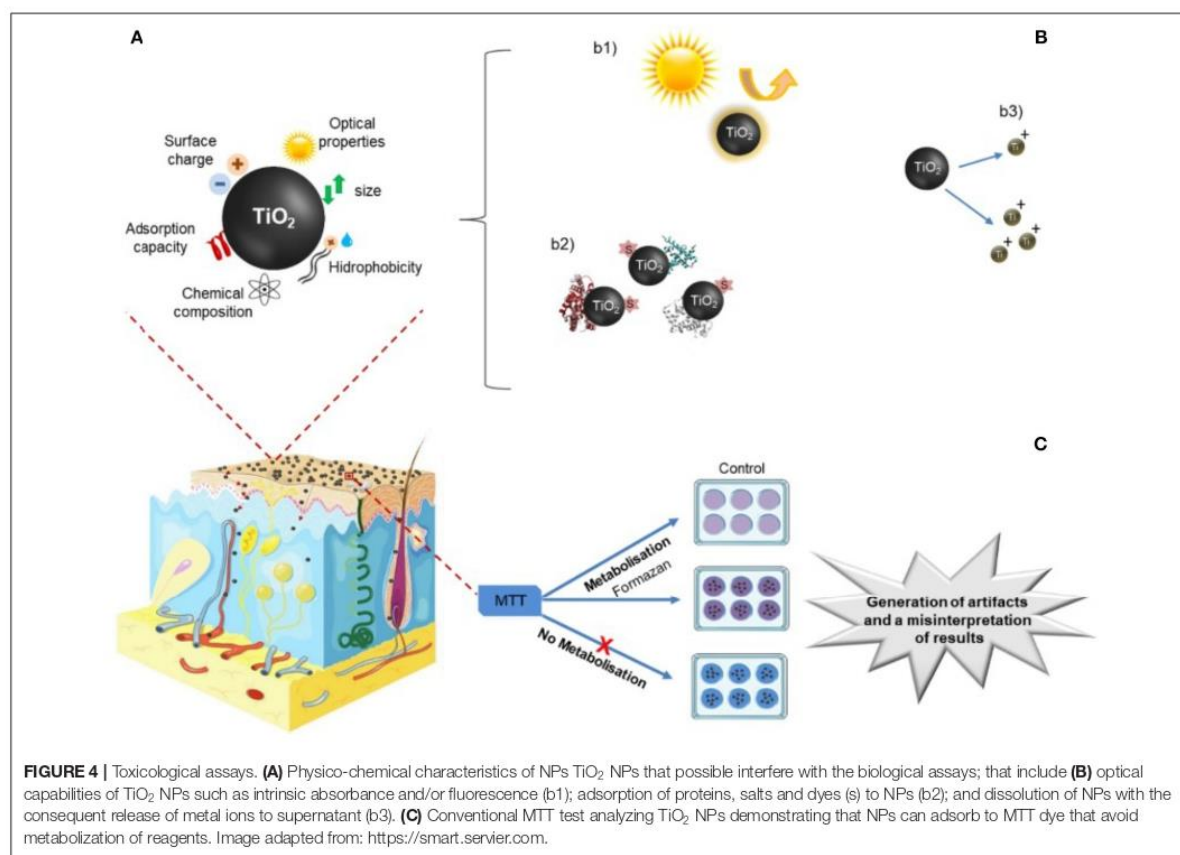
Authors	Park et al. (2011)	Choi et al. (2014)	Kato et al. (2014)	Horie et al. (2016)	Miyani and Hughes (2016)	Kim et al. (2016)	Tang et al. (2018)
Main conclusion	Polystyrene and titanium dioxide nanoparticles did not exhibit skin irritation and phototoxicity	For all the test materials used in this study were found to be non-corrosive and non-irritant; The results were confirmed by IL-1 α and histopathological analysis	Was observed that UV irradiation of 8 J/cm ² in the presence of 15 ppm TiO ₂ induced ROS-generation around the outside of nuclei membrane in the epidermis. However, the treatment with C60/PVP or C60/Sqn suppressed intracellular ROS and lipid peroxidation, and thereafter TiO ₂ -catalyzed phototoxic potency was repressed in a dose-dependent manner of C60.	The UVA irradiation did not affect LDH leakage or IL-8 secretion in the culture medium, as no increase in HO-1 expression was observed, regardless of the type of TiO ₂ nanoparticle	The silver, cerium and titanium nanoparticles tested can be classified as non-irritants	For all the test materials used in this study were found to be non-corrosive and non-irritant; The results were confirmed by IL-1 α and histopathological analysis	For all the test materials used in this study, there was no phototoxicity at test concentration in the studied skin model

area/volume ratio, NPs become more (bio) reactive compared to normal bulk materials, giving rise to concerns about their potential toxicity to humans (Sharifi et al., 2012; Shi et al., 2013).

TiO₂ NPs are widely used in the cosmetic industries, especially in sunscreens as an alternative to available chemical UV absorbers (p-aminobenzoic acid and benzophenones) that are known to cause some allergic reactions and/or endocrine disruption. Titanium dioxide has three different crystalline structures (anatase, rutile and brookite), however, rutile is the most used in cosmetic, due to its high refraction index, protecting skin from the harmful effects of ultraviolet rays (Martirosyan and Schneider, 2014). The International Agency of Cancer Research (IARC) classified titanium dioxide as a possible human carcinogen (group 2B), however, there is no distinction regarding titanium size (macro, micron and/or nanoscale). The heterogeneity of TiO₂ nanoparticles (particle size distribution; agglomeration and aggregation; morphology, crystal structure; purity) for sunscreen applications is high, becoming fiercely debated the hazard of TiO₂ NPs (Jacobs et al., 2010).

