



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

RENATO IVAN DE ÁVILA MARCELINO

**Desenvolvimento de plataforma multiparamétrica substitutiva
ao uso de animais de laboratório para avaliação do
potencial alergênico de misturas da “vida real”**

**Goiânia
2018**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS
DE TESES E
DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☒ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

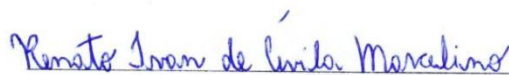
Nome completo do autor: Renato Ivan de Ávila Marcelino

Título do trabalho: Desenvolvimento de plataforma multiparamétrica substitutiva ao uso de animais de laboratório para avaliação do potencial alergênico de misturas da "vida real"

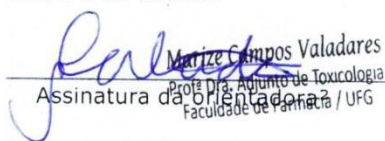
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do autor²

Ciente e de acordo:


Assinatura da orientadora²
Marize Campos Valadares
Profa. Dra. Adjunta de Toxicologia
Faculdade de Farmácia / UFG

Data: 19 / 02 / 19

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

²A assinatura deve ser escaneada.

RENATO IVAN DE ÁVILA MARCELINO

**Desenvolvimento de plataforma multiparamétrica substitutiva
ao uso de animais de laboratório para avaliação do
potencial alergênico de misturas da “vida real”**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde da Universidade Federal de
Goiás para obtenção do título de Doutor
em Ciências da Saúde.

Orientadora: Marize Campos Valadares

**Goiânia
2018**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

de Ávila Marcelino, Renato Ivan

Desenvolvimento de plataforma multiparamétrica substitutiva ao
uso de animais de laboratório para avaliação do potencial alergênico de
misturas da "vida real" [manuscrito] / Renato Ivan de Ávila Marcelino. -
2018.

xxvii, 119 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Marize Campos Valadares.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade de
Medicina (FM), Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde,
Goiânia, 2018.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, lista de figuras, lista de
tabelas.

1. Dermatite alérgica de contato. 2. Hipersensibilidade tardia. 3.
Rotas de resultados adversos. 4. Técnicas in vitro. 5. Toxicologia. I.
Campos Valadares, Marize, orient. II. Título.

CDU 615

Ata da **Defesa de Tese de Doutorado** realizada por **Renato Ivan de Ávila Marcelino**. Aos **sete dias do mês de dezembro de 2018 às 14:00**, reuniu-se no Miniauditório da Faculdade de Farmácia/UFG, a Comissão Julgadora infra nomeada para proceder ao julgamento da defesa de Tese intitulada: **"DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA MULTIPARAMÉTRICA SUBSTITUTIVA AO USO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ALERGÊNICO DE MISTURAS DA "VIDA REAL"**", como parte de requisitos necessários à obtenção do **título de Doutor**, área de concentração **PATOLOGIA, CLÍNICA E TRATAMENTO DAS DOENÇAS HUMANAS**. A Presidente da Comissão julgadora, **Profª. Drª. Marize Campos Valadares**, iniciando os trabalhos concedeu a palavra ao candidato, para exposição em até **50 minutos** do seu trabalho. A seguir, a senhora presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a arguir o candidato durante o prazo máximo de 30 minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para responder aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição que se desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o candidato aprovado ou reprovado.

Banca Examinadora

Profª. Drª. Marize Campos Valadares – Presidente
Profª. Drª. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro – Membro
Profª. Drª. Simone Gonçalves da Fonseca – Membro
Prof. Dr. Pedro Paulo Chaves de Souza – Membro
Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha – Membro
Profª. Drª. Kênnia Rocha Rezende – Suplente
Profª. Drª. Thaisângela Rodrigues Lopes e Silva Gomes – Suplente

Aprovado (a)/Reprovado(a)

Aprovado
APROVADO
Aprovado
APROVADO
Aprovado
APROVADO
Aprovado
APROVADO

Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o candidato **Renato Ivan de Ávila Marcelino** **Habilitado (X)** Não habilitado (). Nada mais havendo a tratar, eu, **Profª. Drª. Marize Campos Valadares** lavrei a presente ata que, após lida e achada conforme foi por todos assinada.

Profª. Drª. Marize Campos Valadares – Presidente
Profª. Drª. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro – Membro
Profª. Drª. Simone Gonçalves da Fonseca – Membro
Prof. Dr. Pedro Paulo Chaves de Souza – Membro
Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha – Membro
Profª. Drª. Kênnia Rocha Rezende – Suplente
Profª. Drª. Thaisângela Rodrigues Lopes e Silva Gomes – Suplente

Assinatura

Marize Campos Valadares
Marize Campos Valadares
Simone Gonçalves da Fonseca
Simone Gonçalves da Fonseca
Pedro Paulo Chaves de Souza
Pedro Paulo Chaves de Souza
Luiz Carlos da Cunha
Luiz Carlos da Cunha
Kênnia Rocha Rezende
Kênnia Rocha Rezende
Thaisângela Rodrigues Lopes e Silva Gomes
Thaisângela Rodrigues Lopes e Silva Gomes

A banca examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Tese:

Nada a declarar
Nada a declarar

Renato Ivan de Ávila Marcelino
Renato Ivan de Ávila Marcelino
Renato Ivan de Ávila Marcelino

**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno: Renato Ivan de Ávila Marcelino

Orientadora: Marize Campos Valadares

Membros:

1. Marize Campos Valadares – FF/UFG

2. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro – FF/USP

3. Simone Gonçalves da Fonsenca – IPTSP/UFG

4. Pedro Paulo Chaves de Souza – FO/UFG

5. Luiz Carlos da Cunha – FF/UFG

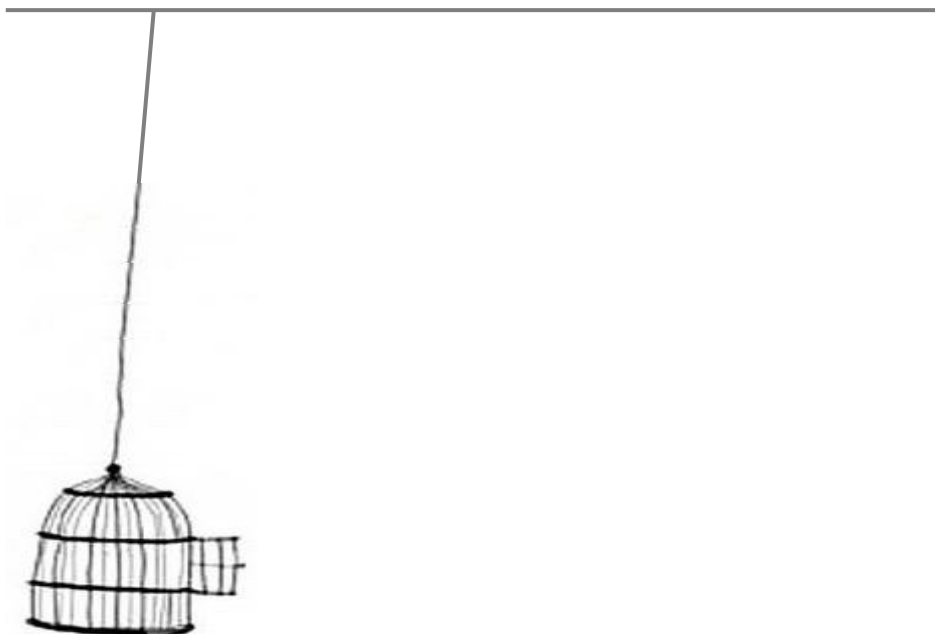
Suplentes:

6. Kênnia Rocha Rezende – FF/UFG

7. Thaisângela Rodrigues Lopes e Silva Gomes – FF/UFG

Data: 07/12/2018

Dedico este trabalho à minha mãe, Constância Maria de Jesus.



*A estrada da vida é uma reta marcada de encruzilhadas.
Caminhos certos e errados, encontros e desencontros
do começo ao fim.
Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.*
Cora Coralina (1889-1985)

*A educação não transforma o mundo.
A educação muda pessoas.
Pessoas transformam o mundo.*
Paulo Freire (1921-1997)

*I encourage all of us, whatever our beliefs, to question the basic
narratives of our world, to connect past developments with present
concerns, and not to be afraid of controversial issues.*
Yuval Noah Harari (Sapiens: a brief history of humankind, 2014)

AGRADECIMENTOS

A Deus

Por ter me concebido proteção, sabedoria e saúde para a realização desse trabalho.

À minha orientadora, Marize Campos Valadares,

Que foi a responsável por me introduzir às atividades de pesquisa como minha orientadora de iniciação científica na graduação, em 2008, no mestrado (2011-2013) e agora nessa importante etapa da minha vida, o doutorado (2014-2018). Agradeço também imensamente pela amizade construída nesses anos e pelos votos de confiança em meu trabalho nesses 10 anos juntos.

À Universidade Federal de Goiás – UFG,

Toda sua equipe técnico-administrativa, minhas Professoras e Professores envolvidos na minha formação nesses 12 anos de estudos na UFG (2006-2018).

Aos meus amigos de Laboratório, em especial...

Ao Gabriel Campos Teixeira que, hoje Farmacêutico, foi um aluno de iniciação científica muito esforçado, inteligente, responsável, dedicado e parceiro de bancada nas análises cromatográficas realizadas nesse trabalho.

Ao Danilo Fabrini M. C. Veloso pela amizade, pelo bom humor e pela paciência com a minha ansiedade durante as análises cromatográficas. Agradeço a ele e a Profa. Eliana Martins Lima pela parceria estabelecida nesse trabalho, que foi fundamental no estudo envolvendo cromatografia líquida de alta eficiência.

À Thaisângela Lopes Rodrigues, sempre tão amável, amiga e pela ajuda na bancada com as culturas celulares e ensaios de biologia molecular.

Também agradeço imensamente a Profa. Simone Gonçalves da Fonseca e toda sua equipe pela parceria estabelecida na condução dos ensaios envolvendo células dendríticas.

Ao Farmacêutico Ramias Vieira Calixto Freire, do Laboratório Rômulo Rocha, Faculdade de Farmácia – UFG,

Pela amizade e apoio técnico, sempre tão solícito e disposto a ajudar.

Aos voluntários da minha pesquisa,

Pelo reconhecimento da importância desse trabalho e por fornecerem amostras de sangue para a realização de parte das minhas análises.

Às minhas amigas na Europa, em especial...

À equipe do Departamento de Imunotecnologia e à Profa. Malin Lindstedt, *Lunds Universitet* (Lund, Suécia), que, em 2014, me aceitou prontamente a me orientar no meu período sanduíche, realizado em julho-abril/2018. Agradeço imensamente por contribuir com a minha formação. Ao seu aluno de doutorado, Tim Lindberg, pelo treinamento e ajuda nas análises que realizei durante o período sanduíche.

Também agradeço Anna C. Hansson, Andy Forreryd, Angelica Johansson, Maria Agemark e toda a equipe da SenzaGen AB (Lund, Suécia) pela amizade e apoio técnico-científico.

Também não posso me esquecer dos meus amigos Christina Sakellariou, Valentina Sino, Benjamin Sanderson e Anders Mortensen. Obrigado pela amizade e por todo apoio durante o meu período na Escandinávia.

À Lunds Universitet (Lund, Suécia),

Instituição que me recebeu e a qual realizei meu período sanduíche, sob a supervisão da Profa. Dra. Malin Lindstedt.

Às minhas amigas do Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros – LACEN/SES/GO, em especial...

Nadir Manso, Elke Xavier, Myriam Campos e Marcelo Santalucia por me apoiarem durante essa etapa da minha vida.

À minha mãe Constância Maria de Jesus,

A qual eu dedico esse trabalho, que sempre se preocupou com a minha formação, que sempre foi e é uma grande mãe! Obrigado pela força, pelo amor, pelo carinho.

Ao meu irmão e meu pai,

Paulo Henrique M. de Ávila e Ivone M. de Almeida, que me apoiaram nessa caminhada.

A todos os meus familiares, amigas e amigos,

Sem citar nomes para não esquecer alguém, obrigado por acreditarem no meu potencial, por me apoiarem e por fazerem parte da minha vida.

Às Instituições Financiadoras,

Durante minha trajetória como aluno de doutorado, tive a oportunidade de participar de cursos, palestras e outros eventos científicos, com apresentação de trabalhos (pôster, comunicação oral) ou como palestrante, utilizando recursos próprios e auxílio financeiro da minha orientadora, Profa. Marize C. Valadares. Também tive apoio de instituições nacionais e internacionais, tais como Fundação de Apoio ao Hospital das Clínicas da UFG (FUNDAHIC), Universidade Federal de Goiás, SenzaGen AB (Suécia), *European Society of Toxicology In Vitro* (ESTIV) e/ou *European Societies of Toxicology* (EUROTOX).

Agradeço também a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e Fundação de Apoio à Pesquisa da UFG (FUNAPE) pelo auxílio administrativo e/ou financeiro concedido ao nosso Laboratório para o desenvolvimento desse trabalho. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 teve um importante apoio na minha formação, inclusive financiando meu período sanduíche na Suécia.

Um agradecimento também para a *Lush Prize Fund* (<https://lushprize.org/>) e a *Ethical Consumer Research Association* (<https://www.ethicalconsumer.org/>) por juntas criarem o “*The Lush Prize*”, uma premiação internacional muito importante na área de estudos substitutivos à experimentação animal e o qual fui contemplado em 2017 na categoria “*Young Researcher Americas*”. O financiamento recebido foi fundamental para esse trabalho e também na minha participação em eventos científicos.

A todos aqueles que tornaram esse trabalho possível,
Eu me sinto honrado em expressar minha gratidão!

ACKNOWLEDGEMENT

To God,

For having provided me protection, wisdom, and health to accomplish this work.

To Professor Marize Campos Valadares,

Who was responsible for introducing me to research as my supervisor during my undergraduate degree (scientific initiation period) in 2008, my master's degree (2011-2013) and now in this important stage of my life, the doctorate (2014-2018). I also thank you immensely for the friendship we have built and for the votes of confidence in my work over these 10 years together.

To the Federal University of Goiás - UFG,

Its entire technical-administrative staff and my professors involved in my learning and training in these 12 years at the UFG (2006-2018).

To my UFG lab mates, in particular...

To Gabriel Campos Teixeira, who is now a Pharmacist, and has always been a very intelligent, responsible, dedicated student of scientific research and a lab partner in the chromatographic analyses.

To Danillo Fabrini M. C. Veloso for friendship, good humor and patience with my stress during the chromatographic analyses. I thank him and Prof. Eliana Martins Lima for the partnership established in this work, which was fundamental in the study involving high performance liquid chromatography.

To Thaisângela Lopes Rodrigues, always so kind, friendly and for the help in the lab with cell cultures and molecular biology assays.

I also thank Prof. Simone Gonçalves Fonseca and all her team for the partnership established in conducting the tests involving dendritic cells.

To Pharmacist Ramias Vieira Calixto Freire, from Rômulo Rocha's Laboratory, Faculty of Pharmacy - UFG,

For the friendship and technical support, always so gracious and willing to help me.

To the volunteers of my research,

For the recognition of the importance of this work and for providing blood samples to perform my analyses.

To my friends in Europe, in special...

Department of Immunotechnology team and Prof. Malin Lindstedt, Lunds Universitet (Lund, Sweden), who, in 2014, accepted me without hesitation to supervise my doctorate exchange, held in July-April/2018. Thank you very much for contributing to my training. To her doctorate student, Tim Lindberg, for training and assisting in the analysis I did during my exchange. Also I thank Kathrin Zeller for the interesting conversations about *in vitro* testing.

I also thank Anna C. Hansson, Andy Forreryd, Angelica Johansson, Maria Agemark and the entire staff from SenzaGen AB (Lund, Sweden) for their friendship and technical-scientific support.

I cannot forget my friends Christina Sakellariou, Valentina Sino, Ben Sanderson and Anders Mortensen. Thanks for the friendship and support during my time in Scandinavia.

To the Lunds Universitet (Lund, Sweden),

Institution that received me and where I did my doctorate exchange, under the supervision of Prof. Dr. Malin Lindstedt.

To my friends from the Dr. Giovanni Cysneiros' Public Health Laboratory - LACEN/SES/GO, in particular...

Nadir Manso, Elke Xavier, Myriam Campos and Marcelo Santalucia for supporting me during this stage of my life.

To my mother Constância Maria de Jesus,

To whom I dedicate this work, who always worried about my education, and who has always been and is a great mother! Thank you for the strength, for the love, for the affection.

To my brother and father,

Paulo Henrique M. de Ávila and Ivone M. de Almeida, who supported me in this journey.

To all my family and friends,

Without mentioning names so as not to forget anyone from the long list, thank you for believing in my potential, for supporting me and for being part of my life.

To the Financial Institutions,

During my career as a doctoral student, I had the opportunity to attend a number of courses, lectures and other scientific events, either to present my research or as a speaker, using my own resources and financial assistance from my supervisor, Prof. Marize C. Valadares. I was also supported by national and international institutions such as the Fundação de Apoio ao Hospital das Clínicas da UFG (FUNDAH), Universidade Federal de Goiás, SenzaGen AB (Sweden), European Society of Toxicology *In Vitro* (ESTIV) and/or European Societies of Toxicology (EUROTOX).

Thanks also to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e Fundação de Apoio à Pesquisa da UFG (FUNAPE) for the administrative aid and/or financial support granted to our Laboratory for the development of this work. The Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Financing Code 001 had an important support in my education, including financial support for my doctorate exchange in Sweden.

Thanks also to the Lush Prize Fund (<https://lushprize.org/>) and the Ethical Consumer Research Association (<https://www.ethicalconsumer.org/>) for jointly creating The Lush Prize, a very important international award supporting research for alternatives to animal experimentation and who kindly recognised my work in 2017 by selecting me for the "Young Researcher Americas" award. The funding received was essential for this work and also for my participation in scientific events.

To all those who have made this work possible,
I feel honored to express my gratitude!

SUMÁRIO

TABELAS, QUADROS, FIGURAS E ANEXOS

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 CENÁRIO BRASILEIRO NA ÁREA DE MÉTODOS SUBSTITUTIVOS AOS MODELOS ANIMAIS PARA AVALIAÇÃO DE REAÇÕES ALÉRGICAS DE CONTATO	14
2.1.1 Testes de materiais cosméticos e de cuidados de higiene pessoal	14
2.1.2 Testes de agrotóxicos e seus ingredientes	15
2.1.3 Testes de medicamentos	16
2.2 REAÇÕES ALÉRGICAS DE CONTATO NO CONTEXTO DA TOXICOLOGIA	16
2.2.1 Sensibilização dérmica	17
2.2.2 Fotossensibilização dérmica	22
2.3 AVALIAÇÃO DAS REAÇÕES ALÉRGICAS DE CONTATO	24
2.3.1 Ensaios em humanos	25
2.3.2 Ensaios em roedores	27
2.3.3 Ensaios <i>in vitro</i>	33
2.3.3.1 DPRA	34
2.3.3.2 KeratinoSens TM e LuSens	35
2.3.3.3 h-CLAT, U-SENS TM e IL-8-Luc-assay	37
2.3.3.4 Ensaios não incluídos em diretrizes OECD.....	40
3 JUSTIFICATIVA	41
4 OBJETIVOS	42
4.1 OBJETIVO GERAL	42

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4.2.1 Estudos envolvendo ingredientes e formulações de agrotóxicos: implementação e refinamentos desenvolvidos na técnica DPRA e avaliação de fototoxicidade	42
4.2.2 Estudos envolvendo ingredientes cosméticos e/ou tinturas de cabelo do tipo henna: estabelecimento de uma plataforma multiparamétrica <i>in vitro</i> para sensibilização dérmica	42
5 MÉTODOS	44
5.1 CRONOGRAMA EXPERIMENTAL	44
5.2 REAGENTES	44
5.3 LINHAGENS CELULARES	46
5.4 MATERIAIS-TESTE	47
5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS COSMÉTICOS HENNA.....	48
5.6 ENSAIO DE REATIVIDADE DE PROTEÍNAS	50
5.6.1 Condições cromatográficas	51
5.6.2 Preparo das soluções-estoque dos materiais-teste	52
5.6.3 Preparo das soluções de peptídeos	52
5.6.4 Incubação dos materiais-teste com as soluções de peptídeos	53
5.6.5 Análise de dados	54
5.7 ENSAIO DE ATIVAÇÃO DE QUERATINÓCITOS	55
5.7.1 Preparo das soluções-estoque dos materiais-teste	58
5.7.2 Ensaio MTT	58
5.7.3 Avaliação de produção intracelular de IL-18	58
5.7.4 Análise de expressão de <i>NRF2</i> , <i>HO1</i> e <i>FOS</i>	60
5.7.4.1 Exposição das células e extração de RNA.....	60
5.7.4.2 Análise de expressão dos RNA mensageiros.....	61
5.8 ENSAIOS DE ATIVAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS	62
5.8.1 Preparo das soluções-estoque dos materiais-teste	62
5.8.2 U-SENS TM e análise dos níveis de IL-8	62

5.8.2.1 Ensaio de citotoxicidade	63
5.8.2.2 Análise da expressão de CD86	64
5.8.2.3 Análise da produção de IL-8.....	65
5.8.3 PBMDCT	66
5.8.3.1 Obtenção de amostras de sangue periférico	66
5.8.3.2 Processamento do sangue	68
5.8.3.2.1 Obtenção de células mononucleares	68
5.8.3.2.2 Isolamento de monócitos e diferenciação em células dendríticas	69
5.8.3.2.3 Avaliação de citotoxicidade e análise da expressão de CD86	70
5.8.4 GARD™ skin	71
5.8.4.1 Preparo das soluções-estoque dos materiais-teste	79
5.8.4.2 Análise fenotípica das células derivadas da linhagem MUTZ-3	79
5.8.4.3 Análise de citotoxicidade	80
5.8.4.4 Análise da assinatura gênica do GARD™ skin	80
5.9 Ensaio de fototoxicidade	82
5.9.1 Preparo das soluções-estoque dos materiais-teste	83
5.9.2 Exposição aos materiais-teste	83
5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	84
6 PUBLICAÇÕES	85
7 CONCLUSÕES	87
8 PERSPECTIVAS	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
ANEXOS	100
Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética	114
Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	117

TABELAS, QUADROS, FIGURAS E ANEXOS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de núcleos de estudo para desenvolvimento e validação de metodologias inovadoras substitutivas ao uso de animais na Europa, Estados Unidos e Ásia	5
Tabela 2. Relação cronológica das localidades brasileiras onde os testes de cosméticos em animais são proibidos até o momento	9
Tabela 3. Relação dos ensaios inovadores <i>in vitro</i> de relevância humana estudados no presente trabalho. Os ensaios em destaque representam aqueles com maior predição na identificação de ingredientes de tintura capilar com potencial de sensibilização dérmica, e considerados aptos a compor uma estratégia integrada de testes <i>in vitro</i> para avaliação de misturas da “vida real” (tinturas hennas)	13
Tabela 4. Principais características das reações dérmicas fotoalérgicas e fototóxicas de acordo com ONOUE <i>et al.</i> (2017)	23
Tabela 5. Abordagens propostas para realizar o teste do emplastro em humanos para identificação de sensibilizantes dérmicos	26
Tabela 6. Modelos usando camundongos para avaliação do potencial de materiais em desencadear reações alérgicas e fotoalérgicas na pele	28
Tabela 7. Modelos usando cobaias para avaliação do potencial de materiais em desencadear reações alérgicas e fotoalérgicas na pele	29
Tabela 8. Dados das seis formulações comerciais, contendo glifosato como princípio ativo, vendidas no Brasil	47
Tabela 9. Ingredientes declarados nos rótulos dos cosméticos para coloração capilar à base de henna [<i>L. inermis</i> (Lythraceae)] comercializados em Goiânia, Goiás, Brasil. Os ingredientes são apresentados na ordem de maior quantidade presente no produto, embora a quantidade de cada um não seja fornecida pelos fabricantes	48
Tabela 10. Relação dos solventes utilizados para preparo de soluções de cada material-teste para realização do ensaio de reatividade de proteínas	50
Tabela 11. Modelo de predição do <i>direct peptide reactivity assay</i> (DPRA) (OECD, 2015a), baseado na depleção média dos peptídeos contendo lisina ou cisteína, e também adotado para o <i>micro-direct peptide reactivity assay</i> (mDPRA) e photo-mDPRA	55
Tabela 12. Sequência dos <i>primers</i> utilizados para a realização das análises de expressão dos RNA mensageiros de <i>NRF2</i> , <i>HO1</i> e <i>FOS</i> através da técnica de reação quantitativa em cadeia da polimerase em tempo real	61
Tabela 13. Relação dos genes de referência e dos biomarcadores genômicos, a assinatura de predição do <i>Genomic Allergen Rapid Detection</i> (GARD™ skin)	71
Tabela 14. Modelo de predição do teste de fototoxicidade <i>in vitro</i> baseado na captação de vermelho neutro por células 3T3	84