A long time ago that cosmetic industries were testing their products using corrosion and skin irritation tests in rabbits (in accordance with the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) (OECD, 2015). However, due to ethical (3 R principle—replacement, refinement and reduction of animal trials), scientific and economic restrictions, skin bioengineering 3D tissues (Evans et al., 2016; Salamanna et al., 2016; Caddeo et al., 2017; Alépée et al., 2018; Liu et al., 2018; Owen et al., 2018) are actually used for testing new pharmaceuticals. The main advantages of the bioengineering 3D tissues are their physiological relevance since they recapitulate tissue's microenvironment, increased reproducibility comparing to *ex-vivo* models, superior predictive potential due to the possible use of human cells, along with decreased in cost and ethical concerns (Sarmiento et al., 2012; Gholobova et al., 2018; Madl et al., 2018; Qiao and Tang, 2018). High quality skin constructs (that mimic the morphology, lipid composition and differentiation of native human skin) are commercially available. Current available 3D skin constructs still do not contain all essential cell types (dendritic cells as well as macrophages), neither integrate blood vessels, neither the dynamic crosstalk between epithelium and connective tissue, that are essential to regulate epidermal morphogenesis and homeostasis. This reinforces the need of more complex 3D constructs that can address complex toxicological endpoints. Nowadays the main strategy is to use biofabrication techniques such as electrospinning and bioprinting to develop relevant skin biological models constituted by specialized cell types (melanocytes, adipocytes, Langerhans, immune, stem cells, among others) with a perfused vasculature allowing a physiological oxygen and nutrient delivery (Mathes et al., 2013). The main goal is to achieve a physiological relevant 3D skin construct that can be used for toxicology assessment of new cosmetic formulations but also anti-cancer drugs development for example, reducing the animal studies.

A few articles study the hazard effect of TiO₂ NPs in a three-dimensional skin model. Mostly, available literature uses quite diverse *in vitro* (primary cells and cell lines derived from different



organs/tissues) and *in vivo* models to evaluate the hazard effect of TiO₂ NPs. Results suggest that TiO₂ NPs induce the release of ROS leading to loss of vital cellular functions, ultimately leading to cell death and accumulate in liver and spleen preferentially (Jin et al., 2011; Shi et al., 2013; Tucci et al., 2013; Zhao et al., 2013; Wang et al., 2014; Carriere et al., 2016; Proquin et al., 2016).

This systematic review demonstrates that the 3D skin models used, mimic the histology, morphological, physiological and biochemical properties of human epidermis. The reliability of these studies was evaluated by ToxRTool, and all 18 criteria evaluated by this tool are presented in **Tables S2–S8 (Supplementary Information)**. This table describes a simulation of a work that meets 100% of the criteria as well as the evaluation performed in the seven selected articles (see **Table S1**).

As it can be observed in **Table 3**, all articles were well-evaluated, however, when analyzing **Table 4**, it was observed the diversity of the study design. Each article worked with TiO₂ NP unknown stability possibly holding large and sedimenting agglomerates, different TiO₂ NPs exposure times, crystal structures and surface coatings, dissimilar measures for exposure doses (mass, area or particle number) that in practice result in a difficulty to convert into each other as well as did not adequately characterize particles' size and stability during cell exposure.

From the 7 articles analyzed, six of them concluded that TiO₂ NPs are non-irritating, non-corrosive and non-phototoxic (Park et al., 2011; Choi et al., 2014; Kato et al., 2014; Horie et al., 2016; Kim et al., 2016; Miyani and Hughes, 2016; Tang et al., 2018). What was noticed was that in the six articles analyzed, the toxicity of TiO₂ NPs was evaluated using the MTT assay, which is reported in the literature to interfere with TiO₂ NPs (Kroll and Hendrik, 2012; Ong et al., 2014). TiO₂ NPs interference is attributed to the light adsorption properties of NP over the same spectral region used by MTT (Holder et al., 2012; Kroll and Hendrik, 2012; Ong et al., 2014). However, NPs also adsorb constituents of the assay on their surface that obstruct proper transformation of molecules, chemical reactions between the NPs and the test compounds can occur and even the release of metal ions from NPs can modify the mitochondrial catalytic activity of cells altering MTT reading (Kroll et al., 2009). Some authors reported that interference increases with increased NP concentration (Holder et al., 2012; Kroll and Hendrik, 2012; Ong et al., 2014), and emphasize that it is necessary to use concentrations of NPs that do not reduce MTT. It is important to stress that in the last years, extensive washing steps were introduced in the protocols and the possible interference of TiO₂ NPs with the MTT assay was reduced and in some

cases overcome (Kroll and Hendrik, 2012; Ong et al., 2014). However great care must be taken, because even with multiple washes or centrifugations, TiO₂ NPs can remain adhered to the culture plate or even adsorbed on the surface of the cells. The contribution of NPs to the MTT light absorption signal depends also with the concentration of reduced MTT-formazan present in the MTTred/MTTox mixtures, suggesting different mechanisms of interference that cannot be predicted a priori (Kroll and Hendrik, 2012). It seems that redox- active metals with different sizes and coatings can change the magnitude of the reaction kinetics causing different levels of interference (Mello et al., 2020). **Figure 4** shows an interference scheme of NP with the MTT assay. As it is possible to observe the properties of the NPs can generate artifacts and misinterpretation of the results (Holder et al., 2012; Kroll and Hendrik, 2012; Guadagnini et al., 2013; Lupu and Popescu, 2013; Ong et al., 2014; Lammel and Sturve, 2018). A recent article demonstrated that TiO₂ NPs adsorbed on cell surface and those internalized by cells interfere with the fluorescence readout by reflecting/absorbing part of the incident and emitted light (Lammel and Sturve, 2018). This adds new complexity to NPs hazard evaluation since each specific cell type characteristics influence NPs internalization, intracellular trafficking and final destiny.

Besides MTT, other biological assays interfere with TiO₂ NPs (see **Table S9** in **Supplementary Information**). Lactate dehydrogenase (LDH) assay was also reported to interfere with TiO₂ NPs, since they can adsorb or inactivate LDH protein (Holder et al., 2012; Kroll and Hendrik, 2012), as well as the Neutral Red (NR) (Guadagnini et al., 2013), Alamar Blue assay (Ong et al., 2014; Lammel and Sturve, 2018), 5-Carboxyfluorescein diacetateacetoxymethyl ester (CFDA-AM) assay (Lammel and Sturve, 2018) and 2,7'-Dichlorofluorescein (DCF) (Kroll and Hendrik, 2012). Furthermore, interferences may be cumulative when for example two fluorometric assays are used on the same cells to quantify a unique endpoint.

Assessing the toxicity of TiO₂ NPs, is not a trivial issue. Therefore, researchers need to use every time that it is possible validated protocols for skin irritation, corrosion and phototoxicity testing with 3D models. Apply concentration exposures that mimic real situations but at the same time concentrations below interfering levels. Every time that it is possible introduce centrifugation, several washes, or even removing supernatants, are recommended approaches to reduce interference. We believe that with effective washing procedures, we can expect that NPs cannot effectively and sufficiently interact with MTT in the way that could significantly alter the results, however we need to take in consideration that this approach introduces another concern regarding exposure characterization and applied dose metrics. Resuming assays adaptations have to be ascertained case by case with a series of control experiments for each NP to obtain reliable nanotoxicity data. We also suggest perform complementary tests such as the evaluation of cytokines, histopathology and evaluation of cell membrane integrity by detecting transepithelial electrical resistance (TEER), always working with specific controls.

A long time ago that the nanotoxicology community has been addressing technical questions, such as dosing issues, aggregation state of materials as a function of time. We believe to deliver a realistic risk assessment of NPs, it is necessary to identify the key physicochemical characteristics that can foresee toxicological results, work with exposure conditions that mimic a real situation and characterize NPs and their interactions with biological systems (example: protein corona, its transformational capacity in the biological system). Very subtle alterations in the properties of NPs can completely alter protein corona that gets absorbed onto the NPs resulting in surprising changes *in vivo*. As the degree of interference may be relevant depending on the optical properties of the NPs, stability of NP, cytotoxicity testing and the type of fluorometric endpoint assay, it is encouraged to use more than one *in vitro* assay (for example flow cytometry is considered the method with less interference with NPs), specifically with different detection methods and use adequate controls (as negative controls, it would be advisable to separately test the dispersant agents used as NPs stabilizers under the same conditions). Adequate reference materials are needed in toxicological studies and efforts should be done in order to evaluate more than cell viability (ex: cell cycle) (Singh et al., 2019).

CONCLUSION

Through the data obtained by this systematic review, TiO₂ NPs was considered non-irritant, non-corrosive and non-phototoxic for the 3D skin model, regardless of the crystalline type, and the size of the NPs studied. We can conclude that skin 3D models can be used to test the hazard effect of TiO₂ NPs, however, we emphasize the need of standardized protocols with efficient washing procedures to remove the NP from the surface of 3D skin model to avoid potential interfere of TiO₂ NPs with the assay.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All datasets generated for this study are included in the article/**Supplementary Material**.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

PS, LG, RC, AR, and JG contributed to study concept and design. PS, LG, and RC contributed to the literature search and data collection. PS, LG, RC, DS, ML, AR, and JG contributed to data analysis. PS, RC, and AR wrote the paper. All authors contributed to a critical revision of the manuscript.

FUNDING

This work was supported by National Council for Scientific and Technological Development, CNPq (grants 405030/2015-0, 306672/2016-2, 467513/2014-7, and 400030/2018-7); FAPERJ (Grant nos. E-26/102.993/2012, E-26/203.012/2016), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) (Finance Code 001), National Centre of Science and Technology on Regenerative

Medicine – INCT Regenera (<http://www.inctregenera.org.br/>). AR especially thanks to Propeq-Unigranrio-FUNADEP Scholarship and Jovem Cientista do Nosso Estado award from FAPERJ. JMG thanks Cientista do Nosso Estado award from FAPERJ.