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Proporções definidas dos componentes da fase móvel (fase aquosa A e fase orgânica B) usada na análise cromatográfica das amostras para realização do ensaio de reatividade de proteínas	51
Quadro 2. Volumes de reações para cada peptídeo utilizado no ensaio de reatividade de proteínas	53
Quadro 3. Relação dos volumes de anticorpos e iodeto de propídio usados na análise fenotípica das células derivadas da linhagem mieloide para condução do ensaio <i>Genomic Allergen Rapid Detection</i> (GARD™ skin)	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cronologia de fatos importantes na área de métodos alternativos, em particular sensibilização dérmica, que têm contribuído com o desenvolvimento do “fazer <i>in vitro</i> ” no mundo e no Brasil	11
Figura 2. Representação da fase de indução do processo de sensibilização dérmica: (1) introdução do alérgeno na epiderme e (2) reação com as proteínas dérmicas (formação do complexo proteína-antígeno); (3) ativação de células dendríticas; (4) migração de células dendríticas ativadas para o linfonodo local; (5) ativação linfocitária e expansão clonal de células T ativadas específicas ao alérgeno de contato	20
Figura 3. Representação da fase de elicitação do processo de sensibilização dérmica: (1) contato repetido com alérgeno, (2) formação do complexo proteína-hapteno (3) e seu processamento pelas células dendríticas, (4) as quais o apresentarão aos linfócitos T de memória circulantes. A consequência bioquímica disso é a secreção de citocinas, as quais induzem a liberação de componentes moleculares e celulares inflamatórios e mobilização de células T citotóxicas presentes na circulação sanguínea, culminando em uma (5) resposta inflamatória local	21
Figura 4. Exemplo de uma resposta inflamatória desencadeada pelo uso de uma tintura de cabelo: a jovem C. R., antes e durante internação hospitalar de três dias após uma reação súbita e grave de sensibilização dérmica	21
Figura 5. Via do efeito adverso (<i>adverse outcome pathway</i> , AOP) da sensibilização dérmica	22
Figura 6. Esquema da via de desfecho adverso (<i>adverse outcome pathway</i> , AOP) da sensibilização dérmica, destacando cada evento-chave e os respectivos ensaios <i>in vitro</i> validados até o momento, bem como técnicas <i>in vivo</i> envolvendo animais e seres humanos	34
Figura 7. Esquema do processo de ativação da via regulatória Keap1-Nrf2-ARE por sensibilizantes dérmicos	36
Figura 8. Relação dos protocolos experimentais realizados para o desenvolvimento do presente trabalho	44
Figura 9. Caracterização dos produtos cosméticos henna vendidos em Goiânia, Goiás, Brasil, quanto ao teor de <i>p</i> -fenilenodiamina (<i>p-phenylenediamine</i> , PPD) e lawsone: A) fluxograma de trabalho; B) cromatograma representativo de um produto	

henna, o qual foi detectado a presença de PPD e lawsone (tempos de retenção: ~2,3 e 8,1 min, respectivamente)	49
Figura 10. Curvas de calibração obtidas para determinação de lawsone e <i>p</i> -fenilenodiamina (PPD) em amostras de cosméticos para coloração capilar à base de henna [<i>L. inermis</i> (Lythraceae)] comercializados em Goiânia, Goiás, Brasil	49
Figura 11. Representação das etapas experimentais de condução dos ensaios de reatividade de proteínas	51
Figura 12. Curvas de calibração dos peptídeos contendo de cisteína ou lisina	53
Figura 13. Representação de uma análise de <i>micro-direct peptide reactivity assay</i> (mDPRA), destacando a depleção de peptídeos ocorrida após incubação de 24 h com um material-teste	54
Figura 14. Representação das etapas experimentais de condução do ensaio de ativação de queratinócitos HaCaT através de quantificação dos níveis de IL-18	56
Figura 15. Representação das etapas experimentais de condução do ensaio de ativação de queratinócitos HaCaT através das análises de expressão dos RNA mensageiros de <i>NRF2</i> , <i>HO1</i> e <i>FOS</i> através da técnica de reação quantitativa em cadeia da polimerase em tempo real	57
Figura 16. Representação das etapas experimentais de condução dos ensaios <i>U937 cell line activation test</i> (U-SENS TM) e quantificação de IL-8	63
Figura 17. Representação de uma análise de <i>U937 cell line activation test</i> (U-SENS TM), destacando a expressão basal de CD86 em células U937 não expostas (grupo controle) e o aumento da expressão de CD86 em células U937 após exposição a um determinado material-teste por 45 h	65
Figura 18. Representação das etapas experimentais de condução do ensaio <i>peripheral blood monocyte-derived dendritic cell test</i> (PBMDCT)	67
Figura 19. Células mononucleares isoladas em amostras de sangue periférico humano	68
Figura 20. Fenotipagem representativa de monócitos e células dendríticas: A) monócitos isolados de sangue periférico humano, observando alta expressão de CD14; B) células dendríticas imaturas derivadas de monócitos, observando baixa expressão de CD14 e CD86 e aumento de expressão de CD11c	70
Figura 21. Representação das etapas experimentais de condução do ensaio <i>Genomic Allergen Rapid Detection</i> (GARD TM skin)	78
Figura 22. Fenotipagem representativa das células derivadas da linhagem mieloide utilizadas no ensaio <i>Genomic Allergen Rapid Detection</i> (GARD TM skin)	80
Figura 23. Etapas para condução da análise <i>multiplex</i> no formato “códigos de barras” utilizada no ensaio <i>Genomic Allergen Rapid Detection</i> (GARD TM skin)	81
Figura 24. Etapas para condução do ensaio <i>3T3 neutral red uptake phototoxicity test</i> (3T3-NRU-PT) - OECD 432 (2004)	83
Figura 25. Resumo dos principais achados deste trabalho no contexto da via do efeito adverso (<i>adverse outcome pathway</i> , AOP) da sensibilização dérmica: a contribuição do estudo para a Toxicologia do Século XXI	89

Figura 26. Processo de internacionalização da pesquisa brasileira: alguns exemplos de chamadas de noticiários destacando o reconhecimento dos trabalhos obtidos durante o desenvolvimento dessa tese 91

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética 114

Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) 117

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

3Rs - *replacement, reduction and refinement*

3T3-NRU-PT - *3T3 neutral red uptake phototoxicity test*

ABIHPEC - Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos

AKR1C2 - gene humano aldo-keto redutase

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOP - *adverse outcome pathway*

AREs - *antioxidant/electrophile response elements*

ATP - adenosina trifosfato

BraCVAM - *Brazilian Center for Validation of Alternative Methods*

BrdU - 5-bromo-2-desoxiuridina

BT - *Buehler test*

CAAT - *Center for Alternatives to Animal Testing*

CAE - Comissão de Assuntos Econômicos

CCT - Comissão de Ciência, Tecnologia, Inovação, Comunicação e Informática

CE3 - concentração estimada do material-teste necessária para induzir um aumento de 3 vezes na proliferação de células dos nódulos linfáticos

C_{IE150} - concentração teórica do material-teste que induz um índice de estimulação de 150

CLP - *European regulation on classification, labeling and packaging*

CMA - Comissão do Meio Ambiente

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DL₅₀ - dose de uma substância que promove letalidade em 50% de uma população animal

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO - dimetilsulfóxido

DPRA - *direct peptide reactivity assay*

EC₂₀ - concentração do material-teste que induz um CD86 = 20%

ECVAM - *European Centre for the Validation of Alternative Methods*

ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*

EROs - espécies reativas de oxigênio

FCM - *flow cytometry method*

FOS - *Fos proto-oncogene*

GAPDH - gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GARD™ skin – *genomic allergen rapid detection*
 GM-CSF - *human granulocyte macrophage-colony stimulating factor*
 GPMT - *guinea pig maximization test*
 h-CLAT - *human cell line activation test*
 HO1 - *Heme oxygenase 1*
 HPLC - *high-performance liquid chromatography*
 HPRT1 - *Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*
 HRIPT - *human repeat insult patch test*
 IATA - *integrated approaches to testing and assessment*
 ICCVAM - *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*
 IE - índice de estimulação
 IIVS - *Institute for In Vitro Sciences*
 IL - interleucina
 IL-8-Luc-assay - *IL-8 reporter gene assay*
 IMDS - *integrated model for the differentiation of skin reactions*
 INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
 JaCVAM - *Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods*
 Keap1 - *sensor protein Kelch-like ECH-associated protein 1*
 LLNA - *local lymph node assay*
 MCTI - Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação
 MCTIC - Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
 mDPRA - *micro-direct peptide reactivity assay*
 MEM- α - *minimum essential medium*
 MESA - *mouse ear swelling assay*
 MEST - *mouse ear swelling test*
 MHC - *major histocompatibility complex*
 MPE - *mean photo effect*
 MTT - brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
 MUSST - *myeloid U937 skin sensitization test*
 NC3Rs - *National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research*
 NESIL - *no expected sensitization induction level*
 NOEL - *no observed effect level*
 NQO1 - gene de rato NADPH: quinona oxidoreductase 1
 NRC - *National Research Council*

Nrf2 ou *NRF2* - *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*

OECD - *Organisation for Economic Co-operation and Development*

P&D - pesquisa, desenvolvimento e inovação

PBMDCt – *peripheral blood monocyte-derived dendritic cell test*

Photo-mDPRA - *photo-micro-direct peptide reactivity assay*

PIF - *photo-irritation-factor*

PLC - projeto de lei da câmara

PLNA - *popliteal lymph node assay*

PM - peso molecular

POEA - *polyethylated tallow amine*

PPD - *p-phenylenediamine*

PReMASUL - Métodos Alternativos ao Uso de Animais de Experimentação

qPCR - *quantitative real-time polymerase chain reaction*

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

REACH - *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*

RedeEH - Rede de Desenvolvimento Humano

RENAMA - Rede Nacional de Métodos Alternativos

rLLNA - *reduced local lymph node assay*

RNA_m - RNA mensageiro

RPMI-1640 - *Roswell Park Memorial Institute-1640 medium*

SLNA - *sensitive mouse lymph node assay*

SSBH - solução salina balanceada de Hank

SVM - *support vector machine*

STF - Supremo Tribunal Federal

TOX IN - Laboratório de Ensino e Pesquisa em Toxicologia *In Vitro*

U-SENSTM - *U937 cell line activation test*

UN GHS - *United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*

VC₇₀ - concentração de cada material-teste que mantém a viabilidade celular em 70%

VC₈₀ - concentração de cada material-teste que mantém a viabilidade celular em 80%

VR₉₀ - concentração do material-teste que promove 90% de viabilidade celular relativa quando comparado com as células controle

ZEBET - *Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch*

RESUMO

Desenvolvimento de plataforma multiparamétrica substitutiva ao uso de animais de laboratório para avaliação do potencial alergênico de misturas da “vida real”

A experimentação animal tem sido um grande aliado do homem no progresso da Ciência. Contudo, muito tem se discutido sobre a capacidade preditiva desses modelos *in vivo* em identificar substâncias químicas tóxicas para o ser humano. O avanço do conhecimento científico do Século XXI tem incentivado a busca de modelos preditivos que considerem a fisiologia do organismo humano, bem como a fisiopatologia das reações adversas física e quimicamente induzidas. Nesse contexto, o foco do presente estudo foi a avaliação de toxicidade dérmica de ingredientes de tinturas de cabelo e agrotóxicos e seus produtos acabados, denominados aqui de misturas da “vida-real” (a real condição que o consumidor está exposto). Uma estratégia integrada de testes *in vitro* foi desenvolvida para avaliar o potencial desses materiais em induzir reações alérgicas quando em contato com a pele humana. Essa estratégia envolveu diferentes técnicas inovadoras de relevância humana baseadas em eventos-chave da via do efeito adverso da sensibilização dérmica (reatividade com proteínas, ativação de queratinócitos e/ou células dendríticas). O primeiro método implementado “*in house*” foi o teste denominado *direct peptide reactivity assay* (DPRA, OECD 442C/2015). No processo de implementação, um refinamento voltado na redução do volume final de reação do ensaio foi realizado e, desta forma, o custo e o uso de solventes orgânicos foram reduzidos consideravelmente. Essas modificações permitiram a “miniaturização da técnica”, denominada micro-DPRA (mDPRA), a qual apresentou desempenho similar ao DPRA convencional na identificação de substâncias alergênicas e produtos acabados como formulações de agrotóxicos contendo glifosato e surfactantes. Além disso, foi estabelecido um segundo refinamento que originou o desenvolvimento de outra técnica, o photo-mDPRA, capaz de identificar fotoalérgenos de contato, o que não era possível pela técnica disponível de fototoxicidade já validada (*3T3 neutral red uptake phototoxicity test* – OECD 432/2004). Da mesma forma que o mDPRA, o photo-mDPRA também apresentou aplicabilidade para substâncias puras e misturas baseadas em glifosato e surfactantes. Outro ponto desse trabalho foi o estabelecimento de uma plataforma multiparamétrica *in vitro* para avaliação da sensibilização dérmica de materiais cosméticos: ingredientes cosméticos e produtos naturais de tintura capilar contendo henna [*Lawsonia inermis* (Lythraceae)]. Além do mDPRA e photo-mDPRA, foram implementados outros sete diferentes ensaios inovadores. Entre eles, quatro apresentaram superioridade frente aos tradicionais modelos em roedores na identificação de ingredientes cosméticos com potencial alergênico: mDPRA, quantificação de interleucina (IL)-18 em queratinócitos humanos HaCaT, *U937 cell line activation test* (U-SENSTM, OECD 442E/2018) e *genomic allergen rapid detection* (GARDTM skin). O GARDTM skin obteve a melhor

capacidade preditiva em relação aos dados humanos (concordância = 100%), enquanto que mDPRA (concordância = 91,7%), quantificação de IL-18 em queratinócitos HaCaT e U-SENSTM (ambos com concordância = 92,3%) apresentaram predições similares. Expandindo a aplicabilidade dessa estratégia, ela foi utilizada para avaliar dez produtos naturais de tintura capilar contendo henna, vendidos em estabelecimentos comerciais localizados em Goiânia, GO, Brasil. Como primeiro passo, foram realizadas a análise de rótulo e a caracterização dessas misturas da “vida real” por cromatografia líquida de alta eficiência. Para isso, foram avaliadas quanto à presença do potente alérgeno de contato *p*-fenilenodiamina (*p*-phenylenediamine, PPD) e do biomarcador da henna, o lawsone. Contrastando com o que foi declarado nos rótulos pelos fabricantes, as análises cromatográficas evidenciaram que todos os produtos continham PPD e um deles não apresentou teores detectáveis de lawsone. Portanto, deparou-se com duas problemáticas: adulteração e falsificação de produtos henna. Além disso, a avaliação toxicológica utilizando a abordagem integrada de testes *in vitro* estabelecida nesse trabalho mostrou que, de forma geral, as hennas desencadearam alta reatividade peptídica, aumento dos níveis de IL-18 em queratinócitos HaCaT e de expressão de CD86 em células U937 no ensaio U-SENSTM, e induziram alterações nos 200 genes que compõem a assinatura preditiva do GARDTM skin. Desse modo, outra problemática foi encontrada nesses produtos testados: todas as hennas apresentaram potencial em promover dermatite de contato alérgica em humanos. Em paralelo, também foi verificado que os ingredientes de tintura capilar, incluindo o PPD, promoveram modulação de genes relacionados à resposta ao estresse oxidativo em queratinócitos humanos HaCaT, entre eles: *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (NRF2), *heme oxygenase 1* (HO1), e *Fos proto-oncogene* (FOS). Assim, ressaltam-se as consequências toxicológicas do uso não declarado de PPD em produtos naturais à base de henna, bem como os riscos associados, que podem envolver a sensibilização de consumidores suscetíveis e casos de dermatite de contato alérgica em indivíduos previamente sensibilizados. Ademais, esse trabalho vem contribuir na promoção da inovação e autonomia tecnológica do Brasil dentro da área da Toxicologia do Séc. XXI através do estabelecimento e desenvolvimento de abordagens *in vitro* de relevância humana para avaliação da sensibilização dérmica.

Palavras-chave: Dermatite alérgica de contato. Hipersensibilidade tardia. Rotas de resultados adversos. Técnicas *in vitro*. Toxicologia.

ABSTRACT

Development of a multiparametric platform to replace the use of laboratory animals for the assessment of the allergenic potential of "real-life" mixtures

Animal experimentation has been a great ally of man in the progress of Sciences. However, the predictive capacity of *in vivo* models to identify toxic chemicals to humans has been widely debated. The advance of the 21st Century scientific knowledge has promoted the search for predictive models that consider the human physiology as well as the pathophysiology of the physically and chemically induced-adverse reactions. In this context, the present study focused on the evaluation of dermal toxicity of ingredients of hair dyes and agrochemicals and their finished products, referred to herein as "real-life" mixtures (the real condition of which the consumer is exposed to). An integrated strategy of *in vitro* tests was developed to evaluate the potential of these materials to induce allergic reactions when in contact with human skin. This strategy involved different human-relevant innovative techniques based on key-events of the adverse outcome pathway of skin sensitization (protein reactivity, activation of keratinocytes and/or dendritic cells). The first method implemented *in house* was the direct peptide reactivity assay (DPRA, OECD 442C/2015). The refinement process conducted was able to reduce the final reaction volume of the test, yielding in considerable reduction of cost and use of organic solvents. These modifications allowed the "minituarization of the technique", called micro-DPRA (mDPRA), which showed a similar performance to conventional DPRA in the identification of allergenic substances and finished products as surfactants and glyphosate-containing formulations. A second refinement led to the development of the photo-mDPRA, a technique capable of identifying contact photoallergens, which was not possible by the already validated phototoxicity technique (3T3 neutral red uptake phototoxicity test - OECD 432/2004). Similar to mDPRA, photo-mDPRA showed applicability to pure substances and mixtures based on glyphosate and surfactants. This work also established an *in vitro* multiparametric platform to evaluate the skin sensitization of cosmetic materials: cosmetic ingredients and hair dye products containing henna [*Lawsonia inermis* (Lythraceae)]. In addition to mDPRA and photo-mDPRA, seven different innovative methods were implemented. Four of them showed superior capacity to identify cosmetic ingredients with allergenic potential as compared to the traditional rodent models, which are: mDPRA, measurement of interleukin (IL)-18 in human HaCaT keratinocytes, U937 cell line activation test (U-SENSTM, OECD 442E/2018) and genomic allergen rapid detection (GARDTM skin). GARDTM skin had the highest predictive capacity in relation to human data (concordance = 100%), while mDPRA (concordance = 91.7%), measurement of IL-18 in HaCaT keratinocytes and U-SENSTM (both with concordance = 92.3%) showed similar predictions. Expanding the applicability of this strategy, it was used to evaluate ten natural henna-containing hair dye products sold in commercial establishments located in Goiânia, GO, Brazil. The first step was

the label analysis followed by characterization and quantification of the potent contact allergen *p*-phenylenediamine (PPD) and the henna biomarker lawsone using high performance liquid chromatography. In contrast to what was stated in the labels by the manufacturers, the chromatographic analyses showed that all products contained PPD, and one of them did not present detectable contents of lawsone. Therefore, revealing the adulteration and falsification of henna products. Furthermore, toxicological evaluation using the integrated *in vitro* testing approach established in this study showed that hennas generally triggered high peptide reactivity, increased IL-18 levels in HaCaT keratinocytes and CD86 expression in U937 cells in U-SENSTM assay, and induced changes in the 200 genes from the GARDTM skin predictive signature. Additionally, all hennas had the potential to trigger allergic contact dermatitis in humans. In parallel, hair dye ingredients, including PPD, promoted modulation of genes related to the oxidative stress response in human HaCaT keratinocytes, including nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (*NRF2*), heme oxygenase 1 (*HO1*), and Fos proto-oncogene (*FOS*). Therefore, the toxicological consequences and the associated risks of undeclared use of PPD in natural henna products are highlighted, which include sensitization of susceptible consumers and cases of allergic contact dermatitis in previously sensitized individuals. In addition, this study contributes to promotion of innovation and technological autonomy of Brazil within the area of Toxicology for the 21st Century through the establishment and development of an *in vitro* human-relevant approaches for skin sensitization assessment.

Keywords: Dermatitis, allergic contact. Hypersensitivity, delayed. Adverse outcome pathways. *In vitro* techniques. Toxicology.

1 INTRODUÇÃO

A Toxicologia Experimental moderna busca se apropriar de todo arsenal científico disponível para gerar dados acerca de substâncias químicas utilizando principalmente métodos *in vitro* baseados nos componentes bioquímicos e celulares do organismo humano. Portanto, sem o sofrimento desnecessário de animais. No Brasil, os avanços na área ocorreram na última década com o surgimento de legislação específica, aceitação regulatória e implementação de métodos inovadores substitutivos à experimentação animal, treinamentos de recursos humanos e comunicação à comunidade científica.

Criado em decorrência dos horrores praticados durante a Segunda Guerra Mundial, o Código de Nuremberg instituiu critérios éticos para a experimentação humana (NUERNBER MILITARY TRIBUNALS, 1949). Segundo o Código, os estudos em animais devem anteceder os estudos em humanos e seus resultados justificar a necessidade ou excluir a experimentação clínica. Isto representou um marco legal para a utilização intensiva de animais em experimentação científica, tornando-se uma prática não pelo fato do modelo animal ser capaz de prever os efeitos em humanos, mas sim como uma barreira moral e ética à experimentação humana. Entretanto, essa prática tem sido amplamente questionada e muitos esforços têm sido direcionados para criar soluções que assegurem os princípios éticos da experimentação humana e também dos animais.

Nesse contexto, os ensinamentos contidos no livro “*The Principles of Humane Experimental Technique*” representaram um marco para a Toxicologia Experimental. Publicado em 1959 por Russel e Burch, esse livro propagou o “princípio dos 3Rs” (*reduction, refinement and replacement*): sempre que possível, reduzir, refinar e substituir a experimentação animal (RUSSELL e BURCH, 1959). A partir da publicação deste livro, diferentes instituições não governamentais, governamentais, científicas e de financiamento à pesquisa passaram a questionar o uso dos animais em pesquisa, com argumentos baseados principalmente em questões éticas. Entre elas, a ideia de que o sofrimento de uma espécie não humana não justifica o interesse de promover exclusivamente o bem-estar humano.

Por razões históricas, mercadológicas e publicitárias, a área de avaliação de eficácia e segurança de cosméticos é a mais avançada na busca de soluções para

substituição aos tradicionais modelos animais (LEIST *et al.*, 2012). O marco histórico para a quebra de paradigma ocorreu em 1980, quando ativistas dos direitos animais, entre eles Henry Spira, compraram um anúncio de página inteira no jornal *The New York Times* com a seguinte chamada: “*How many rabbits does Revlon blind for beauty’s sake?*” (Quantos coelhos a Revlon cega em nome da beleza?) (WILHELMUS, 2001). Esse fato desencadeou o entendimento das indústrias de cosméticos sobre a necessidade de progresso em suas práticas, e do impacto econômico negativo que teria com a continuidade da experimentação animal para a avaliação de produtos destinados à estética. A solução para o problema foi unânime entre diferentes indústrias de cosméticos: a concessão de milhões de dólares para instituições de pesquisas com foco no desenvolvimento de métodos inovadores livres de crueldade animal (WILHELMUS, 2001). Assim, no final de 1980, a Revlon forneceu um financiamento de \$750.000 para o *Rockefeller University’s Laboratory Animal Research Center*, Estados Unidos, para pesquisas voltadas ao desenvolvimento de métodos alternativos à experimentação animal. Em 1981, surgiu o *Johns Hopkins Center for Alternatives to Animal Testing* (CAAT), Estados Unidos, através de um acordo financeiro mútuo de \$1 milhão entre a Avon, Bristol-Myers e outras empresas do ramo (WILHELMUS, 2001).

A mudança de condutas mais expressivas na Toxicologia Experimental iniciou em 2007, com a publicação do livro “*Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and Strategy*”, elaborada pelo *National Research Council* (NRC), a pedido da *Environmental Protection Agency* dos Estados Unidos. Essa publicação trouxe novas perspectivas ao propor uma nova mudança de paradigmas no século atual: de uma visão arcaica de protocolos toxicológicos *in vivo* do século passado para um contexto *in vitro* baseado em testes mais eficientes no entendimento dos danos e riscos apresentados por produtos químicos (NRC, 2007). Assim, a Toxicologia do Séc. XXI se estabeleceu como um ramo dedicado à promoção de testes *in vitro* voltados à biologia humana e que avalie as vias celulares de toxicidade que resultam em efeitos adversos à saúde.

Um estudo, publicado em 2008, estimou que cerca de 14 bilhões de dólares sejam gastos anualmente com experimentação *in vivo* no mundo, demandando o uso de mais de 115 milhões de animais de laboratório (TAYLOR *et al.*, 2008). Em 2018, esses valores têm se mostrado estáveis (MEIGS *et al.*, 2018). Esses dados trazem para a maioria desconforto, embora muitos aceitam que a pesquisa com animais é

necessária nas grandes questões ambientais, econômicas e de saúde. No entanto, o fato de tantos animais serem usados parece contra-progressivo e cruel. Porém, não podemos fugir da realidade do uso de animais na pesquisa que beneficia os seres vivos e o ambiente.

Hoje, existe um amplo entendimento de que a experimentação animal tem sido um grande aliado do homem no progresso da Ciência, em especial para as Ciências da Vida (HARTUNG, 2017). Contudo, por razões distintas, os modelos de investigação baseados em animais têm sido amplamente criticados e alguns cientistas acreditam que esses protocolos, com o avanço da Ciência, não mais serão os modelos de escolha para diversos ensaios biológicos (LEIST e HARTUNG, 2013; HARTUNG, 2017). As razões pelas quais as investigações baseadas nos modelos animais não têm se sustentado são diversas, tais como: tempo e custo despendido na execução dos experimentos, busca do bem-estar animal, pressão da sociedade por modelos livres de crueldade, questões técnicas voltadas à baixa capacidade preditiva e reprodutibilidade dos estudos *in vivo*, e ao avanço técnico-científico obtido nas últimas décadas (STRICKLAND *et al.*, 2016). Dentre estes aspectos, destacam-se ainda as condições de exposição distintas daquelas da vida real e a diversidade da resposta humana (HARTUNG, 2017). De fato, “os seres humanos não são camundongos de 70 kg” (LEIST e HARTUNG, 2013). Portanto, o avanço do conhecimento científico tem que estar alinhado à busca de modelos com maior predição que considerem a fisiologia do organismo humano, bem como a fisiopatologia das reações adversas física e quimicamente induzidas (LEIST e HARTUNG, 2013).