REFERENCES

- Alépée, N., Grandidier, M., and Cotovio, J. (2018). Usefulness of the EpiSkinTM reconstructed human epidermis model within integrated approaches on testing and assessment (IATA) for skin corrosion and irritation. *Toxicol. Vitro* 54, 147–167. doi: 10.1016/j.tiv.2018.09.015
- Almeida, A., Sarmento, B., and Rodrigues, F. (2017). Insights on *in vitro* models for safety and toxicity assessment of cosmetic ingredients. *Int. J. Pharm.* 519, 178–185. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.01.024
- Asbill, C., Kim, N., El-Kattan, A., Creek, K., Wertz, P., and Michniak, B. (2000). Evaluation of a human bio-engineered skin equivalent for drug permeation studies. *Pharm. Res.* 17, 1092–1097. doi: 10.1023/A:1026405712870
- Baroli, B., Ennas, M. G., Loffredo, F., Isola, M., Pinna, R., and Lo, M. A. (2007). Penetration of metallic nanoparticles in human full-thickness skin. *Soc. Invest. Dermatol.* 127, 1701–1712. doi: 10.1038/sj.jid.5700733
- Caddeo, S., Boffito, M., and Sartori, S. (2017). Tissue engineering approaches in the design of healthy and pathological *in vitro* tissue models. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 5:40. doi: 10.3389/fbioe.2017.00040
- Carriere, M., Sauvaigo, S., Douki, T., Ravanat, J., Lésions, L., Alpes, U. G., et al. (2016). Impact of nanoparticles on DNA repair processes: current knowledge and working hypotheses. *Mutagenesis* 32, 203–213. doi: 10.1093/mutage/gew052
- Choi, J., Kim, H., Choi, J., Oh, S. M., Park, J., and Park, K. (2014). Skin corrosion and irritation test of sunscreen nanoparticles using reconstructed 3D human skin model. *Environ. Health Toxicol.* 29:e2014004. doi: 10.5620/eh.2014.29.e2014004
- Crosera, M., Prodi, A., Mauro, M., Pelin, M., Florio, C., Bellomo, F., et al. (2015). Titanium dioxide nanoparticle penetration into the skin and effects on HaCaT cells. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12, 9282–9297. doi: 10.3390/ijerph120809282
- Davis, J., Wang, A., and Shtakin, J. (2010). *Nanomaterial Case Studies: Nanoscale Titanium Dioxide in Water Treatment and in Topical Sunscreen (Final)*. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, EPA/600/R-09/057F.
- Dréno, B., Alexis, A., Chuberre, B., and Marinovich, M. (2019). Safety of titanium dioxide nanoparticles in cosmetics. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.* 33, 34–46. doi: 10.1111/jdv.15943
- Evans, S. J., Clift, M. J. D., Singh, N., Mallia, J. D. O., Burgum, M., Wills, J. W., et al. (2016). Critical review of the current and future challenges associated with advanced *in vitro* systems towards the study of nanoparticle (secondary) genotoxicity. *Mutagenesis* 32, 233–241. doi: 10.1093/mutage/gew054
- Filipe, P., Silva, J. N., Silva, R., Cirne De Castro, J. L., Marques Gomes, M., Alves, L. C., et al. (2009). Stratum corneum is an effective barrier to TiO₂ and ZnO nanoparticle percutaneous absorption. *Skin Pharmacol. Physiol.* 22, 266–275. doi: 10.1159/000235554
- Foroozandeh, P., and Aziz, A. A. (2015). Merging worlds of nanomaterials and biological environment : factors governing protein corona formation on nanoparticles and its biological consequences. *Nanoscale Res. Lett.* 10:221. doi: 10.1186/s11671-015-0922-3
- Gholobova, D., Gerard, M., Decroix, L., Des L., Callewaert, N., and Annaert, P. (2018). Human tissue-engineered skeletal muscle : a novel 3D *in vitro* model for drug disposition and toxicity after intramuscular injection. *Sci. Rep.* 8:12206. doi: 10.1038/s41598-018-30123-3
- Gontier, E., Ynsa, M. D., Biró T., Hunyadi, J., Kiss, B., Gáspár, K., et al. (2008). Is there penetration of titania nanoparticles in sunscreens through skin? A comparative electron and ion microscopy study. *Nanotoxicology* 2, 218–231. doi: 10.1080/17435390802538508
- González, S., Fernández-Lorente, M., and Gilaberte-Calzada, Y. (2008). The latest on skin photoprotection. *Clin. Dermatol.* 26, 614–626. doi: 10.1016/j.clindermatol.2007.09.010