Pesquisas sistemáticas têm questionado a precisão dos modelos animais. Dados da *Interagency Co-ordinating Center for the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM) mostram que os testes em camundongos e cobaias têm uma precisão de 72% em detectar alérgenos de contato quando comparados aos dados em humanos (ICCVAM, 1999). Essa predição não parece um valor razoável dado à relevância do parâmetro toxicológico de sensibilização dérmica. Ademais, estudos envolvendo coelhos mostraram que 40% das substâncias químicas testadas foram classificadas como irritantes dérmicos; entretanto, esses mesmos materiais se mostraram não irritantes quando avaliados em humanos (BASKETTER *et al.*, 2004). Ademais, questões de segurança e eficácia foram constatadas como as principais causas de falhas em estudos clínicos de fase II (73%) e III (69%) de novos

candidatos terapêuticos, no período 2013-2015 (HARRISON, 2016). Isso ilustra que os ensaios *in vivo*, muito utilizados na etapa pré-clínica de avaliação de novos fármacos, podem não detectar os efeitos tóxicos ou que a eficácia observada nos animais não é concordante àquela vista em testes em humanos. Como consequência, há perdas exorbitantes de gastos em pesquisa, desenvolvimento e inovação (P&DI) (HARRISON, 2016), reforçando a necessidade em “humanizar” os métodos de avaliação de segurança e/ou eficácia de materiais, dado ao fato de que os ensaios em animais falham.

Nesse sentido, estudos têm demonstrado que diferentes técnicas inovadoras *in vitro*, com enfoque na relevância humana, possuem superioridade frente aos modelos animais na identificação de sensibilizantes dérmicos (BAUCH *et al.*, 2012; STRICKLAND *et al.*, 2016). Essas novas tecnologias disponíveis para a investigação toxicológica têm apropriado de todo o avanço das Ciências, impulsionando o desenvolvimento de modelos substitutivos à experimentação animal (LEIST *et al.*, 2012). Esse progresso tecnológico se norteia pelos conhecimentos mais avançados da engenharia de tecidos, células-tronco, biotecnologia, biologia molecular, química analítica, tecnologias de DNA, entre outros (LEIST *et al.*, 2012; EZENDAM *et al.*, 2016).

Sob uma análise dos impactos econômicos e aspectos éticos de harmonização de condutas regulatórias, surgiu a necessidade em desenvolver e validar novas metodologias substitutivas às práticas *in vivo* (LEIST *et al.*, 2012). Nesse contexto, a Europa, Estados Unidos e Ásia criaram núcleos de estudos para o avanço na área (SPIELMANN *et al.*, 2008), conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Exemplos de núcleos de estudo para desenvolvimento e validação de metodologias inovadoras substitutivas ao uso de animais na Europa, Estados Unidos e Ásia.

Instituição	Localidade	Ano de criação
CAAT	Baltimore, Estados Unidos	1981
ZEBET	Berlim, Alemanha	1989
ECVAM	Ispra, Itália	1993
IIVS	Gaithersburg, Estados Unidos	1997
ICCVAM	Washington, Estados Unidos	1998
NC3Rs	Londres, Reino Unido	2004
JaCVAM	Tóquio, Japão	2005
KoCVAM	Heungdeok-gu, Coreia do Sul	2009
BraCVAM	Rio de Janeiro, Brasil	2013
CCAAM/CCVAM	Ontário, Canadá	2017

Abreviaturas: BraCVAM – *Brazilian Center for Validation of Alternative Methods*; CAAT – *Center for Alternatives to Animal Testing*; CCAAM/CCVAM – *Canadian Centre for Alternatives to Animal Methods/ Canadian Centre for the Validation of Alternative Methods*; ECVAM – *European Centre for the Validation of Alternative Methods*; IIVS – *Institute for In Vitro Sciences*; ICCVAM – *Interagency Co-ordinating Center for the Validation of Alternative Methods*; JaCVAM – *Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods*; KoCVAM – *Korean Centre for the Validation of Alternative Methods*; NC3Rs – *National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research*; ZEBET – *Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch*.

No Brasil, essas práticas inovadoras com enfoque na relevância humana começaram a ser impulsionadas principalmente a partir de 2008 em virtude da aprovação de uma lei que versa sobre o uso de animais na experimentação, pesquisa e ensino: a Lei nº 11.794/2008, também denominada de Lei Arouca (BRASIL, 2008). Essa lei trouxe dimensões mais abrangentes à experimentação animal e também incentivos aos métodos alternativos no Brasil. Entre elas, instituiu a criação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), diretamente ligado ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC), que, entre diversas competências, estabelece a manutenção de normas relativas ao uso humanitário de animais, realização do credenciamento de instituições que criam ou utilizam animais, e promoção de técnicas alternativas à experimentação *in vivo* em práticas de ensino e pesquisa.

Para a promoção de metodologias alternativas no Brasil, em 2012, a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) assinaram um acordo de cooperação técnica (BRASIL, 2012) com a finalidade de estruturar a criação do Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (*Brazilian Center for Validation of Alternative Methods*, BraCVAM). Assim, o BraCVAM foi concebido oficialmente em 2013, sob coordenação do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ) (INCQS,

2013). Também foi estabelecida a criação da Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA), através da Portaria nº 491, publicada em 2012 pelo então Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) (MCTIC, 2012).

O Brasil é um país signatário da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD). Sendo assim, o BraCVAM e a RENAMA exercem juntamente suas atividades norteadas pelos guias-teste dessa instituição, em particular, o Documento-guia nº 34 (OECD, 2005), que orienta sobre critérios de boas práticas em ensaios novos ou atualizados para avaliação de perigo. Assim, o processo de validação e aceitação regulatória e também a implementação de métodos alternativos ao uso de animais no Brasil é conduzido conjuntamente pelo BraCVAM, RENAMA e CONCEA. Um dos objetivos principais é superar as barreiras técnicas de exportação e agregar valor aos produtos brasileiros, tais como cosméticos, agrotóxicos e medicamentos.

Em 2014, o BraCVAM, RENAMA e 4 laboratórios associados, incluindo o Laboratório de Ensino e Pesquisa em Toxicologia *In Vitro* (Tox In) da Faculdade de Farmácia da UFG, iniciaram a primeira validação de um método alternativo no Brasil, o *Hen's egg test-chorion allantoic membrane* (HET-CAM) (LUEPKE e KEMPER, 1986). O objetivo é que o HET-CAM venha compor o arsenal de práticas inovadoras de avaliação de irritação ocular substitutivas ao teste de Draize (DRAIZE *et al.*, 1944). Criado em 1944, esse ensaio utiliza coelhos albinos e, apesar de ser um protocolo historicamente usado para finalidades regulatórias, nunca foi submetido à validação científica.

Também em 2014, o CONCEA reconheceu a aplicabilidade de técnicas alternativas à experimentação animal em atividades de pesquisa no Brasil (Resolução Normativa nº 17/2014) (MCTIC, 2014). Isso representou o marco inicial do processo de aceitação nacional de métodos inovadores que sejam validados pelo BraCVAM ou por centros internacionais, como a OECD. Por conseguinte, o CONCEA aprovou a Resolução Normativa nº 18/2014, estabelecendo o reconhecimento de técnicas inovadoras 3Rs recomendadas pela OECD na forma de guias-teste. Ao todo, foram reconhecidos 17 guias-teste agrupados em 07 desfechos toxicológicos, incluindo, por exemplo, a avaliação da sensibilização dérmica (MCTI, 2014b), que é o primeiro efeito adverso cuja via de toxicidade (*adverse outcome pathway*, AOP) foi elucidada na área de Toxicologia, em 2012 (OECD 168) (OECD, 2014). Ainda foi reconhecido o ensaio de linfonodo local usando camundongos (*local lymph node assay*, LLNA)

na abordagem técnica refinada, com uso de um número reduzido de animais e/ou sem uso de reagentes radioativos (guias-teste OECD 429, OECD 442A e OECD 442B).

Ainda no ano de 2014, a ANVISA reconheceu a aplicabilidade da Resolução Normativa nº 17/2014, conforme estabelecido na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 35/2015 (ANVISA, 2015a). Assim, a ANVISA também passou a aceitar métodos alternativos em substituição aos tradicionais testes em animais requeridos na legislação para aplicação regulatória (aprovação de matérias-primas e/ou produtos acabados para comercialização) (DANIEL *et al.*, 2018).

Em 2016, o CONCEA publicou a Resolução Normativa nº 31, que reconheceu mais 07 guias-teste, incluindo os primeiros ensaios *in vitro* formalmente validados para sensibilização dérmica: ensaio de reatividade direta de peptídeos (*direct peptide reactivity assay*, DPRA) (OECD 442C) e KeratinoSensTM (OECD 442D) (MCTIC, 2016). O CONCEA estabeleceu um prazo de 5 anos para substituição obrigatória dos métodos originais por aqueles alternativos estabelecidos nas Resoluções nº 18 e 31, ou seja, o prazo limite é a partir de 2019 e 2021, respectivamente. Cabe ainda enfatizar que a aceitação é baseada no desfecho toxicológico e não apenas em produtos, ou seja, esses ensaios deverão ser aplicados para cosméticos, medicamentos, agrotóxicos, produtos químicos industriais, dentre outros, sempre considerando o domínio de aplicação de cada técnica. Assim, um fabricante de um determinado produto, seja cosmético ou agrotóxico, deverá utilizar, por exemplo, os ensaios *in vitro* propostos nas Resoluções para avaliar o potencial de irritação ocular, e não mais o teste *in vivo* de Draize que até então era historicamente usado para tal finalidade. A utilização do modelo animal, neste caso o teste de Draize, passará a ser ilegal no Brasil.

O Brasil tem também conquistado o reconhecimento internacional no avanço em trabalhos voltados à educação e treinamento, desenvolvimento e/ou implementação de práticas substitutivas à experimentação *in vivo*. Desde 2014, instituições e jovens pesquisadores brasileiros têm sido reconhecidos por seus trabalhos em diferentes edições da maior premiação de métodos *in vitro* do mundo, *The Lush Prize* (<https://lushprize.org/>), criado em 2012 pela indústria britânica de cosméticos Lush e a organização inglesa não governamental *Ethical Consumer Research Association*.

No campo do ensino, o CONCEA aprovou a Resolução Normativa nº 38 em 2018 (MCTIC, 2018) que propõe, a partir de abril de 2019, restrições ao uso de animais em atividades de pesquisa científica e didáticas demonstrativas e observacionais que não desenvolvam habilidades psicomotoras. Assim, abordagens alternativas como recursos visuais e modelos computacionais são propostas em detrimento da demonstração em animais vivos.

Para a avaliação de toxicidade de ingredientes cosméticos e suas misturas da “vida real” (produtos acabados), a legislação regulatória nacional ainda é permissiva ao uso de modelos *in vivo*, apesar da disponibilidade e aceitação de métodos inovadores *in vitro* validados para avaliação de diferentes parâmetros mandatórios. Opondo-se à realidade brasileira, a União Europeia não permite que esses materiais sejam testados em animais e proíbe o comércio daqueles que passaram por testes *in vivo* desde 2009 e 2013, respectivamente (EUROPEAN UNION, 2009). A legislação é estrangeira, mas o impacto econômico é mundial, incluindo o Brasil, um país cuja exportação de matérias-primas exerce grande impacto na balança comercial.

Algumas iniciativas têm sido conduzidas no Brasil para banir tal tipo de experimentação em materiais cosméticos: entre as 27 unidades federativas, São Paulo se tornou a primeira a banir tais práticas, através da criação da Lei nº 15.316/2014 (ESTADO DE SÃO PAULO, 2014). Destaca-se, assim, a necessidade de criar métodos *in vitro* que venham a substituir o uso de animais de laboratório no principal pólo econômico do País. Essa iniciativa surgiu em virtude da invasão do centro de pesquisa Instituto Royal (São Roque, São Paulo), em outubro de 2013: ativistas alegaram que animais eram submetidos a maus tratos e realizaram a retirada de roedores e cachorros da raça Beagle que eram utilizados em testes pré-clínicos para a Indústria Farmacêutica. Um processo jurídico foi aberto para verificar as acusações feitas pelos ativistas. Contudo, as investigações mostraram que o Instituto Royal cumpria a legislação nacional vigente relacionada à experimentação animal (Lei Arouca), bem como outras normas aceitas internacionalmente. O saldo desse acontecimento foi diverso: alguns animais foram adotados, outros abandonados; o Instituto encerrou suas atividades, e o fato foi celebrado por legisladores; e, do outro lado, cientistas manifestaram preocupação com os prejuízos na Inovação Farmacêutica do País. Também, a percepção da população brasileira com as práticas *in vivo* foi influenciada por esse caso do Instituto Royal: uma pesquisa de opinião do Instituto de Pesquisas Datafolha, com 2.162 brasileiros em 134 cidades, revelou que

41% dos brasileiros jovens são contra pesquisas com animais, enquanto que 36% concordam plenamente e 18% concordam parcialmente (G1, 2014).

Seguindo o Estado de São Paulo, a cidade de Porto Alegre (Rio Grande do Sul, RS) e outros seis Estados brasileiros também proibiram os testes de cosméticos em animais (Tabela 2). No caso específico do Rio de Janeiro, tornou-se a primeira região do Brasil e das Américas a proibir tanto testes de materiais cosméticos (ingredientes e produtos acabados) como também as vendas de novos produtos testados em animais.

Tabela 2. Relação cronológica das localidades brasileiras onde os testes de cosméticos em animais são proibidos até o momento.

Localidade	Ano de proibição	Documento legal
São Paulo	2014	Lei nº 15.316/2014
Mato Grosso do Sul	2014	Lei nº 4.538/2014
Porto Alegre, Rio Grande do Sul	2015	Lei nº 11.955/2015
Paraná	2015	Lei nº 18.668/2015
Amazonas	2015	Lei nº 289/2015
Pará	2016	Lei nº 8.361/2016
Rio de Janeiro	2017	Lei nº 7.814/2017
Minas Gerais	2018	Lei nº 23.050/2018

Em Pernambuco, a Comissão de Meio Ambiente da Assembleia Legislativa aprovou, em agosto de 2018, o Projeto de Lei nº 1.823 com o mesmo objetivo de proibir os testes de cosméticos em animais (ESTADO DE PERNAMBUCO, 2018). Contudo, esse projeto ainda precisa ser aprovado no plenário da Assembleia para entrar em vigor. Um projeto de lei da câmara nacional (PLC nº 70/2014) encontra-se em tramitação visando trazer essa proibição para todos os Estados brasileiros. Até o momento, foi aprovado pela Comissão de Ciência, Tecnologia, Inovação, Comunicação e Informática (CCT) e Comissão do Meio Ambiente (CMA), e encontra-se em tramitação na Comissão de Assuntos Econômicos (CAE), desde final do ano de 2017 (SENADO FEDERAL, 2018).

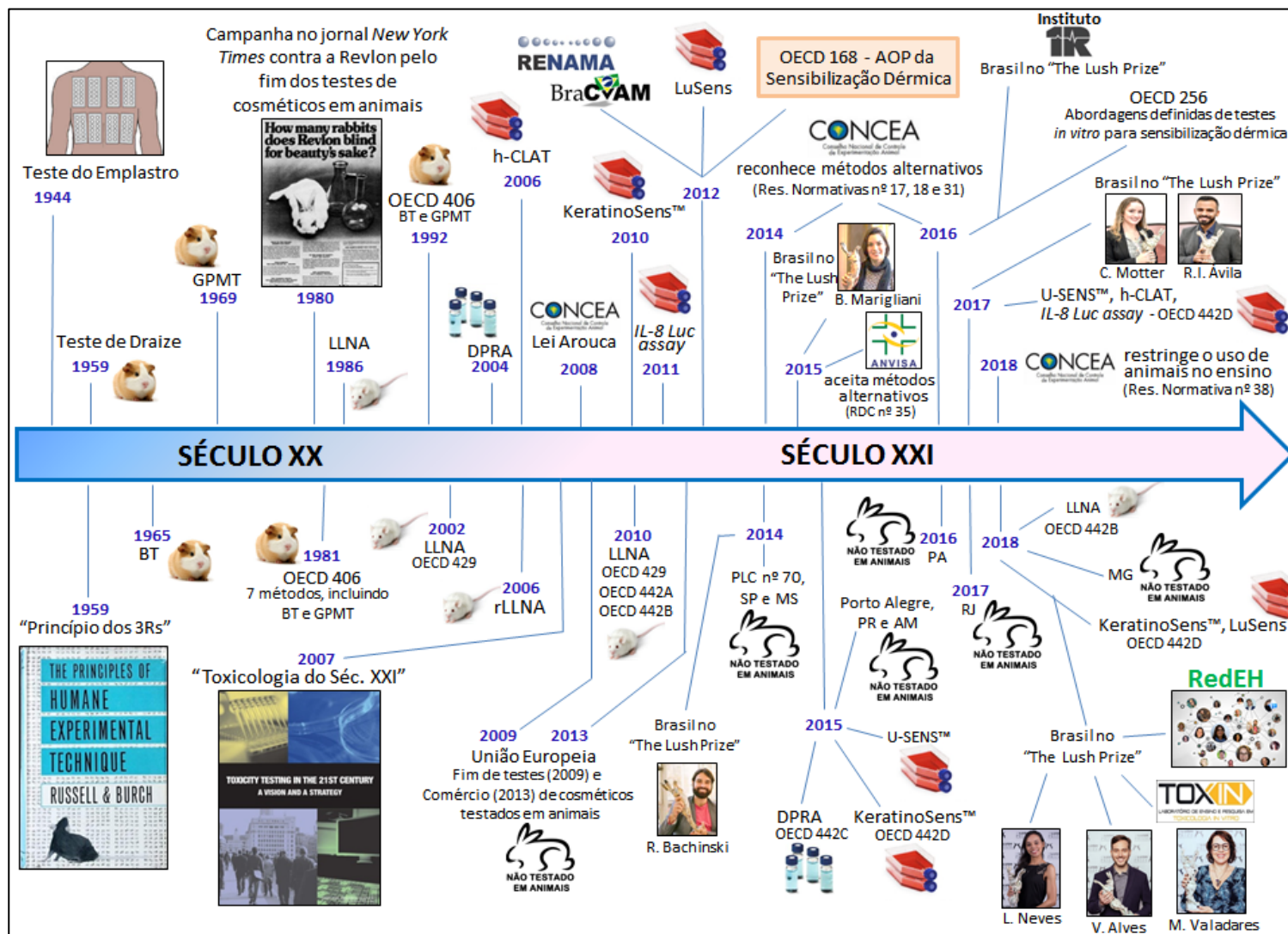
Enquanto a PLC nº 70/2014 não se torne oficialmente um ato legal, as conquistas obtidas no fim de testes de cosméticos em animais nos sete Estados brasileiros correm o risco de serem anuladas. Em agosto de 2018, a Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC) submeteu ao Supremo Tribunal Federal (STF) ações de inconstitucionalidade que

contestam as leis aprovadas nos Estados do Rio de Janeiro e Amazonas (SUPREMO TRIBUNAL FEDERAL, 2018). O entendimento da ABIHPEC é de que “essas medidas legislativas caracterizam ação inconstitucional, tendo em vista que o objeto em questão, de acordo com a Constituição Brasileira, só pode ser legislado no âmbito federal” (ESTADÃO, 2018). Existe uma grande preocupação do setor produtivo brasileiro de ter disponíveis ferramentas substitutivas ao modelo animal capazes de atender as leis regulatórias sem causar danos comerciais ao setor.

Desde 2016, discussões têm sido conduzidas no Brasil com a finalidade de regulamentar a avaliação e controle de substâncias químicas perigosas para a saúde e o meio ambiente (MINISTÉRIO DO TRABALHO, 2016). Estima-se que 10-15 mil substâncias químicas, principalmente as utilizadas em processos industriais, são colocadas no mercado brasileiro sem nenhum tipo de avaliação ou instrumento de controle para o gerenciamento dos riscos (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2018). Seguindo o modelo legislativo europeu, *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals* (REACH) (EUROPEAN UNION, 2006), o Brasil pretende conduzir a avaliação toxicológica desses produtos sem especificações de segurança, o que poderá impactar no uso de animais, tempo e custo.

Diante do exposto, observa-se o caminho da sociedade na promoção de abordagens que estabeleçam a segurança humana de produtos consumidos, especialmente cosméticos, de tal forma que não promova dor e sofrimento desnecessários aos animais. O campo da sensibilização dérmica, um parâmetro toxicológico mandatório para registro de um produto (seja cosmético, agrotóxico ou produtos com potencial de entrar em contato com a pele no ambiente de trabalho), tem atingido grande progresso em testes *in vitro*, observado principalmente após a publicação do seu AOP em 2012. Figura 1 mostra a cronologia dos principais fatos históricos na área de métodos alternativos, associado aos conhecimentos obtidos na Ciência, que têm alavancado esse expressivo desenvolvimento no “fazer *in vitro*” na área de sensibilização dérmica. Esses pontos serão discutidos em detalhes nos demais capítulos dessa Tese.

Figura 1. Cronologia de fatos importantes na área de métodos alternativos, em particular sensibilização dérmica, que têm contribuído com o desenvolvimento do “fazer *in vitro*” no mundo e no Brasil.



Abreviaturas: 3Rs – *refinement, reduction and replacement*; AM – Amazonas; ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária; AOP – *adverse outcome pathway*; BraCVAM – *Brazilian Center for Validation of Alternative Methods*; BT – *Buehler test*; CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal; DPRA – *direct peptide reactivity assay*; GPMT – *guinea pig maximization test*; h-CLAT – *human cell line activation test*; LLNA – *local lymph node assay*; MG – Minas Gerais; MS – Mato Grosso do Sul; OECD – *Organisation for Economic Co-operation and Development*; PA – Pará; PLC – projeto de lei complementar; PR – Paraná; POA – Porto Alegre (Rio Grande do Sul); RedEH – Rede Nacional de Educação Humanitária; rLLNA – *reduced LLNA*; RENAMA – Rede Nacional de Métodos Alternativos; RJ – Rio de Janeiro; SP – São Paulo; TOX IN – Laboratório de Ensino e Pesquisa de Toxicologia *In Vitro*; U-SENS™ – *U937 cell line activation test*.

Fonte: próprio autor.

Visando contribuir para o desenvolvimento técnico-científico do País, o foco do presente estudo foi a avaliação de toxicidade dérmica de substâncias químicas presentes em tinturas de cabelo e agrotóxicos ou produtos baseados nesses ingredientes. Assim, o objetivo central foi desenvolver uma estratégia integrada de testes *in vitro* de relevância humana para avaliar o potencial desses materiais em induzir reações alérgicas quando em contato com a pele.

Essa estratégia envolveu diferentes abordagens, onde o primeiro método implementado “*in house*” foi o guia-teste OECD 442C/2015 - DPRA. No processo de implementação, foi realizado um refinamento voltado na redução do volume final de reação do ensaio (aqui denominado micro-DPRA, mDPRA). Desta forma, obteve-se redução do custo e do uso de solventes orgânicos necessários para realização da técnica. Outro desdobramento desta implementação foi o desenvolvimento do photo-mDPRA, um ensaio baseado no mDPRA para identificação de substâncias que se tornam alergênicas quando expostas à luz solar, denominadas fotossensibilizantes dérmicas. Dessa forma, a prova de conceito foi demonstrar a aplicabilidade dos refinamentos realizados na técnica DPRA para ingredientes e produtos agrotóxicos.

Tem sido considerado que o uso de uma combinação de *ensaios in vitro* – e não uma técnica isolada – pode substituir os modelos animais dentro de uma abordagem integrada de testes e avaliação (*Integrated Approaches to Testing and Assessment*, IATA) (OECD, 2017b). Sendo assim, avaliamos a eficiência de 7 ensaios inovadores, com validação regulatória ou não, para medir diferentes eventos da AOP da sensibilização dérmica (Tabela 3). As técnicas consideradas de maior predição do potencial de sensibilização dérmica de ingredientes de tintura capilar foram consideradas aptas a compor uma estratégia integrada de testes *in vitro* para a avaliação de misturas. Como prova de conceito, essa estratégia desenvolvida foi utilizada para determinar o potencial alergênico de produtos naturais para coloração capilar do tipo henna, *Lawsonia inermis* (Lythraceae), contendo um ingrediente sintético altamente alergênico, a *p*-fenilenodiamina (*p*-phenylenediamine, PPD).

Além disso, o presente estudo também avaliou os possíveis efeitos mecânicos de ingredientes de tintura capilar, com potencial de causar sensibilização dérmica, na resposta ao estresse oxidativo. Assim, foi utilizada a linhagem humana HaCaT como modelo experimental de queratinócitos, uma vez que essas células são abundantemente encontradas na pele humana e possuem papel importante nos estágios iniciais da sensibilização dérmica (VAN DER VEEN *et al.*,

2013). Assim, a expressão dos seguintes genes humanos relacionados ao estresse oxidativo foram investigados em queratinócitos expostos a ingredientes de tintura capilar: *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (NRF2), *heme oxygenase 1* (HO1), e *Fos proto-oncogene* (FOS).

Tabela 3. Relação dos ensaios inovadores *in vitro* de relevância humana estudados no presente trabalho. Os ensaios em destaque representam aqueles com maior predição na identificação de ingredientes de tintura capilar com potencial de sensibilização dérmica, e considerados aptos a compor uma estratégia integrada de testes *in vitro* para avaliação de misturas da “vida real” (tinturas hennas).