- Guadagnini, R., Halamoda Kenzaoui, B., Walker, L., Pojana, G., Magdolenova, Z., Bilanica, D., et al. (2013). Toxicity screenings of nanomaterials: challenges due to interference with assay processes and components of classic *in vitro* tests. *Nanotoxicology* 9, 13–24. doi: 10.3109/17435390.2013.829590
- Gulson, B., McCall, M., Korsch, M., Gomez, L., Casey, P., Taylor, A., et al. (2010). Small amounts of zinc from zinc oxide particles in sunscreens applied outdoors are absorbed through human skin. *Toxicol. Sci.* 118, 140–149. doi: 10.1093/toxsci/kfq243
- Gulson, B., McCall, M. J., Bowman, D. M., and Pinheiro, T. (2015). A review of critical factors for assessing the dermal absorption of metal oxide nanoparticles from sunscreens applied to humans and a research strategy to address current deficiencies. *Arch. Toxicol.* 89, 1909–1930. doi: 10.1007/s00204-015-1564-z
- Hanawa, T. (2019). Titanium–tissue interface reaction and its control with surface treatment. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7:170. doi: 10.3389/fbioe.2019.00170
- Higgins, J., and Green, S. (2011). *Cochrane handbook for systematic reviews of interventions version 5.1.0 [updated March 2011]*. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. Available online at: www.handbook.cochrane.org
- Holder, A. L., Goth-Goldstein, R., Lucas, D., and Koshland, B. K. (2012). Particle-induced artifacts in the MTT and LDH viability assays. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 1885–1892. doi: 10.1021/tx3001708
- Horie, M., Sugino, S., Kato, H., Tabei, Y., Nakamura, A., and Yoshida, Y. (2016). Does photocatalytic activity of TiO₂ nanoparticles correspond to photo-cytotoxicity? cellular uptake of TiO₂ nanoparticles is important in their photo-cytotoxicity. *Toxicol. Mech. Methods* 26, 284–294. doi: 10.1080/15376516.2016.1175530
- International Organization for Standardization (2017). *ISO/TS 20477:2017: Nanotechnologies — Standard terms and Their Definition for Cellulose Nanomaterial*. International Organization for Standardization.
- Jacobs, J. F., van de Poel, I., and Osseweijer, P. (2010). Sunscreens with titanium dioxide (TiO₂) nano-particles: a societal experiment. *Nanoethics* 4, 103–113. doi: 10.1007/s11569-010-0090-y
- Jin, C., Tang, Y., Yang, F. G., and Li, X. L. (2011). Cellular toxicity of TiO₂ nanoparticles in anatase and rutile crystal phase. *Biol. Trace Elem. Res.* 141, 3–15. doi: 10.1007/s12111-010-8707-0
- Kato, S., Aoshima, H., Saitoh, Y., and Miwa, N. (2014). Fullerene-C60 derivatives prevent UV-irradiation/ TiO₂-induced cytotoxicity on keratinocytes and 3D-skin tissues through antioxidant actions. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 14, 3285–3291. doi: 10.1166/jnn.2014.8719
- Kim, H., Choi, J., Lee, H., Park, J., Yoon, B.-I., Jin, S. M., et al. (2016). Skin corrosion and irritation test of nanoparticles using reconstructed three-dimensional human skin model, epiderm TM. *Toxicol. Res.* 32, 311–316. doi: 10.5487/TR.2016.32.4.311
- Kongsong, P., Sikong, L., Niyomwas, S., and Rachpech, V. (2014). Photocatalytic antibacterial performance of glass fibers thin film coated with N-doped SnO₂/TiO₂. *Sci. World J.* 2014:869706. doi: 10.1155/2014/869706
- Kroll, A., and Hendrik, M. (2012). Interference of engineered nanoparticles with *in vitro* toxicity assays. *Arch. Toxicol.* 86, 1123–1136. doi: 10.1007/s00204-012-0837-z
- Kroll, A., Pillukat, M. H., Hahn, D., and Schneckeburger, J. (2009). Current *in vitro* methods in nanoparticle risk assessment : limitations and challenges. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72, 370–377. doi: 10.1016/j.ejpb.2008.08.009
- Lademann, J., Weigmann, H.-J., Rickmeyer, C., Barthelme, H., Schaefer, H., Mueller, G., et al. (1999). Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular. *Ski. Pharmacol. Appl. Ski. Physiol.* 12, 247–256. doi: 10.1159/000066249
- Lammel, T., and Sturve, J. (2018). NanoImpact assessment of titanium dioxide nanoparticle toxicity in the rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) liver and gill cell lines RTL-W1 and RTgill-W1 under particular consideration of