Ensaio	Parâmetros avaliados
mDPRA	Depleção de peptídeos
Photo-mDPRA	Depleção de peptídeos
Citocinas em queratinócitos HaCaT	Níveis de IL-18
Expressão gênica em queratinócitos HaCaT	Expressão de NRF2, HO1 e FOS
U-SENSTM - OECD 447E/2018	Expressão de CD86
Níveis de citocinas em linhagem U937	Níveis intra e extracelulares de IL-8
PBMDCt	Expressão de CD86
GARDTM skin	Assinatura de predição de 200 genes

Abreviaturas: CD – cluster of differentiation; FOS - *Fos proto-oncogene*; GARDTM skin – *genomic allergen rapid detection*; HO1 - *heme oxygenase 1*; IL – interleucina; mDPRA – *micro-direct peptide reactivity assay*; NRF2 - *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*; OECD – *Organisation for Economic Co-operation and Development*; PBMDCt – *peripheral blood monocyte-derived dendritic cell test*; photo-mDPRA – *photo-micro-direct peptide reactivity assay*; U-SENSTM – *U937 cell line activation test*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CENÁRIO BRASILEIRO NA ÁREA DE MÉTODOS SUBSTITUTIVOS AOS MODELOS ANIMAIS PARA AVALIAÇÃO DE REAÇÕES ALÉRGICAS DE CONTATO

Os materiais de uso humano, tais como misturas “da vida real” (produtos acabados), substâncias químicas, pós, partículas, dispositivos médicos (lentes de contato, fios de sutura etc), precisam ter suas especificações de segurança estabelecidas, seja para uso do consumidor ou do trabalhador envolvido. Em vista disso, diferentes parâmetros toxicológicos para averiguar a segurança são mandatórios no Brasil. A finalidade é investigar, por exemplo, se determinados materiais, especialmente produtos cosméticos e de cuidados pessoais, agrotóxicos e medicamentos, têm o potencial de promover ou não reações alérgicas de contato (DANIEL *et al.*, 2018). Em todos os casos, a avaliação da sensibilização dérmica tem sido historicamente realizada através de ensaios *in vivo*. A partir de 2015, a ANVISA, com a aprovação da RDC nº 35 (ANVISA, 2015a), passou a considerar a aceitação dos ensaios *in vitro* dentro de uma abordagem IATA (OECD, 2017c; DANIEL *et al.*, 2018).

2.1.1 Testes de materiais cosméticos e de cuidados de higiene pessoal

O “Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos” (ANVISA, 2012), de caráter orientativo, objetiva sugerir critérios de avaliação de segurança, entre eles detectar o potencial de materiais em desencadear efeitos adversos na pele, tais como alergias e fotoalergias dérmicas. A identificação do dano de sensibilização dérmica (ou seja, classificação em sensibilizante dérmico ou não, sem fazer avaliação de potência) é suficiente para registro de um material cosmético. O guia se sustenta muito em modelos *in vivo*, porém faz uma ressalva que as empresas podem apresentar alternativas de avaliações de segurança como aquelas baseadas nos princípios dos 3Rs.

Para o parâmetro de sensibilização, a ANVISA recomenda ensaios em roedores (LLNA), cobaias (teste de maximização, *guinea pig maximization test*, GPMT; e teste de Buehler ou *Buehler test*, BT) e estudos clínicos em humanos (teste

de contato humano por insulto, *human repeat insult patch test*, HRIPT). Entretanto, a ANVISA não estabelece preferência por algum desses ensaios.

Apesar de estabelecer a avaliação de fotoalergenicidade como parâmetro mandatório, a ANVISA não fornece orientações claras sobre ensaios específicos, em vista da ausência de ensaios *in vitro* ou em animais validados, por exemplo. O que se estabelece de forma geral é que a avaliação de segurança para ocorrências de fotoalergias possa ser realizada por um alergologista em estudos clínicos.

Legislações específicas de alguns tipos de cosméticos, como para uso infantil (RDC nº 15) (ANVISA, 2015b) e repelentes de insetos (RCD nº 19) (ANVISA, 2013b), propõe que somente produtos não sensibilizantes sejam registrados e autorizados para venda. Essas RDCs também mantêm necessária a avaliação de fotossensibilização para produtos de proteção labial com FPS, inibição do hábito de roer unhas, proteção solar e repelente de insetos. Em todos esses casos, nenhuma metodologia é elencada nas legislações. Além disso, observa-se que, apesar das peculiaridades, repelentes de insetos são analisados nos mesmos critérios toxicológicos como os verificados para outros materiais cosméticos.

2.1.2 Testes de agrotóxicos e seus ingredientes

No Brasil, a legislação que rege sobre agrotóxicos e seus ingredientes é a “Lei dos Agrotóxicos” - Lei nº 7.802 de 1989 (BRASIL, 1989), regulamentada pelo Decreto nº 4.074 de 2002 (BRASIL, 2002), e também a Portaria nº 03 de 1992 (BRASIL, 1992). Esses atos legislativos determinam que a avaliação de sensibilização dérmica, bem como outros efeitos adversos cutâneos, sejam realizados para materiais agrotóxicos.

Cerca de 30 anos se passaram da sua criação, e várias foram as discussões acerca da importância da atualização da “Lei dos Agrotóxicos” e a adoção do Sistema Global Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos das Nações Unidas (*United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*, UN GHS) (UNITED NATIONS, 2017).

Essas novas atualizações estão sob análise na forma de consultas públicas para elaboração futura de uma nova lei. O ato de consulta pública nº 260 de 2016 propõe a obrigatoriedade da avaliação dos parâmetros de sensibilização dérmica para agrotóxicos e seus ingredientes ativos e inertes, recomendando o uso de métodos alternativos validados e a adoção da classificação do UN GHS (ANVISA, 2016)

(UNITED NATIONS, 2017). Esse sistema propõe que sensibilizantes sejam categorizados em “categoria 1” e, se os dados forem suficientes, a subcategorização em “1A” (pior cenário toxicológico, representando materiais altamente alergênicos) e “1B” (materiais de baixo a moderado potencial alergênico). Contudo, o ato público mencionado não descreve sobre essa subdivisão da categoria 1.

Legislações específicas, por exemplo, a RDC 34/2010 (ANVISA, 2010b) que versa sobre o registro de produtos saneantes desinfestantes com propriedades inseticidas, também reconhecem a necessidade e obrigatoriedade de estudos de sensibilização dérmica, mas também sem especificar quais métodos a serem usados. No caso de novos ingredientes de produtos com ação antimicrobiana para uso geral (RDC nº 14/2007) (ANVISA, 2007) e hospitalar (RDC 35/2010) (ANVISA, 2010a), os métodos de escolha ainda são ensaios em cobaias (GPMT e BT), mas as legislações pertinentes não eliminam o uso de métodos alternativos, quando aplicáveis.

2.1.3 Testes de medicamentos

Na área de produtos farmacêuticos, a ANVISA, através do “Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos” (ANVISA, 2013a), propõe a avaliação do potencial de sensibilização dérmica para materiais destinados a aplicação tópica ou para avaliação de tolerância da pele (materiais que entrarão em contato com a pele devido ao método de administração, ao contato acidental ou à exposição inevitável ao produto). Tal avaliação é realizada através de ensaios clínicos (HRIPT), em animais (LLNA, BT ou GPMT) ou também métodos alternativos, quando aplicados (DANIEL *et al.*, 2018). Também, a depender do produto, o Guia estabelece ensaios de fotocarcinogenicidade em camundongos (sem especificar metodologias específicas), o que talvez possa analisar, indiretamente, o parâmetro da fotossensibilização.

2.2 REAÇÕES ALÉRGICAS DE CONTATO NO CONTEXTO DA TOXICOLOGIA

O sistema imunológico humano é representado por um arcabouço complexo e integrado de células e moléculas de defesa que, quando desregulado, promove diferentes manifestações patológicas (YATIM e LAKKIS, 2015). Agentes

imunotóxicos, por exemplo, podem desencadear uma resposta imunológica exacerbada como a observada em reações alérgicas induzidas por sensibilizantes dérmicos (CORSINI e ROGGEN, 2009).

Esses agentes tóxicos são representados por substâncias químicas ou misturas que promovem uma resposta alérgica após exposição dérmica repetida (UNITED NATIONS, 2017). A dermatite de contato alérgica é a consequência clínica, tratando-se de um dos eventos mais comuns de imunotoxicidade em humanos (KIMBER *et al.*, 2002; BAUCH *et al.*, 2012; KIMBER *et al.*, 2012; OECD, 2014). Além disso, as substâncias químicas aplicadas na pele também podem ser nocivas à saúde após exposição à luz solar, promovendo fotodermatites, processos patológicos de hipersensibilidade tardia tipo IV, assim como a dermatite de contato alérgica (ONOUE *et al.*, 2017).

Para uso humano, a avaliação da fotossensibilização e sensibilização cutânea são requisitos obrigatórios para conduzir a análise de dano e risco de produtos manufaturados, bem como seus ingredientes, destinados à aplicação dérmica ou que acidentalmente possam entrar em contato com a pele (EZENDAM *et al.*, 2016; OEDA *et al.*, 2016; DE ÁVILA *et al.*, 2017; DANIEL *et al.*, 2018).

Nessa perspectiva, a Toxicologia do Séc. XXI procura estabelecer métodos de alta predição em detectar os possíveis danos induzidos por materiais alergênicos à pele humana através de ensaios *in vitro*, em detrimento aos convencionais ensaios *in vivo* (DESCOTES, 2004; CORSINI e ROGGEN, 2009). Assim, visa-se entender os mecanismos imunotóxicos induzidos por misturas da “vida real”, como cosméticos e agrotóxicos. O conhecimento de que um produto pode desencadear reações alérgicas quando em contato com a pele garantirá que seja classificado e rotulado adequadamente de tal modo que promova a saúde humana, seja do consumidor ou do trabalhador envolvido. Ou seja, um consumidor susceptível será alertado dos possíveis danos que determinado produto pode ocasionar à sua saúde e, no contexto ocupacional, o uso de medidas preventivas (equipamentos de proteção individual e coletiva) serão mandatórias em determinados ambientes de trabalho.

2.2.1 Sensibilização dérmica

Reações alérgicas de contato induzidas por substâncias químicas têm sido consideradas um problema crescente e bastante comum em Saúde Pública (KIMBER *et al.*, 2002). De fato, mais de 3.000 xenobióticos já foram identificados como

alérgenos de contato (NELSON e MOWAD, 2010). Esse número provavelmente deve ser maior, uma vez que novas moléculas são desenvolvidas anualmente pela indústria. Além disso, vários produtos químicos existentes no mercado foram identificados como mal avaliados do ponto de vista toxicológico (ČIHÁK, 2009), o que significa que informações acerca do potencial alergênico desses materiais possam ser desconhecidas.

De acordo com o UN GHS (UNITED NATIONS, 2017), os sensibilizantes dérmicos são substâncias químicas ou misturas que podem promover uma resposta alérgica após exposição dérmica repetida. Embora seja amplamente reconhecido no campo da Imunologia que substâncias sensibilizantes dérmicas possuem baixo peso molecular ($PM < 500$), esse requisito tem sido considerado um equívoco, uma vez que a capacidade de penetrar eficientemente a epiderme, como observado por pequenas moléculas, não é um parâmetro determinante para o processo de sensibilização da pele (ROBERTS *et al.*, 2013; FITZPATRICK *et al.*, 2017). Por outro lado, a capacidade do material em penetrar o estrato córneo e reagir com as proteínas cutâneas e a sua hidrofobicidade, por exemplo, têm se mostrado fatores cruciais (ROBERTS, SCHULTZ, *et al.*, 2016).

De fato, o alérgeno de contato deve se ligar covalentemente às proteínas da pele para formar complexos hapteno-proteína e, assim, se tornar imunogênico e apto a promover reações alérgicas (LANDSTEINER e JACOBS, 1935). Esse processo é garantido pelas características eletrofílicas de um sensibilizante dérmico, o que assegura sua reação com sítios nucleofílicos presentes nas proteínas dérmicas, tais como resíduos de lisina e cisteína (OECD, 2014).

Algumas substâncias químicas atuam indiretamente como sensibilizantes ao requererem algum nível de ativação, seja ela abiótica (ex.: auto-oxidação, reação com o ar e suor presente na pele) ou biótica (biotransformação). Aquelas que se tornam eletrofílicas via ativação abiótica são chamadas de pré-haptenos; e as que requerem metabolização pelo sistema enzimático celular da pele são classificadas como pró-haptenos (PATLEWICZ *et al.*, 2016). Muitos pré-haptenos também podem ser classificados como pró-haptenos (PATLEWICZ *et al.*, 2016), uma vez que podem se tornar ativos pelos dois mecanismos.

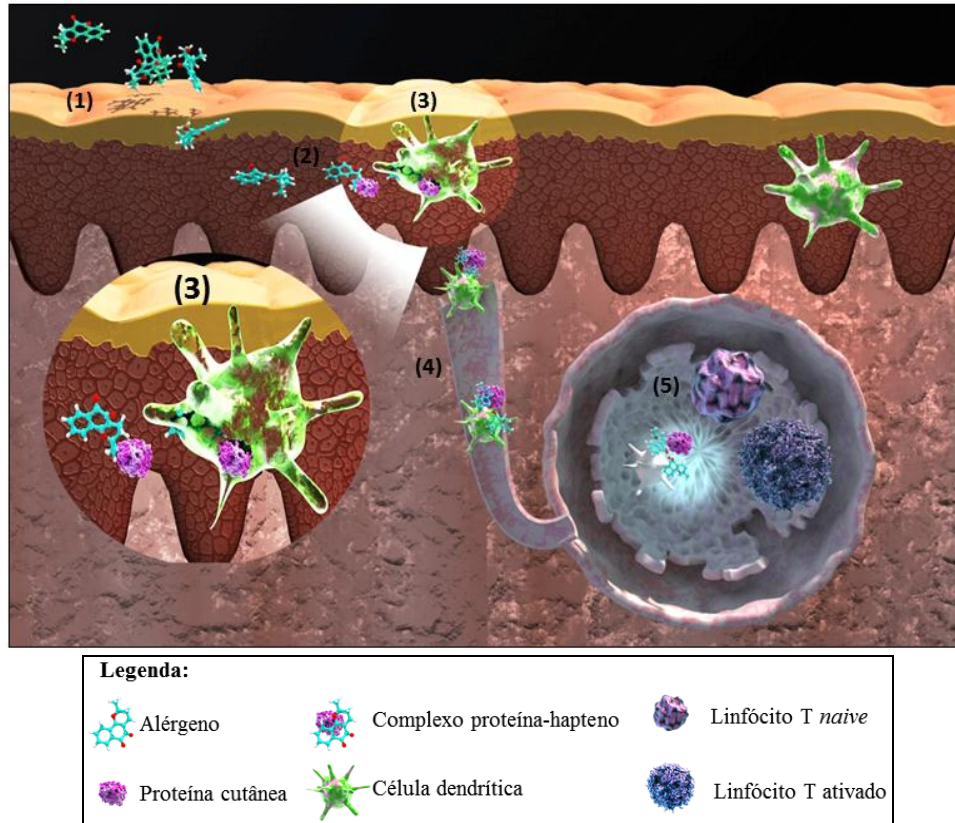
A manifestação clínica desencadeada por sensibilizantes dérmicos é a dermatite de contato alérgica, uma reação imunológica de hipersensibilidade tardia tipo IV mediada por linfócitos T (BAUCH *et al.*, 2012; KIMBER *et al.*, 2012;

OECD, 2014). Apesar de não haver dados epidemiológicos no Brasil, estudos têm demonstrado uma alta incidência de 27% de casos de alergias de contato na população geral da Europa (DIEPGEN *et al.*, 2016). Ademais, a dermatite de contato alérgica é responsável por mais de 90% das dermatoses ocupacionais (BELTRANI, 2003), sendo muito comum em trabalhadores na área de saúde, cabeleireiros e agricultores (NICHOLSON *et al.*, 2010). Diante disso, o impacto socioeconômico da dermatite de contato alérgica é significativo, uma vez que gera gastos com saúde, perda da capacidade produtiva do indivíduo e redução de sua qualidade de vida (NICHOLSON *et al.*, 2010; HOLNESS, 2011; LAU *et al.*, 2011).

A sensibilização dérmica é descrita em duas fases clínicas: (1) indução do processo de sensibilização e a (2) subsequente elicitação da resposta imunológica após exposição dérmica repetida com o mesmo alérgeno ou outro que apresente reatividade cruzada com o mesmo (KIMBER *et al.*, 2002; ROBERTS, API e APTULA, 2016).

A fase de indução corresponde inicialmente à penetração do alérgeno na pele, onde pode haver seu processamento por queratinócitos, aumentando ou diminuindo seu potencial alergênico via processos de metabolização enzimática. O alérgeno e/ou intermediários reativos reagem com as proteínas cutâneas, processo esse denominado de haptenação. Os complexos proteína-alérgeno são então processados por células apresentadoras de antígenos como células dendríticas epidermais e dérmicas, seja de forma direta ou via queratinócitos ativados. Como consequência, diferentes respostas bioquímicas acontecem. Nos queratinócitos, ocorre a ativação de respostas inflamatórias via produção intracelular de interleucina (IL)-18 e aumento da expressão de genes citoprotetores via fator de transcrição Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*). Já nas células dendríticas, ocorre o processo de amadurecimento celular: aumento da expressão de marcadores de superfície de membrana específicos (ex.: CD86, CD54) e secreção de citocinas (ex.: IL-8, IL1 β , IL-12p70). Uma vez ativadas, as células dendríticas migram para os nódulos linfáticos locais, apresentando as partículas alergênicas aos linfócitos T *naïves* via complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex*, MHC). Esse evento induz a diferenciação e proliferação das células T de memória específicas ao alérgeno, algumas das quais recirculam por todo o corpo (OECD, 2014) (Figura 2).

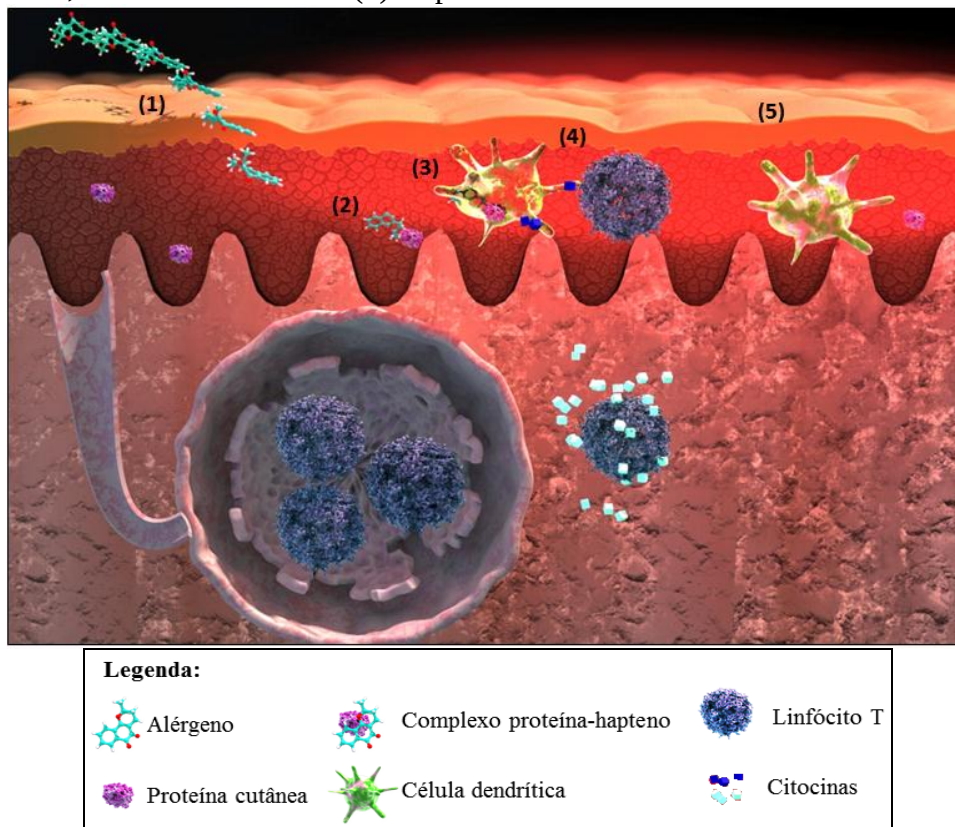
Figura 2. Representação da fase de indução do processo de sensibilização dérmica: (1) introdução do alérgeno na epiderme e (2) reação com as proteínas dérmicas (formação do complexo proteína-antígeno); (3) ativação de células dendríticas; (4) migração de células dendríticas ativadas para o linfonodo local; (5) ativação linfocitária e expansão clonal de células T ativadas específicas ao alérgeno de contato.



Fonte: próprio autor.

A fase de elicitação ocorre após contato repetido com o mesmo alérgeno. Assim, seguiu-se novamente a formação do complexo proteína-alérgeno e seu processamento pelas células apresentadoras de antígeno, as quais o apresentarão aos linfócitos T de memória circulantes. A consequência bioquímica disso é a secreção de citocinas como $INF\gamma$, IL-1, IL-6, IL-8 e $TNF\alpha$, as quais induzem a liberação de componentes moleculares e celulares inflamatórios e mobilização de células T citotóxicas presentes na circulação sanguínea. Na epiderme, há então indução de uma resposta inflamatória local caracterizada por reações como prurido, edema, erupções vermelhas e bolhas cutâneas (OECD, 2014) (Figura 3). Dependendo da susceptibilidade do indivíduo, o comprometimento pode culminar em efeitos sistêmicos. Figura 4 exemplifica tais sinais clínicos, observados após uma reação severa de dermatite de contato alérgica com comprometimento sistêmico, a qual foi desencadeada pelo uso de uma tintura de cabelo.

Figura 3. Representação da fase de elicitação do processo de sensibilização dérmica: (1) contato repetido com alérgeno, (2) formação do complexo proteína-hapteno (3) e seu processamento pelas células dendríticas, (4) as quais o apresentarão aos linfócitos T de memória circulantes. A consequência bioquímica disso é a secreção de citocinas, as quais induzem a liberação de componentes moleculares e celulares inflamatórios e mobilização de células T citotóxicas presentes na circulação sanguínea, culminando em uma (5) resposta inflamatória local.



Fonte: próprio autor.

Figura 4. Exemplo de uma resposta inflamatória desencadeada pelo uso de uma tintura de cabelo: a jovem C. R., antes e durante internação hospitalar de três dias após uma reação súbita e grave de sensibilização dérmica.



Fonte: <http://www.dailymail.co.uk/health/article-2109186/Carmen-Rowe-hair-dye-Pictures-swollen-face-woman-25-allergic-reaction.html>

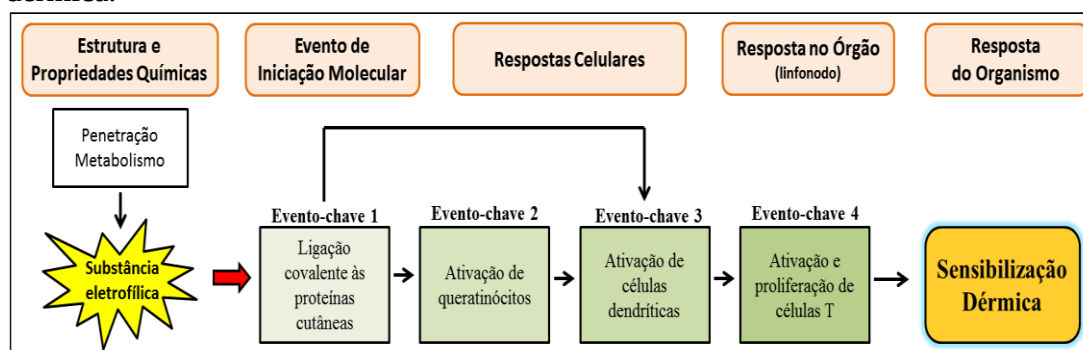
Essa compreensão mecanicista do processo de sensibilização dérmica, publicada em 2012, representa a primeira AOP de um evento nocivo até então elucidado em Toxicologia (OECD, 2014). De forma sucinta, a sensibilização dérmica

foi, portanto, decodificada nos seguintes eventos-chave baseados na fase de elicitação (OECD, 2014) (Figura 5):

- **Evento-chave 1 ou evento de iniciação molecular** - Ligação covalente irreversível do alérgeno (ou seus intermediários reativos transformados por conversão abiótica ou metabólica) às porções nucleofílicas localizadas em proteínas dérmicas, que culmina com a formação do complexo hapteno-proteína;
- **Evento-chave 2** - Inflamação epidermal através da sinalização de queratinócitos;
- **Evento-chave 3** - Ativação de células dendríticas;
- **Evento-chave 4** – Ativação e proliferação de linfócitos T.

Vale ressaltar que esses eventos-chaves representam as respostas fundamentais que determinarão o estabelecimento das dermatites de contato, o que não descarta a ocorrência de outros processos bioquímicos e/ou celulares na sensibilização dérmica (OECD, 2014).

Figura 5. Via do efeito adverso (*adverse outcome pathway, AOP*) da sensibilização dérmica.



Fonte: próprio autor.

2.2.2 Fotossensibilização dérmica

Na prática clínica, fotossensibilidade é reconhecida como dermatite de contato induzida por luz, principalmente pela ação da radiação UVA (320-400 nm) (TOKURA, 2000; 2009). Entre essas reações, a fotoalergia e a fototoxicidade têm sido consideradas mais relevantes, sendo reações desencadeadas por fotossensibilizantes tópicos ou sistêmicos, respectivamente (TOKURA, 2009; ONOUE *et al.*, 2017).