- nanoparticle stability and interference with fluorometric assays. *NanoImpact* 11, 1–19. doi: 10.1016/j.impact.2018.01.001
- Laresse Filon, F., Crosera, M., Timeus, E., Adami, G., Bovenzi, M., Ponti, J., et al. (2013). Human skin penetration of cobalt nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicol. Vitro* 27, 121–127. doi: 10.1016/j.tiv.2012.09.007
- Lekki, J., Stachura, Z., Dabros, W., Stachura, J., Menzel, F., Reinert, T., et al. (2007). On the follicular pathway of percutaneous uptake of nanoparticles: ion microscopy and autoradiography studies. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res.* 260, 174–177. doi: 10.1016/j.nimb.2007.02.021
- Lin, L. L., Grice, J. E., Butler, M. K., Zvyagin, A. V., Becker, W., Robertson, T. A., et al. (2011). Time-correlated single photon counting for simultaneous monitoring of zinc oxide nanoparticles and NAD (P) H in intact and barrier-disrupted volunteer skin. *Pharm. Res.* 28, 2920–2930. doi: 10.1007/s11095-011-0515-5
- Liu, W., Zhou, W., Liu, S., Zhang, C., Huang, S., Li, Y., et al. (2018). Electrical impedance performance of metal dry bioelectrode with different surface coatings. *Sens. Actuators A Phys.* 269, 515–523. doi: 10.1016/j.sna.2017.12.006
- Louro, H., Saruga, A., Santos, J., and Silva, M. J. (2019). Biological impact of metal nanomaterials in relation to their physicochemical characteristics. *Toxicol. Vitro* 56, 172–183. doi: 10.1016/j.tiv.2019.01.018
- Lüderwald, S., Dackermann, V., Seitz, F., Adams, E., Feckler, A., Schilde, C., et al. (2019). Science of the total environment a blessing in disguise? Natural organic matter reduces the UV light-induced toxicity of nanoparticulate titanium dioxide. *Sci. Total Environ.* 663, 518–526. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.01.282
- Lupu, A. R., and Popescu, T. (2013). Toxicology *in Vitro* the noncellular reduction of MTT tetrazolium salt by TiO₂ nanoparticles and its implications for cytotoxicity assays. *Toxicol. Vitro* 27, 1445–1450. doi: 10.1016/j.tiv.2013.03.006
- Madl, C. M., Heilshorn, S. C., and Blau, H. M. (2018). Review bioengineering strategies to accelerate stem cell therapeutics. *Nature* 557, 335–342. doi: 10.1038/s41586-018-0089-z
- Martirosyan, A., and Schneider, Y. J. (2014). Engineered nanomaterials in food: Implications for food safety and consumer health. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 11, 5720–5750. doi: 10.3390/ijerph110605720
- Mathes, S. H., Ruffner, H., and Graf-hausner, U. (2013). The use of skin models in drug development. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 69, 81–102. doi: 10.1016/j.addr.2013.12.006
- Mello, D. F., Trevisan, R., Rivera, N., Geitner, N. K., Di Giulio, R. T., Wiesner, M. R., et al. (2020). Caveats to the use of MTT, neutral red, hoechst and resazurin to measure silver nanoparticle cytotoxicity. *Chem. Biol. Interact.* 315:108868. doi: 10.1016/j.cbi.2019.108868
- Miyani, V. A., and Hughes, M. F. (2016). Assessment of the *in vitro* dermal irritation potential of cerium, silver, and titanium nanoparticles in a human skin equivalent model. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 36, 145–151. doi: 10.1080/15569527.2016.1211671
- Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., and Altman, D. G. (2009). Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med.* 6:e1000097. doi: 10.1371/journal.pmed.1000097
- Monteiro-Riviere, N. A., Wiench, K., Landsiedel, R., Schulte, S., Inman, A. O., and Riviere, J. E. (2011). Safety evaluation of sunscreen formulations containing titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in UVB sunburned skin: an *in vitro* and *in vivo* study. *Toxicol. Sci.* 123, 264–280. doi: 10.1093/toxsci/kfr148
- Morganti, P. (2010). Use and potential of nanotechnology in cosmetic dermatology. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* 3, 5–13. doi: 10.2147/CCID.S4506
- Næss, E. M., Hofgaard, A., Skaug, V., Gulbrandsen, M., and Danielsen, T. E. (2015). Titanium dioxide nanoparticles in sunscreen penetrate the skin into viable layers of the epidermis: a clinical approach. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 32, 48–51. doi: 10.1111/phpp.12217
- Neupane, R., Boddu, S. H. S., Renukuntla, J., Babu, R. J., and Tiwari, A. K. (2020). Alternatives to biological skin in permeation studies: current trends and possibilities. *Pharmaceutics* 12:152. doi: 10.3390/pharmaceutics12020152
- Nohynek, G. J., Lademann, J., Ribaud, C., and Roberts, M. S. (2007). Grey Goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety. *Crit. Rev. Toxicol.* 37, 251–277. doi: 10.1080/10408440601177780