As principais diferenças entre essas condições clínicas são destacadas na Tabela 4, conforme ONOUE *et al.* (2017). Como exemplo, esses dois eventos possuem diferentes mecanismos fisiopatológicos. Assim como na dermatite de

contato alérgica, a fotoalergia é uma resposta imunológica de hipersensibilidade tardia tipo IV (KERR e FERGUSON, 2010). Já a fototoxicidade possui mecanismos irritativos sobre a pele, os quais podem envolver processos inflamatórios imediatos e diretos em virtude da foto-oxidação de lipídios e proteínas de membrana celular (GIROTTI, 2001). Também, as doses do material e da irradiação necessárias para desencadear reações fototóxicas são geralmente críticas no desenvolvimento de fotoirritação; enquanto que baixas doses de material são suficientes para ocasionar um dano alérgico de contato nas fotoalergias (ONOUÉ *et al.*, 2017).

Tabela 4. Principais características das reações dérmicas fotoalérgicas e fototóxicas de acordo com ONOUÉ *et al.* (2017).

Característica	Reações fotoalérgicas	Reações fototóxicas
Incidência relativa	Baixa ^a	Alta
Reação após primeira exposição	Ausente	Presente
Dose do material	Baixa	Alta
Dependência da dose do material e irradiação	Não é determinante	Importante
Aparência clínica	Dermatite espongíotica	Edema, queimadura solar intensa
Tendência a se espalhar	Sim	Não
Patofisiologia	Hipersensibilidade tardia tipo IV	Dano tecidual direto
Alteração pigmentar	Não	Pode ocorrer
Reação cruzada com outros materiais	Pode ocorrer	Não

^a Apesar do autor destacar que é de baixa incidência, a literatura mostra que o equívoco é devido ao diagnóstico difícil da fotoalergenicidade (TOKURA, 2009).

Além disso, substâncias fotossensíveis ativadas pela luz podem expor grupamentos haptênicos que são fundamentais para ativar uma resposta alérgica dérmica. Duas hipóteses têm sido discutidas para compreender o processo de formação de fotoalérgenos (HINO *et al.*, 2008; TOKURA, 2009):

- **Hipótese 1** – fotossensibilizantes são considerados pró-haptenos, sendo ativados à condição de haptenos pela irradiação UVA e, assim, apresentar potencial para induzir fotoalergias, quando em contato com a pele.

- **Hipótese 2** – após penetrar a pele, fotossensibilizantes são fotohaptenos ao serem expostos à irradiação UVA. Isso resultará na ligação covalente às proteínas cutâneas via formação de radicais livres como espécies reativas de oxigênio (EROs). Portanto, materiais pré-irradiados antes de se tornarem biodisponíveis na pele não terão capacidade de se ligar a proteínas da pele.

A segunda hipótese tem apresentado maior peso de evidência em virtude da experiência clínica com os ensaios do fotoemplastro, os quais avaliam as propriedades fotohaptênicas de substâncias químicas (TOKURA, 2009).

A fotoalergia de contato dérmica, uma vez considerada uma reação de hipersensibilidade do tipo IV como a dermatite de contato alérgica (KERR e FERGUSON, 2010), também parece ser desenvolvida por duas fases (indução e elicitação das respostas imunológicas) (ONOUÉ *et al.*, 2017). Embora se suponha que a fotossensibilização compartilhe os mesmos eventos-chave da AOP da sensibilização dérmica (Figura 5) e que a superprodução de EROs induzidas por materiais expostos à luz pareça ter um papel crucial, a AOP para fotoalergia ainda é desconhecida (TOKURA, 2009; OEDA *et al.*, 2016).

2.3 AVALIAÇÃO DAS REAÇÕES ALÉRGICAS DE CONTATO

Devido à importância na Saúde Pública, a avaliação da fotossensibilização/sensibilização cutânea é essencial para conduzir a análise de dano e risco de materiais para uso dérmico (ex.: cosméticos) ou que acidentalmente possam entrar em contato com a pele (ex.: agrotóxicos) (EZENDAM *et al.*, 2016; OEDA *et al.*, 2016; DE ÁVILA *et al.*, 2017; ONOUÉ *et al.*, 2017; DANIEL *et al.*, 2018). Portanto, a classificação e rotulagem de materiais de consumo devem ser realizadas para reduzir o risco de exposição daqueles identificados como perigosos ou dar sinais de alerta nos cuidados necessários ao manuseio de um determinado material, garantindo a saúde e segurança humana.

Para esse propósito, testes de contato em humanos, conhecidos como testes do foto-emplastro/emplastro (*photo-patch/ patch tests*), têm sido desenvolvidos e utilizados. Contudo, restrições éticas permeiam o uso desses testes, uma vez que não são opções, por exemplo, para novos produtos que não tenham sido avaliados em estudos pré-clínicos (*in vitro* e/ou em animais) (BRUYNZEEL *et al.*, 2004; KERR e FERGUSON, 2010; ROBERTS, API, PATLEWICZ, *et al.*, 2016). Em vista disso, a avaliação da sensibilização da pele tem sido historicamente realizada usando

modelos animais, entre eles: LLNA (KIMBER *et al.*, 1986), e GPMT (MAGNUSSON e KLIGMAN, 1969) e BT (BUEHLER, 1965) envolvendo camundongos e cobaias, respectivamente. Nenhuma metodologia tem sido acordada ou adotada por órgãos regulatórios para prever fotoalérgenos, entretanto alguns modelos *in vivo* também têm sido utilizados, como o foto-LLNA (MARTÍNEZ *et al.*, 2013).

Embora muitos utilizados, esses modelos *in vivo* não refletem as respostas alérgicas dérmicas em humanos (OECD, 2018c). De fato, a literatura destaca discordâncias entre os resultados dos modelos LLNA com aqueles obtidos em cobaias e humanos (ROBERTS, API, PATLEWICZ, *et al.*, 2016). Verificou-se também baixa concordância entre as categorias de potência de alergia de contato por meio da análise de múltiplos dados de LLNA para uma mesma substância (HOFFMANN *et al.*, 2018; KLEINSTREUER *et al.*, 2018). Ademais, várias questões econômicas, políticas, éticas e científicas, têm tornado esses modelos animais insustentáveis, especialmente para testes em cosméticos (BAUCH *et al.*, 2011; STRICKLAND *et al.*, 2016).

Em vista disso, grandes esforços têm sido conduzidos no campo da Toxicologia do Séc. XXI para fornecer abordagens de testes não animais e que apresentem relevância humana. A compreensão bioquímica e celular do processo de sensibilização dérmica, decodificada em AOP (OECD, 2014), tem promovido o desenvolvimento de métodos mecanicistas *in vitro* (*in chemico* e *in cell*). Estas abordagens de testes *in vitro* são baseadas nos eventos-chave da AOP da sensibilização dérmica (OECD, 2014) e têm demonstrado superioridade preditiva frente os tradicionais testes em animais (LLNA, GPMT e BT) (STRICKLAND *et al.*, 2016; KLEINSTREUER *et al.*, 2018).

2.3.1 Ensaio em humanos

Informações relevantes sobre o potencial alergênico de materiais em humanos têm sido obtidas através do teste do emplastro (*patch tests*) em diferentes estudos como relatos de casos, estudos epidemiológicos, vigilância e relatórios médicos (ECHA, 2017).

O teste do emplastro, proposto pela primeira vez por SCHWARTZ e PECK (1944), consiste em uma única etapa de indução e desafio do material-teste em voluntários saudáveis. Posteriormente, foi denominado como teste incompleto de

Schwartz-Peck, uma vez que não inclui um período de uso do material testado (HAYES *et al.*, 2014). Sua metodologia modificada, a técnica Traub-Tusing-Spoon ou teste de Schwartz-Peck completo (TRAUB *et al.*, 1954), incorpora um único emplastro de indução, período de uso e teste do emplastro de desafio único (HAYES *et al.*, 2014). Outras abordagens de teste foram propostas posteriormente, como mostrado na Tabela 5. As técnicas de Draize (DRAIZE, 1959a) e Shelanski-Shelanski (SHELANSKI e SHELANSKI, 1953) foram as primeiras a serem conhecidas como HRIPT (KLIGMAN, 1966).

Tabela 5. Abordagens propostas para realizar o teste do emplastro em humanos para identificação de sensibilizantes dérmicos.

Método	Referência
Teste de Schwartz-Peck	SCHWARTZ e PECK (1944)
Teste Brunner-Smiljanic	BRUNNER e SMILJANIC (1952)
Teste de Shelanski-Shelanski ^a	SHELANSKI e SHELANSKI (1953)
Método de Traub-Tusing-Spoor ^b	TRAUB <i>et al.</i> (1954)
Teste de Draize ^a	DRAIZE (1959b)
Teste de maximização	KLIGMAN (1966)
Teste de Voss-Griffith ^a	VOSS (1958), GRIFFITH (1969)
Teste de Marzulli-Maibach ^a	MARZULLI e MAIBACH (1973); 1974)
Teste modificado de maximização	KLIGMAN e EPSTEIN (1975)
Teste modificado de Draize ^a	JORDAN e KING (1977)

^aDenominado como teste de contato humano por insulto (*human repeat insult patch test*, HRIPT).

^bTambém referido como teste completo de Schwartz-Peck.

Esses ensaios clínicos permitem determinar um parâmetro importante na avaliação de risco: o nível de indução de sensibilização não esperado (*no expected sensitization induction level*, NESIL), representado por uma concentração limiar (em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) do material-teste que não promove a sensibilização da pele (API *et al.*, 2008).

Contudo, são abordagens onerosas, demandam um longo período de avaliação e recrutam um número variável de voluntários saudáveis ($n = 25$ para teste de maximização e $n = 100-200$ para os outros métodos). Ademais, vale a pena mencionar que os ensaios humanos não fornecem classificação de potência dos materiais identificados como sensibilizantes, que é realizada apenas durante a avaliação pré-clínica (ou seja, utilizando estudos *in vitro* e/ou *in vivo*). Do ponto de vista técnico-científico, desvantagens sobre os testes de contato existem como a impossibilidade de prever reações adversas em uma grande população-alvo: os

estudos são conduzidos sob esquemas de exposição diferentes dos que acontecem a nível ocupacional ou uso do material pelo consumidor (BASKETTER, 2009).

Considerações éticas também têm sido enfatizadas, uma vez que o teste do emplastro pode provocar uma doença clínica no indivíduo (SCCNFP, 2000). Como comentado anteriormente, testes em humanos não podem ser realizados para novas moléculas, por exemplo, sem passar por uma avaliação pré-clínica: se o material-teste for identificado como potencialmente sensibilizante em testes *in vitro/in vivo*, a condução do teste do emplastro é recomendada apenas em casos específicos (ex.: medicamento de uso tópico). Resultados envolvendo humanos obtidos de informações históricas ou estudos clínicos e epidemiológicos, por exemplo, podem ser usados para finalidades regulatórias como aqueles propostos pela Regulação Europeia de classificação, rotulagem e embalagem (*European regulation on classification, labeling and packaging*, CLP); no entanto, os testes em seres humanos não devem ser realizados para essas finalidades (ECHA, 2017).

Diferentes metodologias não padronizadas também foram propostas para o teste de fotoemplastro (*photopatch test*) (KERR e FERGUSON, 2010). No entanto, a Sociedade Europeia de Dermatite de Contato e a Sociedade Europeia de Fotodermatologia recomendam, como a metodologia mais adequada, a aplicação do material-teste por 24 ou 48 h na parte média superior das costas seguida pela irradiação UVA (5 J/cm²) e posterior avaliação da pele em 24-72 h (BRUYNZEEL *et al.*, 2004).

2.3.2 Ensaio em roedores

Diferentes modelos usando camundongos ou cobaias foram desenvolvidos e têm sido historicamente empregados para identificar alérgenos de contato (Tabelas 6 e 7). Entretanto, poucas modificações foram realizadas para adaptar esses modelos para prever fotoalérgenos (KAIDBEY e KLIGMAN, 1980; SATO *et al.*, 1980; GERBERICK e RYAN, 1990; SCHOLEY *et al.*, 1991; HOMEY *et al.*, 1998; ULRICH *et al.*, 1998; NEUMANN *et al.*, 2005; SCHÜMANN *et al.*, 2014; ÁVILA *et al.*, 2017). Aqui o LLNA, o GPMT e o BT são detalhados devido à experiência adquirida para fins regulatórios e científicos, além de terem sido considerados métodos de teste padrão em animais para avaliação do risco de sensibilização da pele.

Tabela 6. Modelos usando camundongos para avaliação do potencial de materiais em desencadear reações alérgicas e fotoalérgicas na pele.

Método	Referência
Fotoalergenicidade	
<i>Photomaximization test</i>	KAIDBEY e KLIGMAN (1980)
<i>Mouse ear-swelling model</i>	GERBERICK e RYAN (1990)
<i>Photo- Local lymph node assay (LLNA)</i>	SCHOLES <i>et al.</i> (1991)
<i>Photo-LLNA + cytokine analysis</i>	ULRICH <i>et al.</i> (1998)
<i>UVA dependent integrated model for the differentiation of skin reactions (IMDS)</i>	NEUMANN <i>et al.</i> (2005)
<i>Photo-LLNA:BrdU-ELISA</i>	ÁVILA <i>et al.</i> (2017)
Sensibilização dérmica	
<i>Popliteal lymph node assay (PLNA)</i>	GLEICHMANN (1981)
<i>Vitamin A acetate-fed mice assay</i>	MILLER (1986)
<i>Mouse ear swelling test (MEST)</i>	GAD <i>et al.</i> (1986)
<i>LLNA</i>	KIMBER <i>et al.</i> (1986)
<i>Mouse ear sensitization assay</i>	DESCOTES (1988)
<i>LLNA in situ</i>	KIMBER <i>et al.</i> (1989)
<i>Mouse ear swelling assay (MESA)</i>	THORNE <i>et al.</i> (1991)
<i>Sensitive mouse lymph node assay (SLNA)</i>	IKARASHI <i>et al.</i> (1993)
<i>LLNA- lymph node cell phenotyping</i>	DE SILVA <i>et al.</i> (1993), SIKORSKI <i>et al.</i> (1996), GERBERICK <i>et al.</i> (2002)
<i>IMDS</i>	HOMEY <i>et al.</i> (1998)
<i>Reduced LLNA (rLLNA)</i>	KIMBER <i>et al.</i> (2006)
<i>OECD 429 – LLNA^a</i>	OECD (2010a) ^b
<i>OECD 442A – LLNA:DA^a</i>	OECD (2010b)
<i>OECD 442B – LLNA: BrdU-ELISA^a</i>	OECD (2010c)
<i>LLNA: BrdU-flow cytometry method (FCM)/ immunohistochemistry</i>	JUNG <i>et al.</i> (2010)
<i>Ex vivo LLNA: BrdU-ELISA + cytokine analysis</i>	ULKER <i>et al.</i> (2011)
<i>Modified IMDS</i>	SCHÜMANN <i>et al.</i> (2014)
<i>LLNA:DA plus elicitation phase (LLNA:DAE)</i>	YAMASHITA <i>et al.</i> (2014); 2015)
<i>Two-stage LLNA:DA</i>	ZHANG <i>et al.</i> (2017)
<i>LLNA – multi-endpoint evaluation</i>	TSUCHIYAMA <i>et al.</i> (2017)
<i>OECD 442B – LLNA: BrdU-ELISA/FCM^a</i>	OECD (2018a)

^aDiretrizes formalmente validadas.

^bPrimeira versão adotada em 2002.

Tabela 7. Modelos usando cobaias para avaliação do potencial de materiais em desencadear reações alérgicas e fotoalérgicas na pele.

Método^a	Referência
Fotoalergenicidade	
<i>Adjuvant-strip photosensitization method</i>	SATO <i>et al.</i> (1980)
Sensibilização dérmica	
<i>Draize test</i>	DRAIZE (1959b)
<i>Buehler test (BT)</i>	BUEHLER (1965)
<i>Ear flank test</i>	STEVENS (1967)
<i>Guinea pig maximization test (GPMT)</i>	MAGNUSSON e KLIGMAN (1969)
<i>Split adjuvant technique</i>	MAGUIRE e CHASE (1972)
<i>Non-occlusive topical test using DMSO</i>	MAGUIRE (1974)
<i>Optimization test</i>	MAURER <i>et al.</i> (1975)
<i>Single injection adjuvant test (SIAT)</i>	CONNOR <i>et al.</i> (1975)
<i>Freund's complete adjuvant test</i>	KLECAK <i>et al.</i> (1977)
<i>Open epicutaneous test</i>	KLECAK <i>et al.</i> (1977)
<i>TINA test</i>	ZIEGLER (1977)
<i>Modified Draize test</i>	SHARP (1978)
<i>Modified GPMT</i>	SATO <i>et al.</i> (1981)
<i>Single injection adjuvant test</i>	GOODWIN <i>et al.</i> (1981)
<i>Cumulative contact enhancement test</i>	TSUCHIYA <i>et al.</i> (1985)
<i>Cyclophosphamide-GPMT</i>	MARZULLI e MAGUIRE (1982)
<i>Altered Draize test</i>	MARZULLI e MAGUIRE (1982)
<i>Non-occlusive/DMSO topical test</i>	MARZULLI e MAGUIRE (1982)
<i>Epicutaneous maximization test</i>	GUILLOT <i>et al.</i> (1983)
<i>Guinea pig allergy test</i>	DOUSSOU <i>et al.</i> (1985)
<i>OECD 406 – GPMT e BT</i>	OECD (1992) ^b

^aEnsaios em cobaias nunca foram validados.

^bPrimeira versão adotada em 1981.

A diretriz original do LLNA, OECD 429, foi adotada em 2002 (<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/45124696.pdf>). Em 2010, uma atualização foi documentada por recomendação de padrões de desempenho a serem conduzidos durante o desenvolvimento de ensaios novos e/ou modificados com base em princípios semelhantes ao LLNA (OECD, 2010a). Além disso, estudos estatísticos estabeleceram uma redução de 20% no uso de animais (de 25 para 20 camundongos/ensaio/material-teste) sem mudanças no desempenho do LLNA (OECD, 2010a; HASEMAN *et al.*, 2011). Também proposta nesta diretriz atualizada em 2010, a abordagem de teste reduzida, rLLNA, estabelece apenas o uso da maior dose do material-teste, reduzindo o número de animais em até 40% (de 20 para 12 camundongos/ensaio/material-teste) (KIMBER *et al.*, 2006; OECD, 2010a). No entanto, o rLLNA pode ser usado caso a caso (ex.: confirmação de um resultado

negativo), uma vez que não fornece informações dose-resposta que é importante na determinação da potência do material-teste (ROVIDA *et al.*, 2001; OECD, 2010a). Além disso, pode gerar falsos negativos para substâncias químicas que induzem toxicidade dérmica em altas concentrações (EZENDAM *et al.*, 2013).

Para realizar o procedimento atualizado do LLNA, um mínimo de três concentrações de material-teste, em paralelo com grupos controle negativo e positivo, deve ser realizado, totalizando 20 camundongos ($n = 4/\text{grupo}$), permitindo assim uma avaliação dose-resposta. O princípio do teste consiste na exposição tópica (na orelha do animal) do material-teste, uma vez ao dia por três dias consecutivos, e posterior análise quantitativa da proliferação primária de células do linfonodo auricular (KIMBER *et al.*, 1986; OECD, 2010a; ANDERSON *et al.*, 2011). Assim, os dados do LLNA baseiam-se na avaliação indireta do quarto evento-chave da fase de indução do processo de sensibilização da pele (ou seja, ativação e proliferação de linfócitos).

Embora sem estudos de validação para identificação de dano (ANDERSON *et al.*, 2011), avaliações mecanicistas também foram propostas para superar a limitação do LLNA em discriminar irritantes e sensibilizantes dérmicos, como a secreção *in vitro* de citocinas e análises de expressão gênica (ULKER *et al.*, 2011; ADENUGA *et al.*, 2012; ARANCIOGLU *et al.*, 2015). Uma análise de vários parâmetros também tem sido recomendada, incluindo o seguinte: determinação do índice de estimulação, contagem de células de linfonodos, secreção de citocinas, alterações histopatológicas e perfis de expressão gênica na pele da orelha do animal (TSUCHIYAMA *et al.*, 2017). Além disso, alguns estudos também recomendaram a imunofenotipagem por método de citometria de fluxo (*flow cytometry method*, FCM) para discriminar irritantes e alérgenos de contato (DE SILVA *et al.*, 1993; SIKORSKI *et al.*, 1996; HOMEY *et al.*, 1998; GERBERICK *et al.*, 2002). Entretanto, um estudo detalhado envolvendo diferentes marcadores de superfície celular (entre eles, B220, CD19, CD3, CD4, IA (κ) e CD69) mostrou que a análise de fenotipagem das células de linfonodos não promove melhorias na capacidade preditiva do LLNA (STRAUSS *et al.*, 2015).

Em relação à análise quantitativa da proliferação de células de linfonodos, a OCDE 429 (2010a) propõe o uso de marcação radioativa *in vivo* com (^3H)-metil-timidina ou uma mistura de ^{125}I -iododeoxiuridina e fluorodesoxiuridina. No entanto, protocolos refinados não radioativos baseados na Toxicologia Verde são fornecidos

pela OECD, entre eles: OECD 442A - LLNA modificado pela *Daicel Chemical Industries* baseado no conteúdo de adenosina trifosfato (ATP) (LLNA:DA) (OECD, 2010b), e OECD 442B - LLNA:5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) via *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (LLNA:Brdu-ELISA) (OECD, 2010c; 2018a) ou FCM (LLNA:Brdu-FCM) (OECD, 2018a). O tempo de experimentação é de 6 e 8 dias para o LLNA padrão/LLNA:Brdu e LLNA:DA, respectivamente. Esse último estabelece o uso da medição do conteúdo de ATP por bioluminescência, enquanto que o LLNA:Brdu propõe o uso de BrdU em um procedimento de teste tipo ELISA ou FCM para quantificar a proliferação de células de linfonodos. A mensuração de BrdU pela técnica de imuno-histoquímica também tem sido proposta (JUNG *et al.*, 2010).

Esses marcadores de proliferação celular, radioativos ou não, são aplicados nos animais antes da coleta dos linfonodos. ULKER *et al.* (2011) propuseram um refinamento para o LLNA:Brdu-ELISA, através da marcação *ex vivo* de células de linfonodo com BrdU, o que reduz o número de injeções a serem aplicadas nos animais. Para o mesmo propósito em contribuir com o bem-estar animal, ZHANG *et al.* (2017) propuseram o uso do LLNA:DA em dois estágios (*two-stage LLNA:DA*) para reduzir o número de animais, conforme a seguir: reduziu o LLNA:DA, usando 2 animais ao invés de 4 por grupo, como um primeiro estágio para filtrar os alérgenos de contato; e o segundo estágio baseado na OECD 442A - LLNA:DA para classificá-los. Outra modificação desta diretriz foi desenvolvida pela adição da fase de elicitação (LLNA:DAE) como uma estratégia para identificar produtos químicos limítrofes positivos e para testes de sensibilização cruzada (YAMASHITA *et al.*, 2014; 2015). Embora essa abordagem ofereça melhorias relacionadas à correta predição de sensibilizantes, ela prolonga o tempo do procedimento por 12 dias e o uso de maior número de animais.

Em cada método LLNA, os dados numéricos são obtidos pela determinação do índice de estimulação (IE): razão da proliferação de células de linfonodos em grupos expostos *versus* o grupo controle do veículo (OECD, 2010a; b; 2018b). Além disso, a concentração estimada do material-teste necessária para induzir um aumento de 3 vezes ($IE = 3$) na proliferação de células dos nódulos linfáticos (CE3) pode ser calculada por interpolação linear de dados dose-resposta. Por sua vez, o valor CE3 tem sido utilizado para classificação de potência de sensibilizantes dérmicos (ECETOC, 2003; UNITED NATIONS, 2017), o que representa um ponto importante

para avaliação quantitativa de risco (LOVELESS *et al.*, 2010; ANGERS-LOUSTAU *et al.*, 2011). No entanto, análises de extensa base de dados destacaram a variabilidade do LLNA para prever a potência (EZENDAM *et al.*, 2016). Em relação aos modelos em cobaias, esses testes não permitiram qualquer classificação de potência com base na representação numérica dos dados obtidos, uma vez que fornecem apenas avaliações subjetivas das reações cutâneas. Assim, uma classificação de potência foi proposta baseada na frequência dessas reações positivas e nas as doses usadas para a exposição tópica durante a fase de indução (ECETOC, 2003; UNITED NATIONS, 2017).

Além disso, os ensaios em cobaias nunca foram validados, embora também tenham sido aceitos pelas agências regulatórias (VOHR, 2005). Essas técnicas foram realizadas historicamente sob condições padronizadas de boas práticas de laboratório, tanto pela indústria quanto pelos órgãos regulatórios, o que permitiu a obtenção de uma gama de dados de referência (VOHR, 2005). Em vista disso, dados históricos em cobaias, bem como aqueles obtidos usando LLNA, têm sido referências no desenvolvimento de métodos *in vitro*.

A principal diferença técnica entre os métodos existentes usando cobaias é o uso do adjuvante de Freund, com o objetivo de aumentar as respostas imunológicas da pele induzidas por um alérgeno. O documento original da OECD 406 (<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/45123669.pdf>) abordava um total de 7 metodologias, sendo 4 delas com o uso de adjuvante, sem recomendar a preferência por qualquer uma delas (OECD, 1992; MAURER *et al.*, 1994). Entretanto, sua última versão de 1992 recomenda apenas dois métodos, o adjuvante GPMT e o não adjuvante BT (OECD, 1992). O primeiro foi considerado mais sensível que o BT (MARZULLI e MAGUIRE, 1982; FRANKILD *et al.*, 2000). Para reduzir a superestimação dos resultados no GPMT, foi considerado um limiar de pelo menos 30% dos animais com reações positivas, em comparação com 15% no BT (SCCP, 2005).

Ao contrário do LLNA que envolve apenas uma fase de indução da sensibilização dérmica, os procedimentos-teste para o GPMT e BT incluem as fases de indução e de desafio. No primeiro, os animais são expostos, via intradérmica e/ou tópica, ao material-teste seguido por um período sem exposição de 10 a 14 dias. Depois, as doses de desafio do material-teste são aplicadas nos animais. Após 30-48 h, uma análise qualitativa das reações é realizada por meio de comparação entre os

grupos tratados (n = 20) e controle (n = 10) (OECD, 1992). Assim, em comparação com o LLNA, os ensaios em cobaias demandam ainda mais custos e tempo, uma vez que a obtenção de dados finais é de cerca de 30 dias, sem incluir o pré-teste. Além disso, eles não cumprem critérios de redução do uso de animais, de refinamentos e de bem-estar animal. Por exemplo, um grande número de cobaias precisa ser manipulado e seus dorsos tricotomizados periodicamente durante o tempo do teste. Além disso, os materiais-teste irritantes e/ou que apresentam cor podem interferir na análise das reações cutâneas. Abordagens mecanicistas também são inviáveis devido a existência de poucas cepas endogâmicas e reagentes específicos para marcadores celulares presentes em cobaias, por exemplo (VOHR, 2005).

Apesar dessas desvantagens, os modelos usando cobaias foram propostos para atender algumas limitações do LLNA, entre elas: testagem de surfactantes, problemas com a solubilidade do material-teste, ocorrência de falsos positivos e interferência do veículo utilizado (GERBERICK *et al.*, 2002; OECD, 2010a; ANDERSON *et al.*, 2011). De fato, o reconhecimento das limitações de cada método, bem como todas as informações disponíveis a cerca do material-teste (ex.: alerta estrutural, reatividade química, biodisponibilidade na pele), são cruciais para uma melhor predição de risco (BASKETTER, 2009).

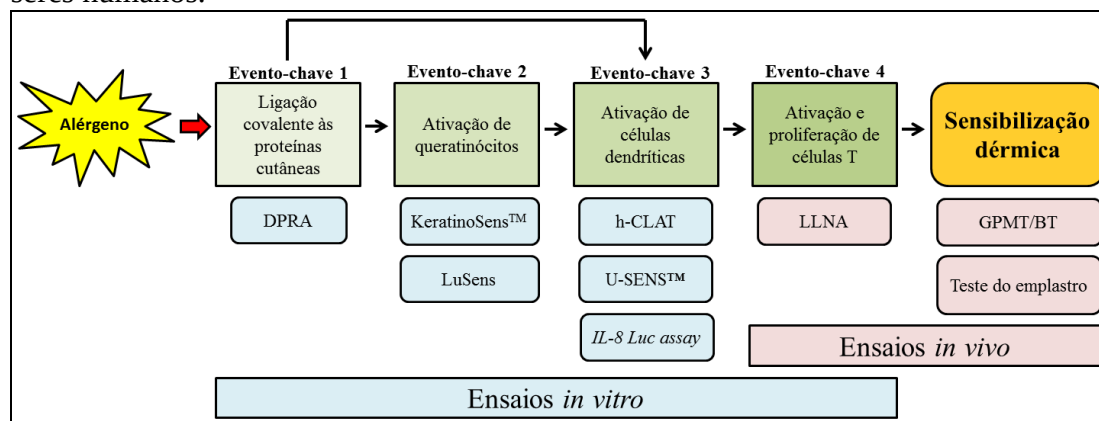
2.3.3 Ensaios *in vitro*

O conhecimento mecanicista alcançado com a AOP do processo de sensibilização dérmica (item 2.2.1, Figura 5) possibilitou um grande avanço no desenvolvimento de métodos *in vitro*, de relevância humana, baseados nos eventos-chave do processo de dermatite alérgica. Contudo, esse progresso ainda é necessário para técnicas que avaliem a fotoalergenicidade induzida por materiais.

Baseado nos três primeiros eventos-chave da sensibilização dérmica, há até o momento 6 metodologias validadas e adotadas pela OECD em diretrizes, entre elas: 1) evento-chave 1: OECD 442C/2015 – DPRA; 2) evento-chave 2: OECD 442D/2018 - KeratinoSensTM e LuSens; 3) evento-chave 3: OECD 442E/2018 - *human cell line activation test* (h-CLAT), *U937 cell line activation test* (U-SENSTM) e *IL-8 reporter gene assay* (IL-8-Luc-assay). Embora ainda não haja ensaios padronizados que abordem o evento-chave 4 (ativação e proliferação de linfócitos T), os esforços alcançados pelo desenvolvimento de técnicas inovadoras baseadas nos outros eventos-chave têm demonstrado uma boa aplicação para a predição de

sensibilizantes dérmicos, inclusive de uma maneira superior aos testes em animais. A Figura 6 representa um esquema da AOP da sensibilização dérmica, destacando cada evento-chave e os ensaios associados a eles.

Figura 6. Esquema da via de desfecho adverso (*adverse outcome pathway*, AOP) da sensibilização dérmica, destacando cada evento-chave e os respectivos ensaios *in vitro* validados até o momento, bem como técnicas *in vivo* envolvendo animais e seres humanos.



Abreviaturas: BT – Buehler test, DPRA – direct peptide reactivity assay, GPMT – guinea pig maximization test, h-CLAT – human cell line activation test (h-CLAT), IL-8 Luc assay – IL-8 reporter gene assay, LLNA – local lymph node assay, U-SENS™ – U937 cell line activation test.

Fonte: próprio autor.

Como forma de superar as limitações técnicas encontradas em cada técnica *in vitro*, tem sido recomendada a integração de ensaios. Assim, a recomendação baseada no uso de abordagens definidas pode ser usada em substituição às técnicas *in vivo* dentro de abordagens IATA (EURL ECVAM, 2017; OECD, 2017b). No Brasil, a ANVISA já apoia o uso de métodos *in vitro* dentro de uma IATA para apoiar as necessidades de avaliação de segurança de materiais (ex.: cosméticos, agrotóxicos e medicamentos) quanto ao potencial em promover sensibilização dérmica (DANIEL *et al.*, 2018).

2.3.3.1 DPRA

O primeiro evento-chave do processo de sensibilização dérmica (também denominado de evento de iniciação molecular) é o processo de haptenação: reação covalente do alérgeno de contato com sítios nucleófilos (ex.: resíduos de cisteína e/ou lisina) localizados em proteínas dérmicas, culminando na formação do complexo proteína-hapteno (OECD, 2014). Desse modo, os métodos *in chemico* visam explorar esse conhecimento através do desenvolvimento de protocolos

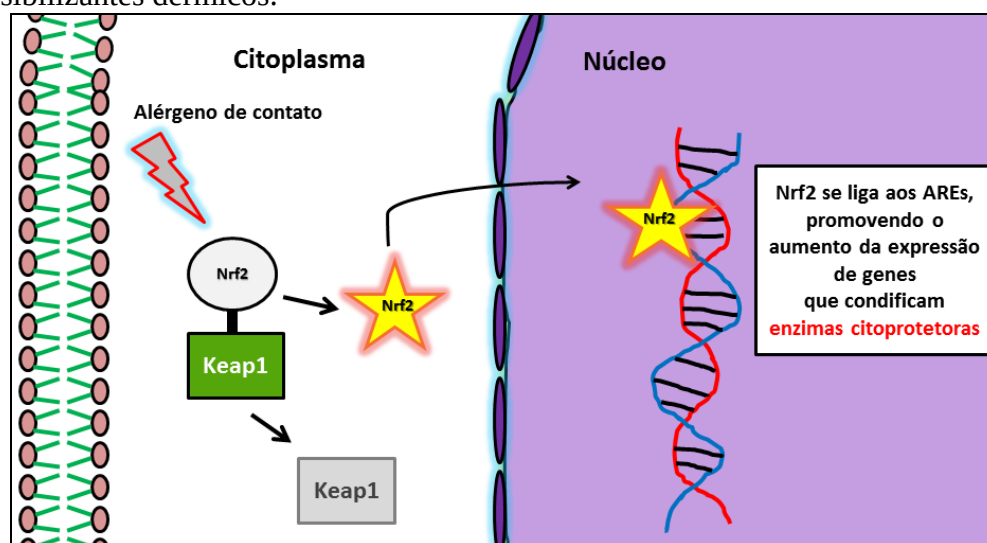
experimentais que utilizem, por exemplo, peptídeos sintéticos como modelos nucleófilos (CHIPINDA *et al.*, 2010).

O DPRA (GERBERICK *et al.*, 2004; GERBERICK *et al.*, 2007) é o único ensaio *in chemico* formalmente validado e incluído como uma diretriz de teste da OECD (OECD 442C) em 2015 (OECD, 2015a). Esse ensaio utiliza, como modelos de nucleófilos, heptapeptídeos contendo os resíduos de lisina ou cisteína, os principais encontrados em proteínas cutâneas. Após 24 h de incubação do material-teste com os heptapeptídeos, as análises são realizadas utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) para determinar o nível de depleção dos peptídeos. Com isso, os materiais testados podem ser categorizados conforme a classe de reatividade com os resíduos de lisina/cisteína (ausência/mínima, baixa, moderada ou alta reatividade). Em comparação com os dados do LLNA, o DPRA mostrou uma precisão de 80% (n = 157), sensibilidade de 80% (88/109) e especificidade de 77% (37/48) (ECVAM, 2012; NATSCH *et al.*, 2013).

2.3.3.2 KeratinoSensTM e LuSens

No ambiente intracelular, agentes eletrofílicos podem reagir com resíduos de cisteína presentes em uma proteína denominada Keap1 (*sensor protein Kelch-like ECH-associated protein 1*), culminando em sua dissociação do complexo Keap1-Nrf2 (DINKOVA-KOSTOVA *et al.*, 2005). Por sua vez, o regulador transcricional Nrf2 sofre translocação nuclear, liga-se a elementos de resposta antioxidante/eletrófilo (*antioxidant/electrophile response elements*, AREs), promovendo o aumento da expressão de genes citoprotetores como aqueles que codificam enzimas de fase II metabolizadoras de xenobióticos, por exemplo, o gene *HO1* (WAKABAYASHI *et al.*, 2004) (Figura 7). Com base nesse conhecimento científico, o princípio do ensaio KeratinoSensTM está envolvido na análise da via regulatória Keap1-Nrf2-ARE, que é comumente ativada por alérgenos de contato (NATSCH, 2010; EMTER e NATSCH, 2015).

Figura 7. Esquema do processo de ativação da via regulatória Keap1-Nrf2-ARE por sensibilizantes dérmicos.



Abreviaturas: AREs - antioxidant/electrophile response elements, Keap1 - sensor protein Kelch-like ECH-associated protein 1, Nrf2 - nuclear factor erythroid 2-related factor 2.

Fonte: próprio autor.

A linhagem KeratinoSensTM consiste na linhagem HaCaT, estabelecida de queratinócitos humanos contendo o gene repórter para enzima luciferase sob o controle transcricional do ARE do gene humano aldo-keto redutase (*AKR1C2*), que é bem conhecido por ser regulado por alérgenos de contato (EMTER *et al.*, 2010). Assim, materiais-teste com potencial de sensibilização dérmica são identificados através da medição quantitativa dos sinais da luciferase, por detecção de luminescência, que estão intimamente relacionados com a ativação de genes dependentes de Nrf2 (OECD, 2018b). Em um conjunto de dados envolvendo 145 substâncias químicas, a precisão, sensibilidade e especificidade, comparado aos dados animais, foi de 77, 79 e 72%, respectivamente, caracterizando o desempenho do KeratinoSensTM na discriminação entre sensibilizantes e não sensibilizantes dérmicos (NATSCH *et al.*, 2013).

O ensaio LuSens (BAUCH *et al.*, 2012) também avalia a atividade do fator de transcrição Nrf2 para prever alérgenos de contato, apresentando capacidade preditiva comparável ao KeratinoSensTM (RAMIREZ *et al.*, 2014). De fato, ele é considerado um ensaio similar (“*me-too*”) do KeratinoSensTM. No entanto, a linhagem de células LuSens é derivada de células HaCaT portadoras do gene da luciferase sob o controle da ARE do gene de rato NADPH: quinona oxidoreductase 1 (*NQO1*). Em comparação com dados humanos (n = 69), o LuSens mostrou uma

precisão de 83% (sensibilidade de 83% e especificidade de 81%) (RAMIREZ *et al.*, 2014).

O KeratinoSensTM tornou-se uma diretriz da OECD em 2015, diretriz OECD 442D (OECD, 2015b). Esse documento foi atualizado em 2018 para inclusão do procedimento LuSens (OECD, 2018b), após seu processo de validação científica. Além disso, tem sido discutido que ambos os métodos podem indiretamente fornecer dados sobre a reatividade do material-teste a proteínas, o primeiro passo da AOP da sensibilização dérmica no qual se baseia o DPRA (BAUCH *et al.*, 2012), já que a modificação dos resíduos de cisteína da proteína Keap1 é um requisito para ocorrer a ativação da via Nrf2, conforme já descrito.

2.3.3.3 h-CLAT, U-SENSTM e IL-8-Luc-assay

Na pele humana, as células dendríticas, denominadas de células de Langerhans, são os principais componentes celulares apresentadores de antígenos e exercem papel fundamental no processo inicial de dermatite de contato alérgica ao promover a ativação e maturação das células T. No entanto, o desenvolvimento de métodos *in vitro* usando células de Langerhans é difícil devido à baixa densidade celular encontrada na epiderme humana. Em vista disso, os principais esforços têm sido realizados no uso de células primárias derivadas do sangue de cordão umbilical ou periférico ou linhagens de células de neoplasias hematopoiéticas como substitutos para as células dendríticas (ASHIKAGA *et al.*, 2006).

Como qualquer sistema-teste, ambos os modelos têm suas vantagens e desvantagens. Por exemplo, a variabilidade entre doadores, a baixa reprodutibilidade, os problemas de amostragem de sangue, os protocolos demorados, complexos e de múltiplas etapas são fatores limitantes associados às células primárias; enquanto que as células neoplásicas têm genoma alterado e instável e podem perder sua homeostase típica e propriedades funcionais devido a passagens prolongadas (ASHIKAGA *et al.*, 2006; REUTER *et al.*, 2011; MARTÍNEZ *et al.*, 2013). Entretanto, um bom ensaio *in vitro* deve fornecer confiabilidade e precisão na predição de materiais-teste com potencial de alergenicidade cutânea, independente do modelo celular adotado. Além disso, a validação de técnicas e a demonstração de proficiência técnica são passos importantes na credibilidade dos resultados obtidos.

Até o momento, h-CLAT, U-SENSTM e IL-8-Luc-assay são os três métodos validados para avaliação do evento-chave 3, ou seja, ativação de células dendríticas.

Esses ensaios utilizam linhagens celulares de neoplasias como modelos substitutivos de células dendríticas, uma vez que essas células apresentam perfil fenotípico de células dendríticas maduras pela alta expressão de CD86 e/ou CD54 (h-CLAT ou U-SENSTM) ou expressão de IL-8 (IL-8-Luc-assay) após exposição a alérgenos de contato (OECD, 2018c).

O h-CLAT foi desenvolvido utilizando a linhagem celular de leucemia monocítica humana THP-1 para investigar o aumento da expressão de marcadores de superfície celular CD86 e CD54 após exposição a agentes sensibilizantes em qualquer concentração sub-citotóxica testada (ASHIKAGA *et al.*, 2006). Em comparação com os dados do LLNA, a análise do desempenho preditivo do h-CLAT, através de um conjunto de dados envolvendo 143 substâncias químicas, apresentou bons resultados (sensibilidade de 83%, especificidade de 71% e precisão de 80%) (Takenouchi *et al.*, 2013), semelhante ao estudo de validação (n = 96; sensibilidade de 81%, especificidade de 66% e precisão de 76%) (ECVAM, 2015). Em conjunto, a precisão, sensibilidade e especificidade gerais são de 85% (n = 142), 93% (94/101) e 66% (27/41), respectivamente (OECD, 2018c).

No ensaio U-SENSTM, anteriormente conhecido como MUSST (*myeloid U937 skin sensitization test*), um material-teste é considerado como sensibilizante dérmico se promover a regulação positiva da expressão de CD86 (limiar de 1,5), de forma dependente da concentração, em células U937 (PIROIRD *et al.*, 2015). Em comparação com os métodos *in vivo*, os resultados U-SENSTM alcançaram precisão, sensibilidade e especificidade de 86, 91 e 65%, respectivamente, em comparação com os dados LLNA (n = 166); enquanto que esses valores foram 77, 100 e 47%, na mesma ordem, em relação aos dados humanos (n = 101) (PIROIRD *et al.*, 2015; OECD, 2018c).

Estudos envolvendo as técnicas h-CLAT e U-SENSTM foram realizados com um grande número de substâncias químicas, mostrando sua aplicabilidade a materiais com diferentes perfis orgânicos e físico-químicos; aqueles classificados no LLNA como de fraca a moderada potência de sensibilização dérmica apresentaram maior taxa de falsos negativos do que substâncias químicas de forte potência em ambos os ensaios (ASHIKAGA *et al.*, 2010; ALÉPÉE *et al.*, 2015; ECVAM, 2015; PIROIRD *et al.*, 2015; TAKENOUCHI *et al.*, 2015). No caso do h-CLAT, as substâncias químicas com baixa solubilidade em água (Log Kow > 3,5), pré e pró-haptenos estão mais associados a resultados falso-negativos (ASHIKAGA *et al.*, 2010;

TAKENOUCHI *et al.*, 2013), contrastando aos achados do U-SENSTM (PIROIRD *et al.*, 2015). Além disso, agentes que interagem com a membrana celular, como ácido octanóico, lauril sulfato de sódio, tween[®] 80 e fenol, podem conduzir a resultados falsos positivos em ambas as técnicas (TAKENOUCHI *et al.*, 2013; PIROIRD *et al.*, 2015).

Alterações na secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias pelas células dendríticas na sensibilização dérmica também podem ser observadas durante o processo de ativação e consequente migração do local de exposição da pele para os linfonodos drenantes (DOS SANTOS *et al.*, 2009). A IL-8 (também conhecida como CXCL8) tem sido extensivamente investigada como uma ferramenta de previsão de alergenicidade cutânea, como verificado no ensaio validado IL-8-Luc-assay (TAKAHASHI *et al.*, 2011). Trata-se de uma técnica que reporta o gene promotor da luciferase cujo parâmetro de análise são a quantificação das alterações na indução do mRNA da IL-8 (TAKAHASHI *et al.*, 2011). Assim, este ensaio mede indiretamente os níveis da proteína IL-8.

O IL-8-Luc-assay utiliza a linhagem THP-G8, obtida pela transfecção de vetores de plasmídeos e genes de luciferases laranja e vermelha sob o controle dos promotores de IL-8 e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), respectivamente (TAKAHASHI *et al.*, 2011). Este sistema fornece a quantificação da indução do gene da luciferase por luminescência como um indicador da atividade da IL-8 e controle interno GAPDH em células THP-G8 expostas aos materiais-teste (OECD, 2018c). Durante o estágio de desenvolvimento, o IL-8-Luc-assay mostrou precisão, sensibilidade e especificidade de 88, 83 e 87%, respectivamente, em um conjunto de dados envolvendo 16 substâncias químicas recomendadas pelo Centro Europeu para Validação de Métodos Alternativos (TAKAHASHI *et al.*, 2011). Reunindo esses produtos químicos previamente testados com aqueles do estudo de validação (n = 113), o IL-8-Luc-assay atingiu uma precisão de 89% (sensibilidade de 96% e especificidade de 53%) (TAKAHASHI *et al.*, 2011; OECD, 2016; 2018c). Esta avaliação de desempenho não incluiu produtos químicos considerados fora do domínio de aplicabilidade do ensaio (entre eles, tensoativos, anidridos e substâncias químicas que interferem com o sistema luciferase) (OECD, 2018c). Além disso, o IL-8-Luc-assay foi refinado durante o estudo de validação por recomendação do uso de um meio comercialmente livre de soro para preparar soluções de material-teste, uma vez que foi verificado que o soro fetal bovino (reagente comumente usado em

cultura celular como fonte de fatores de crescimento) pode reduzir o desempenho do ensaio devido ao seu potencial em reduzir a eletrofilicidade química (OECD, 2016).

2.3.3.4 Ensaios não incluídos em diretrizes OECD

Além dos 06 métodos até então validados (DPRA, KeratinoSensTM, LuSens, h-CLAT, U-SENSTM e IL-8-Luc-assay), a OECD reconhece que há uma gama de ensaios que ainda não passaram pelo crivo de validação científica (e, portanto, não receberam um número de uma diretriz OECD). Contudo, esses ensaios apresentam relevância por serem usados no campo industrial, por exemplo, para finalidades regulatórias durante o processo de aprovação de produtos para comércio.

A fim de facilitar a aceitação regulatória dos dados gerados por esses métodos, a OECD 256 propõe maneiras de harmonizar a documentação dos ensaios utilizados e as abordagens definidas não descritas em diretrizes-teste (OECD, 2017a; b; c).

3 JUSTIFICATIVA

Diante do exposto, verifica-se a quebra de paradigma na Toxicologia do Séc. XXI na busca de uma Ciência baseada em técnicas *in vitro* de maior predição para o que realmente acontece no organismo humano. Portanto, o foco é promover a saúde humana com técnicas de maior qualidade preditiva, de relevância humana e sem desencadear dor e sofrimento desnecessário aos animais. Nessa conjuntura, esse trabalho buscou o desenvolvimento de métodos e de uma abordagem integrada de testes *in vitro* para avaliar a sensibilização dérmica, um parâmetro mandatório em questões regulatórias de registro de produtos.

A etapa de estabelecimento dessa estratégia envolveu modelos *in vitro* baseados em diferentes eventos da via de toxicidade da dermatite dérmica para detectar materiais com potencial de induzir esse evento edverso, tais como ingredientes agrotóxicos e cosméticos e suas misturas: formulações contendo glifosato e tinturas capilares contendo henna. A escolha desses materiais envolveu questões de relevância comercial e imunotoxicológica, uma vez que estão entre os principais componentes de produtos cosméticos e agrotóxicos e desencadeadores de dermatite de contato alérgica em humanos. Além do mais, alguns pontos ainda são obscuros no entendimento das vias de toxicidade a cerca desses produtos.

Por exemplo, alguns estudos demonstram que o glifosato pode promover toxicidade dérmica em humanos (HINDSON e DIFFEY, 1984; AMERIO *et al.*, 2004). Porém, ainda é controverso se realmente o glifosato ou os ingredientes considerados inertes, como o surfactante polioxietilenoamino (*polyethylated tallow amine*, POEA), são os responsáveis pela toxicidade dérmica observada com o uso dos produtos comerciais.

Já em relação aos cosméticos para coloração capilar, os produtos botânicos como as hennas têm sido considerados alternativas seguras quando comparado às tinturas contendo ingredientes sintéticos (GUERRA-TAPIA e GONZALEZ-GUERRA, 2014). De fato a dermatite alérgica de contato com a henna pura é extremamente rara, porém as reações alérgicas relatadas têm sido associadas à adulteração da henna com o ingrediente sintético PPD (BELHADJALI *et al.*, 2008; CALOGIURI *et al.*, 2017), destacando que esses produtos merecem atenção especial das agências regulatórias.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver estratégia integrada de ensaios inovadores substitutivos aos modelos animais para avaliação do potencial alergênico de ingredientes agrotóxicos e cosméticos e suas misturas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Estudos envolvendo ingredientes e formulações de agrotóxicos: implementação e refinamentos desenvolvidos na técnica DPRA e avaliação de fototoxicidade

- Implementar *in house* a metodologia DPRA (OECD 442C/2015);
- Avaliar o desempenho do DPRA frente à redução do volume total de reação: “miniaturização” da técnica, denominada micro-DPRA (mDPRA);
- Avaliar a aplicabilidade da técnica refinada mDPRA para a avaliação do perfil de sensibilização dérmica do glifosato, seu surfactante POEA e formulações comerciais contendo glifosato e surfactantes;
- Desenvolver técnica baseada no mDPRA, denominada photo-mDPRA, para identificação de fotossensibilizantes dérmicos;
- Avaliar o perfil de fototoxicidade e fotossensibilização dérmica do glifosato, seu surfactante POEA e formulações comerciais contendo glifosato e surfactantes.