- Oberdörster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K., et al. (2005). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part. Fibre Toxicol.* 2:8. doi: 10.1186/1743-8977-2-8
- OECD (2014). *Test No. 431: In Vitro Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (Rhe) Test Method*. Paris: OECD Publishing. doi: 10.1787/9789264224193-en
- OECD (2015). *Test No. 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4*. Paris: OECD Publishing. doi: 10.1787/9789264242678-en
- OECD (2019). *Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4*. Paris: OECD Publishing. doi: 10.1787/9789264242845-en
- OHAT, N. (2015). National Toxicology Program (US Department of Health and Human Services). *Handbook for Conducting a Literature-based Health Assessment Using OHAT Approach for Systemic Review and Evidence Integration*. 1–98. Available online at: https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/ohat/pubs/handbookjan2015_508.pdf (accessed June 18, 2019).
- Ong, K. J., McCormack, T. J., Clark, R. J., Ede, J. D., Ortega, V. A., Felix, L. C., et al. (2014). Widespread nanoparticle-assay interference: implications for nanotoxicity testing. *PLoS ONE* 9:e90650. doi: 10.1371/journal.pone.0090650
- Organisation for Economic Co-operation and Development (2018). *Evaluation of in vitro methods for human hazard assessment applied in the OECD Testing Programme for the Safety of Manufactured Nanomaterials*. Organisation for Economic Co-operation and Development.
- Osmond, M. J., and McCall, M. J. (2010). Zinc oxide nanoparticles in modern sunscreens: an analysis of potential exposure and hazard. *Nanotoxicology* 4, 15–41. doi: 10.3109/17435390903502028
- Owen, R., Reilly, G. C., and Kingdom, U. (2018). *In vitro* models for studying bone remodelling. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 6:134. doi: 10.3389/fbioe.2018.00134
- Park, Y.-H., Jeong, S. H., Yi, S. M., Choi, B. H., Kim, Y.-R., Kim, I.-K., et al. (2011). Analysis for the potential of polystyrene and TiO₂ nanoparticles to induce skin irritation, phototoxicity, and sensitization. *Toxicol. In Vitro* 25, 1863–1869. doi: 10.1016/j.tiv.2011.05.022
- Pelclova, D., Navratil, T., Kacerova, T., Zamostna, B., Fenclova, Z., Vlkova, S., et al. (2019). NanoTiO₂ 2 sunscreen does not prevent systemic oxidative stress caused by UV radiation and a minor amount of NanoTiO₂ 2 is absorbed in humans. *Nanomaterials* 9:888. doi: 10.3390/nano9060888
- Potočnik, J. (2011). Commission recommendation of 18 october 2011 on the definition of nanomaterial (2011/696/EU). *Off. J. Eur. Union* 275, 38–40. Available online at: https://ec.europa.eu/research/industrial_technologies/pdf/policy/commission-recommendation-on-the-definition-of-nanomaterial-18102011_en.pdf
- Proquin, H., Rodríguez-ibarra, C., Moonen, C. G. J., Ortega, I. M. U., Bried, J. J., and Kok, T. M., De, et al. (2016). Titanium dioxide food additive (E171) induces ROS formation and genotoxicity: contribution of micro and nano-sized fractions. *Mutagenesis* 32, 139–149. doi: 10.1093/mutage/gev051
- Qiao, H., and Tang, T. (2018). Engineering 3D approaches to model the dynamic microenvironments of cancer bone metastasis. *Bone Res.* 6, 1–12. doi: 10.1038/s41413-018-0008-9
- Rampaul, A., Parkin, I. P., and Cramer, L. P. (2007). Damaging and protective properties of inorganic components of sunscreens applied to cultured human skin cells. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 191, 138–148. doi: 10.1016/j.jphotochem.2007.04.014
- Ribeiro, A. R., Leite, P. E., Falagan-Lotsch, P., Benetti, F., Micheletti, C., Budtz, H. C., et al. (2017). Challenges on the toxicological predictions of engineered nanoparticles. *NanoImpact* 8, 59–72. doi: 10.1016/j.impact.2017.07.006
- Salamanna, F., Contartese, D., Maglio, M., and Fini, M. (2016). A systematic review on *in vitro* 3D bone metastases models: a new horizon to recapitulate the native clinical scenario? *Oncotarget* 7:44803. doi: 10.18632/oncotarget.8394
- Sanches, P. L., Souza, W., Gemini-Piperni, S., Rossie, A. L., Scapin, S., Midlej, V., et al. (2019). Rutile nano-bio-interactions mediate dissimilar intracellular destiny in human skin cells. *Nanoscale Adv.* 1, 2216–2228. doi: 10.1039/C9NA00078J
- Saqui, Q., Al-Khedairy, A. A., Siddiqui, M. A., Abou-Tarboush, F. M., Azam, A., and Musarrat, J. (2012). Titanium dioxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in human amnion epithelial (WISH) cells. *Toxicol. Vitro* 26, 351–361. doi: 10.1016/j.tiv.2011.12.011
- Sarmiento, B., Andrade, F., Baptista, S., and Rodrigues, F. (2012). Cell-based *in vitro* models for predicting drug permeability. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 8, 607–621. doi: 10.1517/17425255.2012.673586