4.2.2 Estudos envolvendo ingredientes cosméticos e/ou tinturas de cabelo do tipo henna: estabelecimento de uma plataforma multiparamétrica *in vitro* para sensibilização dérmica

- Implementar diferentes técnicas *in vitro* para sensibilização dérmica: ensaio de queratinócitos HaCaT para quantificação dos níveis intracelulares de IL-18 e análise de expressão gênica de *NRF2*, *HO1* e *FOS*, U-SENSTM (OECD 442E/2018), ensaio de níveis de IL-8 em linhagem U937, e PBMDCT;
- Avaliar a aplicabilidade dessas técnicas implementadas e também do mDPRA e GARDTM skin para a avaliação do perfil de sensibilização dérmica de ingredientes de tintura de cabelo;
- Estabelecer uma estratégia integrada de testes *in vitro* para avaliação do potencial de sensibilização dérmica de ingredientes de tintura de cabelo;

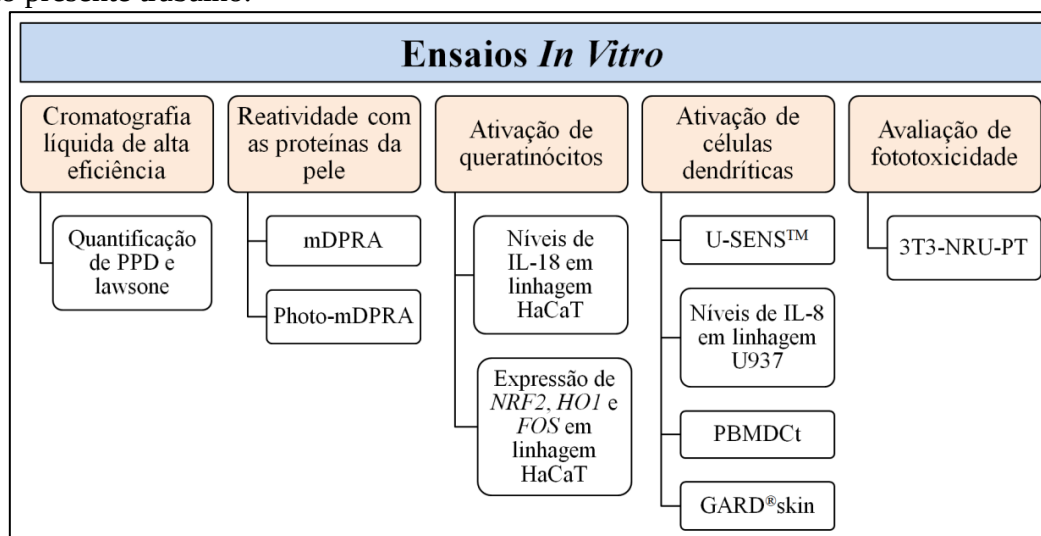
- Realizar análise de rótulo dos produtos henna;
- Avaliar a presença de lawsone e PPD nos produtos henna por cromatografia líquida de alta eficiência;
- Avaliar o potencial de sensibilização dérmica dos produtos henna utilizando a abordagem integrada de testes *in vitro* a ser estabelecida;
- Avaliar a resposta oxidativa, via análise de expressão de genes *NRF2*, *HO1* e *FOS*, de queratinócitos humanos HaCaT expostos a ingredientes de tintura capilar.

5 MÉTODOS

5.1 CRONOGRAMA EXPERIMENTAL

No presente estudo, as etapas de desenvolvimento ou implementação de ensaios e suas análises de aplicabilidade de materiais (ingredientes de cosméticos e agrotóxicos e suas misturas) foram realizadas utilizando abordagens exclusivamente livres de animais e de relevância humana (Figura 8). Envolveu um trabalho conjunto entre o Laboratório de Ensino e Pesquisa em Toxicologia *In Vitro* (Tox In, Faculdade de Farmácia - FF/UFG, coordenado pela Profa. Dra. Marize Campos Valadares) e os seguintes colaboradores: Profa. Dra. Eliana Martins Lima (Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, FF/UFG), Profa. Dra. Simone Gonçalves da Fonseca (Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, IPTSP/UFG) e Profa. Dra. Malin Lindstedt (Departamento de Imunotecnologia, Vila Médica, Universidade de Lund, Suécia).

Figura 8. Relação dos protocolos experimentais realizados para o desenvolvimento do presente trabalho.



Abreviações: 3T3-NRU-PT - 3T3 neutral red uptake phototoxicity test, FOS - Fos proto-oncogene, GARDTM skin - genomic allergen rapid detection, HO1 - heme oxygenase 1, IL - interleucina, mDPRA - micro-direct peptide reactivity assay, NRF2 - nuclear factor erythroid 2-related factor 2, photo-mDPRA - photo-micro-direct peptide reactivity assay, PBMDcT - peripheral blood monocyte-derived dendritic cell test, PPD - p-phenylenediamine, U-SENSTM - U937 cell line activation test.

Fonte: próprio autor.

5.2 REAGENTES

Os produtos cosméticos contendo henna foram adquiridos, entre agosto e dezembro de 2016, nos mercados locais de Goiânia, GO, Brasil. O surfactante POEA

foi comprado na Crescent Chemical Company (Islandia, NY, EUA). Seis formulações agrotóxicas à base de glifosato (Roundup Original, Glifosato AKB 80, Glifosato Atanor 48, Roundup Transorb R, Trop e Zapp QI 620), em forma de concentrado solúvel, foram obtidas de um revendedor brasileiro de insumos agrícolas. Os peptídeos contendo lisina (Ac-RFAAKAA-COOH) e cisteína (Ac-RFAACAA-COOH) (ambos com pureza > 95%) foram obtidos da Genone Biotechnologies (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). O hidróxido de amônio foi adquirido da Qhemis (Indaiatuba, SP, Brasil), enquanto que acetonitrila e ácido trifluoroacético foram obtidos da Avantor Performance Materials (Center Valley, PA, EUA). Acetato de amônio, fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico foram obtidos da Synth (Diadema, SP, Brasil). Triton X-100 e *basic red 51* foram adquiridos da Amresco (Solon, OH, EUA) e Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, EUA), respectivamente. Solução enzimática TrypLE™ Express foi adquirida da Life Technologies (Gibco®, NY, EUA). O fator humano estimulante de colônia granulócito-macrófago (*human granulocyte macrophage-colony stimulating factor*, GM-CSF) e IL-4 utilizados na cultura de células dendríticas derivadas de monócitos do sangue periférico foram adquiridos pela PeproTech (Rocky Hill, NJ, EUA). Produto para quantificação de IL-8 (*Human IL-8 ELISA Set*), iodeto de propídio, anticorpos anti-humano conjugado com FITC [CD14 (M5E2), CD86 (FUN-1), HLA-DR (L243), CD34 (581) e controle de isótipo anti-IgG1 (MOPC-21)] ou PE [CD54 (HA58), CD80 (L307) e controle de isótipo anti-IgG1 (MOPC-21)], e anticorpo anti-anti-CD11c (B-Iy6) conjugado com PE Cy7 foram adquiridos da BD Biosciences (San Jose, CA, EUA). Anticorpos anti-CD1a (NA1/34) conjugados com FITC e anti-CD14 (TÜK4) conjugado com PE foram adquiridos da Dako (Santa Clara, CA, EUA). Ficoll-Paque™ PLUS, meio de cultura HyClone™ MEM- α (*minimum essential medium*) modificado com L-glutamina, ribo- e desoxiribonucleosídeos e reagente TRizol® foram adquiridos na Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA). O kit de isolamento de monócitos humanos (*Monocyte Isolation kit II, human*; 130-091-153) e GM-CSF (adicionado na cultura das células derivadas da linhagem MUTZ-3) foram adquiridos na Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Alemanha). O kit de extração de RNA total (*Direct-zol™ RNA MiniPrep column purification kit*) utilizado no ensaio GARD™ skin foi adquirido na Zymo Research (Irvine, CA, EUA). Os reagentes usados para conduzir a avaliação da expressão gênica no equipamento NanoString® GEN2 nCounter Analysis System foram obtidos da

NanoString[®] Technologies (Seattle, WA, EUA). Os reagentes usados para quantificação de IL-18 foram os seguintes: *Quantikine[®] ELISA human IL-18 BPa kit* ou *Human IL-18 Platinum ELISA* produzidos pela R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) e eBioscience (Vienna, Austria), respectivamente. *SsoAdvancedTM Universal SYBR[®] Green Supermix* e *iScriptTM gDNA Clear Synthesis kit* foram comprados da Bio-Rad (Hercules, CA, EUA). Os primers utilizados foram comprados da *Integrated DNA Technologies* (Belo Horizonte, MG, Brasil) (Tabela 12). Todos os outros reagentes foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

5.3 LINHAGENS CELULARES

Neste estudo, foram utilizados queratinócitos humanos imortalizados (linhagem HaCaT), células mielóides humanas (linhagem U937) e fibroblastos de camundongos Balb/c 3T3-A31, provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Também foi usada células derivadas da linhagem mieloide MUTZ-3, fornecidas pela SenzaGen AB (Lund, Suécia).

As células HaCaT, 3T3 e U937 foram mantidas em meio de cultura completo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (linhagens HaCaT e 3T3) ou *Roswell Park Memorial Institute-1640 medium* (RPMI-1640) (linhagem U937) suplementado com soro fetal bovino (10%, v/v) inativado pelo calor (56°C por 30 min), penicilina (100 IU/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). As células derivadas da linhagem mieloide MUTZ-3 foram cultivadas em MEM- α , livre de antibióticos, suplementado com soro fetal bovino (não inativado pelo calor) (20%, v/v) e GM-CSF (40 ng/mL). Todas as linhagens foram cultivadas em garrafas de poliestireno (75 cm²) sob condições estéreis e mantidas em estufa de cultura celular (5% CO₂, 37 °C, 90% de umidade).

A manutenção da linhagem U937 foi realizada três vezes por semana, sendo semeada em uma concentração definida ($0,5 \times 10^5$ células/mL) a cada manutenção, enquanto que para as células derivadas da linhagem mieloide MUTZ-3 foi realizada duas vezes por semana à 2×10^5 células/mL.

A manutenção dos fibroblastos 3T3 foi realizada através de repiques periódicos (três vezes por semana) à uma concentração celular de ($0,5 \times 10^5$ células/mL). Quando a confluência celular atingia cerca de 70-80%, a remoção das células das garrafas de cultivo era realizada utilizando solução de tripsina/EDTA (0,025%:0,02%, p/v) diluída em tampão fosfato (1:1).

Em relação às células HaCaT, a manutenção foi realizada duas vezes por semana e, inicialmente, eram semeadas a uma concentração de 1×10^5 células/mL e, quando a confluência celular atingia 70%, eram desaderidas da garrafa por processo de tripsinização, conforme a seguir: 1) descarte do meio de cultura; 2) lavagem da garrafa com salina tamponada com fosfato (5 mL); 3) descarte da salina; 4) incubação, em estufa celular, com solução enzimática TrypLE™ Express (3 mL) por 10 min; 5) inativação da solução enzimática com meio completo (5 mL); 6) lavagens sucessivas da garrafa para desprendimento e separação dos grumos celulares.

Para manutenção ou realização dos ensaios, as células eram centrifugadas a 1000 rpm por 5 min, ressuspensas em 3-5 mL de meio e a viabilidade celular analisada utilizando contador automático TC20™ (Hercules, CA, EUA) ou Luna™ (Logos Biosystems, Annandale, VA, EUA), conforme recomendações do fabricante. Viabilidade celular superior a 90% foi considerada satisfatória para realização dos ensaios.

5.4 MATERIAIS-TESTE

Foram selecionados 10 ingredientes de tinturas de cabelo (1,4-diaminoantraquinona, 2-amino-3-hidroxipiridina, lawsone, 5-amino-2-metilfenol, hidroquinona, PPD, resorcinol, *disperse orange 3*, *basic red 51*, pirogalol). Os ingredientes de produtos agrotóxicos (glifosato e seu surfactante, POEA) e suas formulações comerciais (Tabela 8), usadas no Brasil, também foram testados nesse trabalho. Além disso, foram adquiridas 10 tinturas comerciais contendo henna de estabelecimentos localizados na cidade de Goiânia, GO, Brasil. Tabela 9 elenca os ingredientes cosméticos presentes em cada produto, conforme declarado pelos fabricantes.

Tabela 8. Dados das seis formulações comerciais, contendo glifosato como princípio ativo, vendidas no Brasil.

Formulação	Fabricante	Composição (% p/v)		
		Sal de glifosato	Equivalente ácido de glifosato	Componentes inertes
Roundup Original	Monsanto	48,0 ^a	36,0	68,4
Glifosato AKB 80	Kelldrin Industrial	48,0 ^a	36,0	-
Glifosato Atanor 48	Atanor	48,0 ^a	35,6	67,9
Roundup Transorb R	Monsanto	58,8 ^b	48,0	82,0
Trop	Milenia Agrociências	48,0 ^a	36,0	67,6
Zapp QI 620	Syngenta	62,0 ^b	50,0	74,0

^aSal de isopropilamino de glifosato; ^bglifosato de potássio; -: dado não fornecido pelo fabricante.

Tabela 9. Ingredientes declarados nos rótulos dos cosméticos para coloração capilar à base de henna [*L. inermis* (Lythraceae)] comercializados em Goiânia, Goiás, Brasil. Os ingredientes são apresentados na ordem de maior quantidade presente no produto, embora a quantidade de cada um não seja fornecida pelos fabricantes.

Nº	Coloração	Ingredientes declarados no rótulo ^a
	Preto para cabelos escuros ou marrom avermelhado para cabelos claros	Extrato de henna
1		
2	Preto	Extratos de henna e <i>Zea mays</i> , perborato de sódio, m-fenilenodiamino, PPD e resorcinol
3	Marrom	Extratos de henna, <i>Zea mays</i> e <i>Ilex paraguariensis</i> , HC Red no. 3, HC Blue no. 2 and HC Yellow no. 2
4	Cobre	Extratos de henna, <i>Zea mays</i> e <i>Ilex paraguariensis</i> , HC Red no. 3, HC Blue no. 2 and HC Yellow no. 2
5	Loiro champagne	Extratos de henna, <i>Phyllanthus emblica</i> , <i>Acacia concinna</i> , <i>Indigofera tinctoria</i> e <i>Terminalia belerica</i>
6	Vinho	Extratos de henna, <i>Phyllanthus emblica</i> , <i>Acacia concinna</i> , <i>Indigofera tinctoria</i> e <i>Terminalia belerica</i>
7	Vermelho	Extratos de henna, <i>Lawsonia alba</i> , <i>Juglans regia</i> , <i>Matricaria chamomile</i> , <i>Indigofera tinctoria</i> , <i>Curcuma longa</i> e <i>Bixa orellana</i> e picramato
8	Loiro escuro	Extrato de henna, perborato de sódio, carboximetilcelulose, sulfato de PPD, sulfato de sódio, ácido tartárico, m-aminofenol, p-aminofenol, lauril sulfossuccinato de dissódio, estearato de magnésio , algin e extrato da casca de <i>Sapindus mukurossi</i>
9	Loiro escuro	Extratos de henna e <i>Indigofera tinctoria</i> , pó da fruta de <i>Phyllanthus emblica</i> , pó da folha de <i>Eclipta prostrata</i> , extrato da casca/semente de <i>Azadirachta indica</i> , extrato da folha de <i>Centella asiatica</i> , pó da fruta de <i>Terminalia chebula</i> , pó da fruta de <i>Terminalia bellerica</i> , argila de lava marroquina, pó da raiz de <i>Curcuma longa</i> , pó da folha de <i>Cassia italica</i> e pó da raiz de <i>Vetiveria zizanioides</i>
10	Marrom avermelhado	Extrato da folha de henna, pó da folha de <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> , extrato da semente/casca de <i>Azadirachta indica</i> , pó da fruta de <i>Phyllanthus emblica</i> e pó da folha de <i>Eclipta prostrata</i>

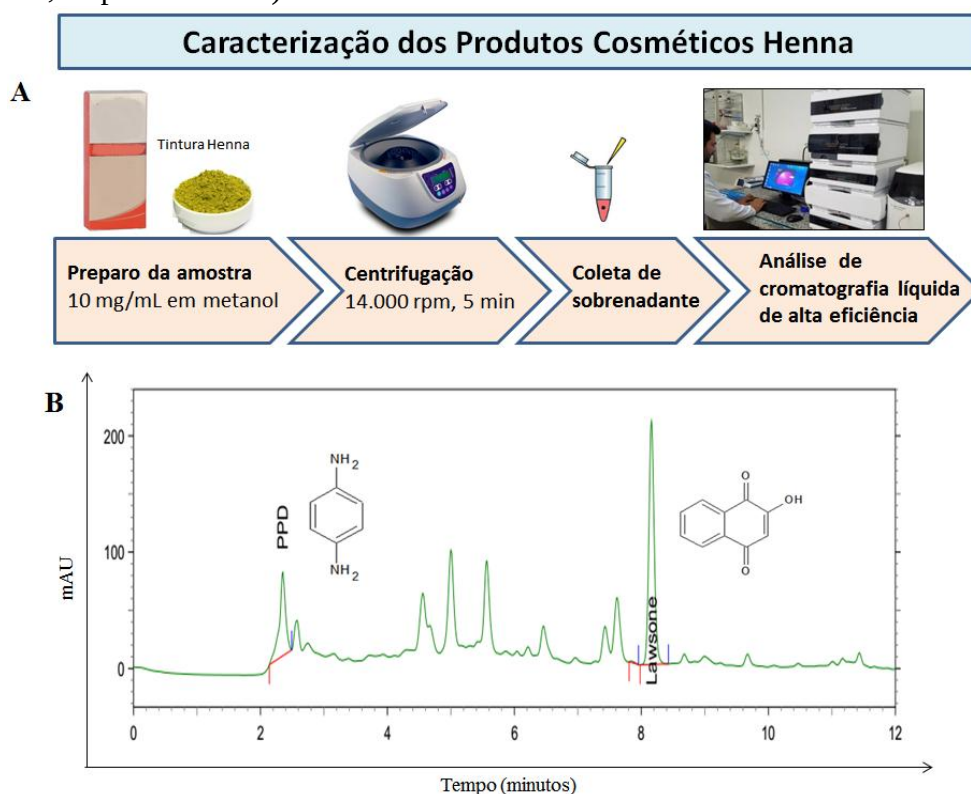
^a Ingredientes sintéticos são destacados em negrito.

5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS COSMÉTICOS HENNA

As soluções contendo cada produto henna foram preparadas a 10 mg/mL em metanol, submetidas à agitação automática e mantidas em banho de ultrassom por 1 min e 30 min, respectivamente, à temperatura ambiente. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 14.000 rpm por 5 min e o sobrenadante usado para análise cromatográfica em HPLC. A detecção e quantificação dos níveis de PPD e lawsone

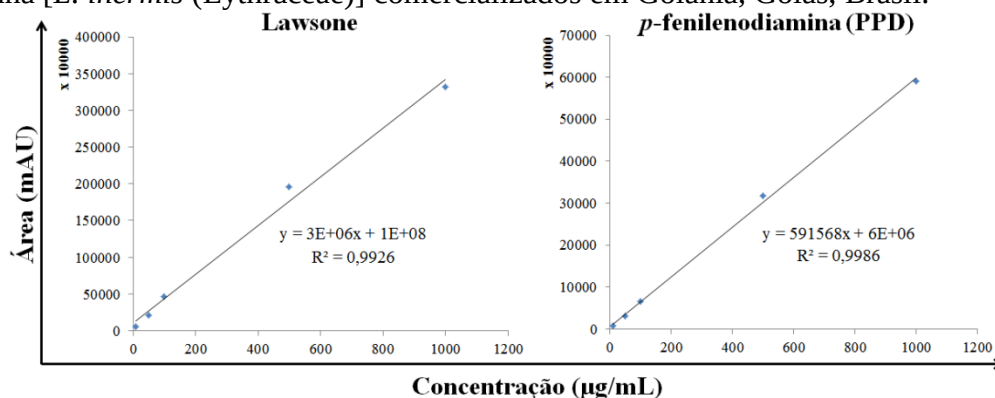
nas amostras foram realizadas com linearidade na faixa de 10-1000 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 9A). Figura 9B representa a análise representativa de um produto henna, o qual foi detectado a presença de PPD e lawsone, enquanto que a Figura 10 apresenta as curvas de calibração para cada substância.

Figura 9. Caracterização dos produtos cosméticos henna vendidos em Goiânia, Goiás, Brasil, quanto ao teor de *p*-fenilenodiamina (*p*-phenylenediamine, PPD) e lawsone: A) fluxograma de trabalho; B) cromatograma representativo de um produto henna, o qual foi detectado a presença de PPD e lawsone (tempos de retenção: ~2,3 e 8,1 min, respectivamente).



Fonte: próprio autor.

Figura 10. Curvas de calibração obtidas para determinação de lawsone e *p*-fenilenodiamina (PPD) em amostras de cosméticos para coloração capilar à base de henna [*L. inermis* (Lythraceae)] comercializados em Goiânia, Goiás, Brasil.



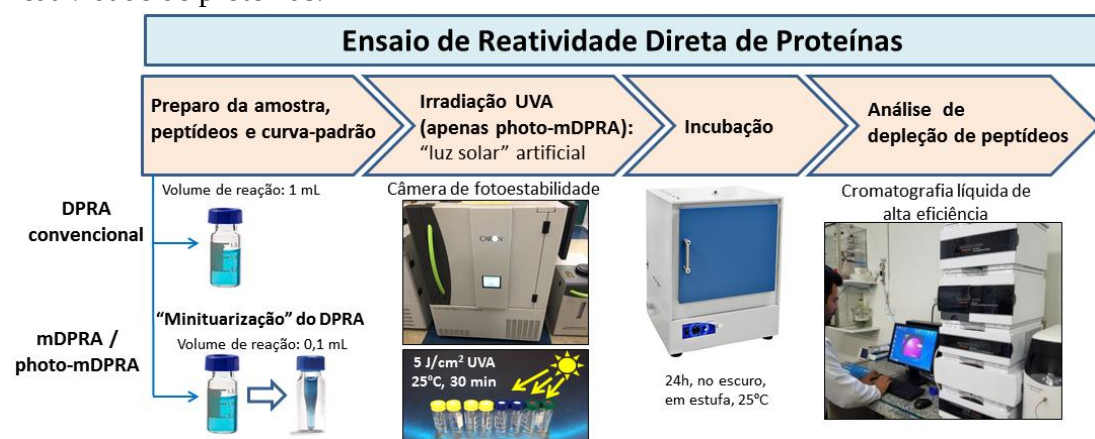
Fonte: próprio autor.

Para as análises, foi utilizado um sistema de HPLC composto por um cromatógrafo (Agilent 1260 series, Palo Alto, CA, EUA) com amostrador automático, bomba quaternária, aquecedor de coluna e detector de arranjo de diodo. O volume de injeção para as amostras foi de 10 µL e a separação das substâncias foi realizada utilizando uma coluna C18 (4,6 x 250 mm, 5,0 µm) como fase estacionária (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). As temperaturas do amostrador automático e do forno contendo a coluna foram de 25 e 30°C, respectivamente. A aquisição do espectro UV foi realizada de 190 a 400 nm. A obtenção dos dados foi realizada através do programa *Agilent OpenLab* (Palo Alto, CA, EUA). A fase móvel consistiu de uma mistura de 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético em água ultrapura (A) e metanol (B), a 1,0 mL/min. A separação foi realizada de forma gradiente, sendo estabelecidas as seguintes proporções de solventes ao longo do tempo de análise: 0 min (70:30); 2 min (50:50); 5 min (40:60); 7 min (30:70); 8 min (20:80); 9 min (20:80) e 10 min (10:90); 12 min (90:10). Os cromatogramas foram extraídos a 252 nm.

5.6 ENSAIO DE REATIVIDADE DE PROTEÍNAS

O potencial de cada material-teste em reagir com as proteínas da pele foi avaliado através do DPRA, baseado nos protocolos OECD 442C (OECD, 2015a) e DB-ALM nº 154 (https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/methods-and-protocols/topic/sensitisation-and-allergy/key/t_41#), com modificações no volume de reação (“miniaturização” da técnica: de 1 mL para 0,1 mL), chamado aqui de mDPRA. Além disso, uma etapa de exposição à radiação UVA foi inserida no protocolo do mDPRA para tornar a técnica capaz de identificar fotossensibilizantes. Essa adaptação foi chamada de photo-mDPRA. O fluxograma de trabalho pode ser observado na Figura 11.

Figura 11. Representação das etapas experimentais de condução dos ensaios de reatividade de proteínas.



Abreviação: DPRA – *direct peptide reactivity assay*, mDPRA – *micro- direct peptide reactivity assay*, photo-mDPRA – *photo-micro-direct peptide reactivity assay*.

Fonte: próprio autor.

5.6.1 Condições cromatográficas

Para realização dos ensaios, foram utilizados os mesmos sistema HPLC e programa de aquisição de dados (*Agilent OpenLab*) descritos no item 5.5. A análise cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna C18 (3,0 x 150 mm; 5,0 μ m; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). As temperaturas do amostrador automático e forno da coluna foram mantidas a 25 e 30°C, respectivamente. O volume de injeção para todas as amostras foi de 10 μ L e cada corrida cromatográfica durou um tempo máximo de 20 min.

Dois solventes foram utilizados como fase móvel, sendo denominadas fase aquosa A (ácido trifluoroacético em água ultrapura, 0,1%, v/v) e fase orgânica B (ácido trifluoroacético em acetonitrila, 0,085%, v/v), ambas com fluxo de 0,35 mL/min nas proporções descritas no Quadro 1. Antes de iniciar as análises, a coluna foi equilibrada a 30°C com fase aquosa A e fase orgânica B (proporção 1:1) por no mínimo 2 h antes do uso.

Quadro 1. Proporções definidas dos componentes da fase móvel (fase aquosa A e fase orgânica B) usada na análise cromatográfica das amostras para realização do ensaio de reatividade de proteínas.

Tempo (min)	Fase aquosa A (%)	Fase orgânica B (%)
0	90	10
10	75	25
11	10	90
13	10	90
13,5	90	10
20	Fim da corrida	

5.6.2 Preparo das soluções-estoque dos materiais-teste

As soluções-estoque dos materiais-teste constituídos de substâncias-puras foram preparadas na concentração de 100 mM, sendo diluídas em água ultrapura, dimetilsulfóxido (DMSO), acetonitrila ou mistura de DMSO:Acetonitrila (1:1) (Tabela 10). Da mesma forma, as soluções-estoque contendo as formulações de agrotóxicos foram preparadas, em água ultrapura, considerando a concentração de sal de glifosato em cada produto (ou seja, 100 mM do sal de glifosato); enquanto que o surfactante POEA foi testado puro (sem qualquer diluição prévia). Já as soluções-estoque contendo henna foram preparadas em metanol para uma concentração final de 50 mg/mL (máxima concentração em que se verificou completa solubilização das amostras) (Tabela 10).

Tabela 10. Relação dos solventes utilizados para preparo de soluções de cada material-teste para realização do ensaio de reatividade de proteínas.