- Schäfer-Korting, M., Bock, U., Diembeck, W., Düsing, H. J., Gamer, A., Haltner-Ukomadu, E., et al. (2008). The use of reconstructed human epidermis for skin absorption testing: Results of the validation study. *ATLA Altern. Lab Anim.* 36, 161–187. doi: 10.1177/026119290803600207
- Schardt, C., Adams, M. B., Owens, T., Keitz, S., and Fontelo, P. (2007). Utilization of the PICO framework to improve searching PubMed for clinical questions. *BMC Med. Inform. Decis. Mak.* 7:16. doi: 10.1186/1472-6947-7-16
- Schneider, K., Schwarz, M., Burkholder, I., Kopp-Schneider, A., Edler, L., Kinsner-Ovaskainen, A., et al. (2009). "ToxRTool", a new tool to assess the reliability of toxicological data. *Toxicol. Lett.* 189, 138–144. doi: 10.1016/j.toxlet.2009.05.013
- Schneider, M., Stracke, F., Hansen, S., Schaefer, U. F. (2009). Nanoparticles and their interactions with the dermal barrier. *Dermatoendocrinology* 1, 197–206. doi: 10.4161/derm.1.4.9501
- Semenzin, E., Lanzellotto, E., Hristozov, D., Critto, A., Zabeo, A., Giubilo, E., et al. (2015). Species sensitivity weighted distribution for ecological risk assessment of engineered nanomaterials: the nTiO₂ case study. *Environ. Toxicol. Chem.* 34, 2644–2659. doi: 10.1002/etc.3103
- Senzui, M., Tamura, T., Miura, K., Ikarashi, Y., Watanabe, Y., and Fujii, M. (2010). Study on penetration of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles into intact and damaged skin *in vitro*. *J. Toxicol. Sci.* 35, 107–113. doi: 10.2131/jts.35.107
- Sethi, D., Pal, A., Sakthivel, R., Pandey, S., Dash, T., Das, T., et al. (2014). Journal of photochemistry and photobiology B : biology water disinfection through photoactive modified titania. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 130, 310–317. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2013.12.003
- Shakeel, M., Jabeen, F., Shabbir, S., Asghar, M. S., Khan, M. S., and Chaudhry, A. S. (2016). Toxicity of nano-titanium dioxide (TiO₂ -NP) through various routes of exposure : a review. *Biol. Trace Elem. Res.* 172, 1–36. doi: 10.1007/s12011-015-0550-x
- Sharifi, S., Behzadi, S., Laurent, S., and Forrest, M. L. (2012). Toxicity of nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.* 41, 2323–2343. doi: 10.1039/C1CS15188F
- Shetti, N. P., Bukhtigar, S. D., Reddy, K. R., Reddy, C. V., and Aminabhavi, T. M. (2019). Nanostructured titanium oxide hybrids-based electrochemical biosensors for healthcare applications. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 178, 385–394. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.03.013
- Shi, H., Magaye, R., Castranova, V., and Zhao, J. (2013). Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part. Fibre Toxicol.* 10:15. doi: 10.1186/1743-8977-10-15
- Shukla, R. K., Kumar, A., Vallabani, N. V. S., Pandey, A. K., and Dhawan, A. (2014). Titanium dioxide nanoparticle-induced oxidative stress triggers DNA damage and hepatic injury in mice. *Nanomedicine*. 9, 1423–1434. doi: 10.2217/nnm.13.100
- Singh, A. V., Laux, P., Luch, A., Sudrik, C., Wild, A., Santamauro, G., et al. (2019). Review of emerging concepts in nanotoxicology: opportunities and challenges for safer nanomaterial design. *Toxicol. Mech. Methods*. 29, 378–387. doi: 10.1080/15376516.2019.1566425
- Smijs, T. G., and Pavel, S. (2011). Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 4, 95–112. doi: 10.2147/NSA.S19419
- Tan, M., Commens, G. A., Burnett, L., and Snitch, P. J. (1996). A pilot study on the percutaneous absorption of microfine titanium dioxide from sunscreens. *Aust. J. Dermatol.* 37, 185–187. doi: 10.1111/j.1440-0960.1996.tb01050.x
- Tang, Y., Cai, R., Cao, D., Kong, X., and Lu, Y. (2018). Photocatalytic production of hydroxyl radicals by commercial TiO₂ nanoparticles and phototoxic hazard identification. *Toxicology* 406–407, 1–8. doi: 10.1016/j.tox.2018.05.010
- Touloumes, G. J., Ardoña, H. A. M., Evan, K., Zimmerman, J. F., Chantre, C. O., Demokritou, P., et al. (2020). Mapping 2D- and 3D-distributions of metal/metal oxide nanoparticles within cleared human *ex vivo* skin tissues. *Nanoimpact* 17:100208. doi: 10.1016/j.impact.2020.100208
- Tucci, P., Porta, G., Agostini, M., Dinsdale, D., Iavicoli, I., Cain, K., et al. (2013). Metabolic effects of TiO₂ nanoparticles, a common component of sunscreens and cosmetics, on human keratinocytes. *Cell Death Dis.* 4:e549. doi: 10.1038/cddis.2013.76
- Vernetti, L., Gough, A., Baetz, N., Blutt, S., Broughman, J. R., Brown, J. A., et al. (2017). Corrigendum: functional coupling of human microphysiology systems: intestine, liver, kidney proximal tubule, blood-brain barrier and skeletal muscle. *Sci. Rep.* 7:44517. doi: 10.1038/srep44517
- Wang, S. Q., and Tooley, I. R. (2011). Photoprotection in the era of nanotechnology. *YSDER Semin. Cutan. Med. Surg.* 30, 210–213. doi: 10.1016/j.sder.2011.07.006
- Wang, Y., Cui, H., Zhou, J., and Li, F. (2014). Cytotoxicity, DNA damage and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 5519–5530. doi: 10.1007/s11356-014-3717-7
- Wiesenthal, A., Hunter, L., Wang, S., Wickliffe, J., and Wilkerson, M. (2011). Nanoparticles: Small and mighty. *Int. J. Dermatol.* 50, 247–254. doi: 10.1111/j.1365-4632.2010.04815.x
- Wolf, R., Wolf, D., Morganti, P., and Ruocco, V. (2001). Sunscreens. *Elsevier Sci. Inc. All Rights Reserv.* 19, 452–459. doi: 10.1016/S0738-081X(01)0190-0
- Wu, J., Liu, W., Xue, C., Zhou, S., Lan, F., Bi, L., et al. (2009). Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicol. Lett.* 191, 1–8. doi: 10.1016/j.toxlet.2009.05.020
- Yu, B., Ai, K., and Lu, L. (2020). Dual-protective nano-sunscreen enables high-efficient elimination of the self-derived hazards. *Appl. Mater. Today* 18:100493. doi: 10.1016/j.apmt.2019.100493
- Zhao, Y., Howe, J. L. C., Yu, Z., Leong, D. T., Chu, J. J. H., Loo, J. S. C., et al. (2013). Exposure to titanium dioxide nanoparticles induces autophagy in primary human keratinocytes. *Small* 9, 387–392. doi: 10.1002/sml.2012.01363

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Sanches, Geaquito, Cruz, Schuck, Lorencini, Granjeiro and Ribeiro. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.