Nº	Substância	Solvente
1	1,4-Diaminoantraquinona (<i>Disperse Violet 1</i>)	DMSO:Acetonitrila (1:1)
2	2-Amino-3-hidroxipiridina	Água ultrapura
3	Lawsone	DMSO:Acetonitrila (1:1)
4	5-Amino-2-metilfenol	Acetonitrila
5	Hidroquinona	Água ultrapura
6	<i>p</i> -fenilenodiamina (PPD)	Acetonitrila
7	Resorcinol	Água ultrapura
8	<i>Disperse orange 3</i>	DMSO
9	<i>Basic red 51</i>	Água ultrapura
10	Pirogallol	Água ultrapura
11	Glifosato	Água ultrapura
12	Produtos henna	Metanol

5.6.3 Preparo das soluções de peptídeos

Os peptídeos contendo lisina ou cisteína foram, respectivamente, diluídos em tampão fosfato (100 mM fosfato monobásico de sódio + 100 mM de fosfato de sódio dibásico; pH 7,5) e tampão acetato de amônia (100 mM; pH 10,2, ajustado com hidróxido de amônio), para uma concentração final de 0,667 mM.

5.6.4 Incubação dos materiais-teste com as soluções de peptídeos

Utilizando insertes de vidro de 250 μL (Sun Sri, Rockwood, TN, EUA), as soluções de peptídeos contendo cisteína ou lisina foram incubadas, em triplicata, com cada material-teste na proporção de 1:10 e 1:50, respectivamente, por 24 h, ao abrigo da luz e a 25°C. Para cada material-teste, foi realizado o controle de coeluição (material-teste + solvente do peptídeo). Os volumes de reações ficaram distribuídos conforme Quadro 2.

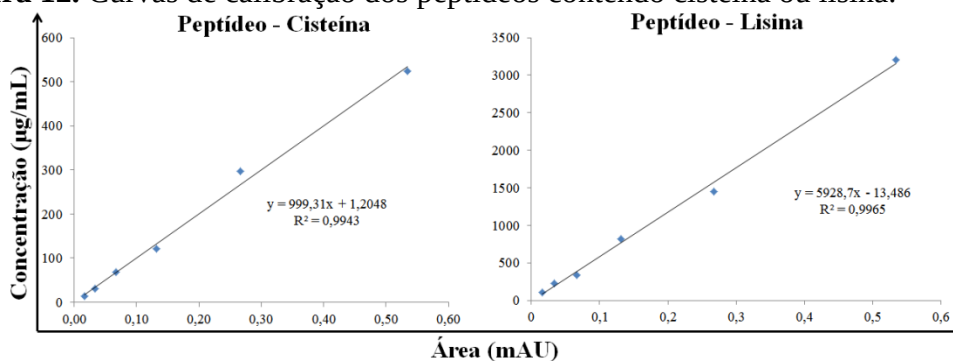
Para o photo-mDPRA, uma etapa adicional foi realizada com a exposição da mistura material-teste + peptídeo à radiação UVA (5 J/cm², 25°C) por 30 min, antes da incubação de 24 h ao abrigo da luz. Como fonte de radiação, foi utilizado uma câmara de fotoestabilidade (modelo 6545-2, Caron, OH, EUA) equipada com lâmpada fluorescente UVA para mimetizar a luz solar.

Quadro 2. Volumes de reações para cada peptídeo utilizado no ensaio de reatividade de proteínas.

Peptídeo contendo cisteína 0,5 mM peptídeo, 5 mM material-teste (1:10)	Peptídeo contendo lisina 0,5 mM peptídeo, 25 mM material-teste (1:50)
• 75 μL de peptídeo (ou tampão fosfato para controle de co-eluição) • 20 μL de acetonitrila • 5 μL da material-teste Volume final = 100 μL	• 75 μL de peptídeo (ou tampão acetato de amônia para controle de co-eluição) • 25 μL da material-teste Volume final = 100 μL

Para cada peptídeo, também foi realizado uma curva-padrão. Os padrões foram preparados usando tampão (acetato de amônia ou fosfato) e acetonitrila (20%, v/v), atingindo um intervalo seriado de seis concentrações de cada peptídeo (0,0167 - 0,534 mM). A linearidade de calibração considerada satisfatória foi de $r^2 > 0,99$ (Figura 12).

Figura 12. Curvas de calibração dos peptídeos contendo cisteína ou lisina.



Fonte: próprio autor.

Em paralelo, três controles de referência foram inseridos em cada análise:

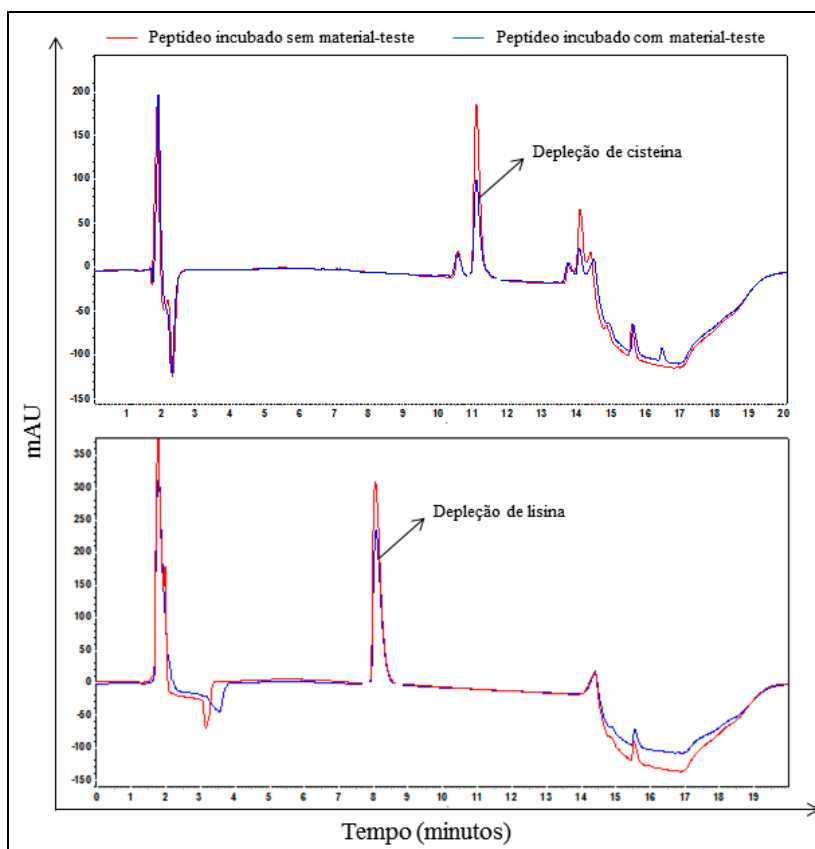
- Controle de referência A: preparado em acetonitrila para verificar a exatidão da curva de calibração para quantificação de cada peptídeo.
- Controle de referência B: preparado em acetonitrila, sendo injetado no início e fim de cada corrida cromatográfica com a finalidade de verificar a estabilidade do peptídeo durante o tempo de análise.
- Controle de referência C: preparado com o solvente de cada material-teste. Tem a finalidade de verificar se o solvente não influencia na depleção do peptídeo.

Assim, a ordem de análise pelo sistema HPLC ficou definido conforme a seguinte sequência: Curva de calibração > Referência A > Controle de coeluição > Referência B > Referência C > Material-teste > Referência C > Referência B.

5.6.5 Análise de dados

Figura 13 representa uma análise de mDPRA, destacando a depleção de peptídeos ocorrida após incubação por 24 h com um material-teste.

Figura 13. Representação de uma análise de *micro-direct peptide reactivity assay* (mDPRA), destacando a depleção de peptídeos ocorrida após incubação de 24 h com um material-teste.



Fonte: próprio autor.

A porcentagem de depleção de cada peptídeo foi calculada conforme a seguinte equação para todos os ensaios, DPRA, mDPRA e photo-mDPRA:

$$\text{Depleção (\%)} = \left[1 - \left(\frac{\text{Área do pico do peptídeo da substância - teste}}{\text{Média da área do pico do peptídeo da Referência C}} \right) \right] \times 100$$

Em seguida, a porcentagem média de depleção dos peptídeos contendo lisina e cisteína foi utilizada para classificar cada material-teste, conforme Tabela 11.

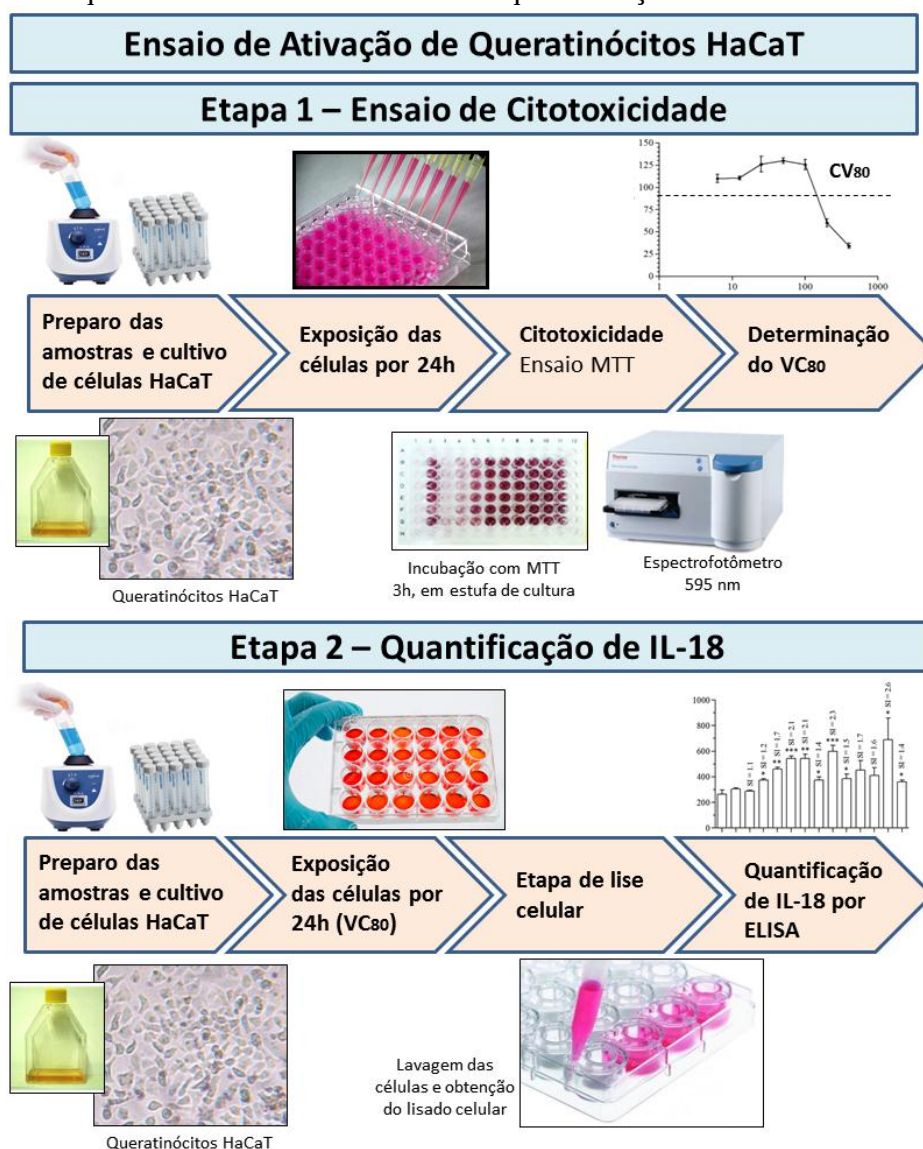
Tabela 11. Modelo de predição do *direct peptide reactivity assay* (DPRA) (OECD, 2015a), baseado na depleção média dos peptídeos contendo lisina ou cisteína, e também adotado para o *micro-direct peptide reactivity assay* (mDPRA) e photo-mDPRA.

Média de depleção (%)	Classe de reatividade	Predição
$0 \leq \text{depleção} \leq 6,38$	Nenhuma ou mínima	Negativo
$6,38 < \text{depleção} \leq 22,62$	Baixa	Positivo
$22,62 < \text{depleção} \leq 42,47$	Moderada	Positivo
$42,47 < \text{depleção} \leq 100$	Alta	Positivo

5.7 ENSAIO DE ATIVAÇÃO DE QUERATINÓCITOS

Para realização desse ensaio, foram utilizados queratinócitos HaCaT e o parâmetro avaliado foi a produção intracelular de IL-18 (CORSINI *et al.*, 2013) e análise de expressão dos genes *NRF2*, *HO1* e *FOS*. Como primeira etapa, foi determinada a concentração de cada material-teste que mantém a viabilidade celular em 80% (VC₈₀) através do método de redução do sal de tetrazólio [brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio – MTT]. A segunda etapa consistiu em avaliar a produção intracelular de IL-18 (Figura 14) ou expressão gênica (*NRF2*, *HO1* e *FOS*) (Figura 15) das células HaCaT após exposição com cada material-teste em concentração não-citotóxica (VC₈₀). Todas as etapas foram conduzidas através de três experimentos independentes.

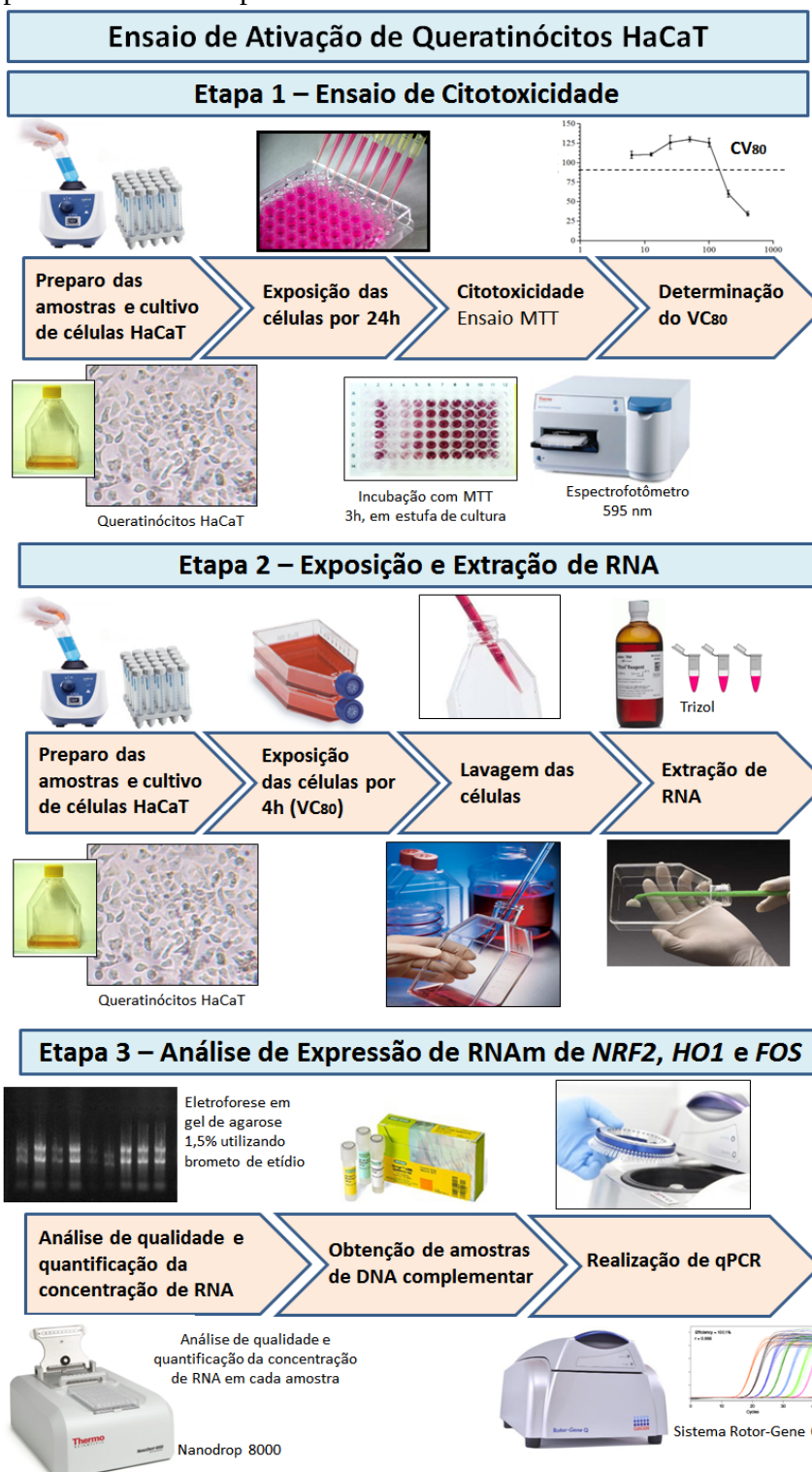
Figura 14. Representação das etapas experimentais de condução do ensaio de ativação de queratinócitos HaCaT através de quantificação dos níveis de IL-18.



Abreviação: ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*; IL - interleucina; MTT - brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio; VC₈₀ - concentração de cada material-teste que mantém a viabilidade celular em 80%.

Fonte: próprio autor.

Figura 15. Representação das etapas experimentais de condução do ensaio de ativação de queratinócitos HaCaT através das análises de expressão dos RNA mensageiros de *NRF2*, *HO1* e *FOS* através da técnica de reação quantitativa em cadeia da polimerase em tempo real.



Abreviação: *FOS* - *Fos proto-oncogene*; *HO1* - *Heme oxygenase 1*; MTT - brometo de 3-(4,5 dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio; *NRF2* - *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*; RNAm – RNA mensageiro; qPCR - *quantitative real-time polymerase chain reaction*; VC₈₀ - concentração de cada material-teste que mantém a viabilidade celular em 80%.

Fonte: próprio autor.

5.7.1 Preparo das soluções-estoque dos materiais-teste

Para realização dos ensaios, os materiais-teste foram diluídas em meio de cultura completo (hidroquinona, resorcinol, *basic red 51*, pirogalol, produtos contendo henna) ou DMSO (1,4-diaminoantraquinona, 2-amino-3-hidroxipiridina, lawsone, 5-amino-2-metilfenol, PPD e *disperse Orange 3*). Os materiais diluídos em DMSO foram, posteriormente, diluídos 250 vezes em meio de cultura completo, de tal modo que a concentração máxima de DMSO nas células fosse igual a 0,1% (v/v).

5.7.2 Ensaio MTT

As células HaCaT ($1,5 \times 10^5$ células/mL) foram semeadas em placas de 96 poços de fundo chato e incubadas em estufa. No segundo dia, o meio foi descartado por inversão e as células foram expostas, em triplicata, a oito diferentes concentrações de cada material-teste (0,2-500 µg/mL) por 24 h. Em paralelo, grupos controle (células sem exposição), veículo (DMSO 0,1%) e brancos (poços sem células contendo meio completo, veículo ou cada concentração de material-teste) foram realizados.

Após 24 h de exposição, o meio foi descartado e as células lavadas duas vezes com salina tamponada com fosfato (100 µL/poço). Posteriormente, 100 µL de solução de meio completo contendo MTT (0,5 mg/mL) foram adicionados em cada poço e a placa incubada por período adicional de 3 h (MOSMANN, 1983). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 100 µL de DMSO foram adicionados em cada poço para solubilizar os cristais de formazana gerados. A placa foi agitada por 15 min, a 30 rpm (agitador Orbit P4, Labnet, Edison, NJ, EUA) e a absorbância de cada poço medida em espectrofotômetro (Thermo Scientific Multiskan®, Boston, MA, EUA) a 595 nm. A absorbância obtida das células-controle foi considerada como 100% de viabilidade celular e, por regra de três simples, foram obtidos os valores de viabilidade para os demais grupos celulares. O valor médio de VC_{80} para cada material-teste foi obtido por análise de regressão linear.

5.7.3 Avaliação de produção intracelular de IL-18

As células HaCaT ($1,5 \times 10^5$ células/mL) foram semeadas em placas de 24 poços e incubadas em estufa de cultura celular. No dia subsequente, o sobrenadante da placa foi descartado e as células expostas à VC_{80} de cada material-teste por

período de 24 h. Em paralelo, grupos controle e veículo (DMSO 0,1%) foram realizados.

Após período de exposição, o sobrenadante de cada poço foi descartado e as células lavadas duas vezes com salina tamponada com fosfato (1 mL/poço). Em seguida, 250 µL de tampão de lise [Triton-X 100 (0,5%, v/v) contendo coquetel inibidor de proteinases] foram adicionados em cada poço seguido de incubação por 10 min sob agitação a 60 rpm. Posteriormente, os lisados celulares foram armazenados a -80°C até a quantificação dos níveis de IL-18, que foi determinada usando o produto *Quantikine1 ELISA human IL-18 BPa kit* (R&D Systems), conforme recomendações do fabricante.

Os níveis de proteína total em cada amostra foram determinados através do método do ácido bicinconínico usando o produto *Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit* (Sigma-Aldrich). O princípio desse método se baseia na capacidade de formação de complexos entre as proteínas presentes na amostra e íons Cu^{2+} , seguido por redução do Cu^{2+} para Cu^{1+} . Por sua vez, o ácido bicinconínico se complexa com íons Cu^{1+} , originando uma coloração roxa. A quantidade de proteína presente na amostra será proporcional ao nível de redução de Cu^{2+} para Cu^{1+} (SMITH *et al.*, 1985).

O protocolo foi conduzido baseado nas recomendações do fabricante, com modificações nos volumes de reação. Resumidamente, 190 µL de solução de trabalho [196,08 µL de solução contendo ácido bicinconínico + 3,92 µL solução de sulfato de cobre (II)] foram misturados com 10 µL de lisado celular ou tampão de lise (branco). Em paralelo, uma curva-padrão de albumina (0; 0,125; 0,25; 0,5; e 1 mg/mL) foi realizada. Após 30 min de incubação a 37 °C, a absorbância foi analisada a 562 nm. Com base na equação da reta obtida com a curva-padrão ($r^2 > 0,99$), foram determinados os níveis de proteínas totais em cada amostra.

Os dados de IL-18 foram representados em picograma por miligrama de proteína intracelular total, e o índice de estimulação (IE) foi calculado conforme a seguinte fórmula:

$$IE = \frac{\text{Nível de IL - 18 na amostra teste}}{\text{Nível de IL - 18 no grupo veículo}}$$

O material-teste foi classificado como sensibilizante dérmico quando o nível de IE $\geq 1,2$ associado com um aumento significativo de IL-18 em relação ao grupo veículo (CORSINI *et al.*, 2013).

5.7.4 Análise de expressão de *NRF2*, *HO1* e *FOS*

5.7.4.1 Exposição das células e extração de RNA

As células HaCaT (5 mL/frasco, $1,5 \times 10^5$ células/mL) foram semeadas em frascos para cultivo celular (25 cm²) e incubadas em estufa. No dia subsequente, os sobrenadantes dos frascos foram descartados e as células expostas à VC₈₀ de cada material-teste por período de 4 h. Em paralelo, grupos controle e veículo (DMSO 0,1%) foram realizados.

Após incubação, o sobrenadante de cada frasco foi descartado seguido por lavagem com 5 mL de tampão salina tamponada com fosfato. O RNA total das amostras foi então extraído pelo método de tiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio (Trizol[®]) através dos seguintes passos: 1) adição de 1 mL de Trizol[®] em cada frasco, 2) homogeneização manual dos frascos, 3) remoção das células aderidas com auxílio de um raspador celular, 4) homogeneização e transferência do lisado celular para tubos de polipropileno, 5) adição de 200 µL/tubo de clorofórmio, 6) agitação cuidadosa dos tubos em agitador automático, 7) incubação à temperatura ambiente por 10 min.

Os tubos foram então centrifugados (11500 rpm, 15 min, 4°C) e a fase aquosa de cada amostra foi transferida para um novo tubo. Em seguida, 500 µL/tubo de isopropanol a 100% foram adicionados. Os tubos foram então agitados e incubados à temperatura ambiente por 10 min. Após a etapa de centrifugação (11500 rpm, 15 min, 4°C), os sobrenadantes foram removidos e o precipitado passou por duas etapas de lavagem: 1) adição de 1 mL/tubo de etanol 75% gelado, 2) agitação por 15 s, 3) centrifugação (7500 rpm, 5 min, 4°C), 4) descarte do sobrenadante. Posteriormente, cada tubo foi invertido sobre papel de filtro para secagem. Em seguida, os precipitados foram dissolvidos em 25 µL de água livre de RNase. As amostras foram armazenadas à -80°C até análise.

A qualidade do RNA foi analisada em gel de agarose 1,5% (p/v) corado com brometo de etídio e também utilizando espectrofotômetro Nanodrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Além disso, a concentração de RNA em cada amostra foi determinada através da diluição de 1 µL de RNA em água livre de RNase (1:100) e analisado por meio de espectrofotômetro Nanodrop 8000 (Thermo Fisher Scientific) (densidade ótica $\geq 1,8$).

5.7.4.2 Análise da expressão dos RNA mensageiros

A análise da expressão dos RNA mensageiros (RNAm) de *NRF2*, *HO1* e *FOS* foi realizada através da técnica de reação quantitativa em cadeia da polimerase em tempo real (*quantitative real-time polymerase chain reaction*, qPCR).

Primeiramente, 1 µg de RNA de cada amostra foi utilizada para a síntese da fita de DNA complementar (cDNA). Para isso, as reações foram realizadas pelo método da transcriptase reversa utilizando reagentes comerciais (*iScript™ gDNA Clear Synthesis kit*, Bio-Rad), conforme recomendações do fabricante, para um volume final de 20 µL. As amostras foram incubadas por 10 min a 25°C e então por 60 min a 42°C. Concluído o segundo ciclo de incubação, as amostras foram incubadas por 5 min a 99°C e então incubadas por 5 min a 4°C para resfriamento.

Os *primers* utilizados para as reações de qPCR são apresentados na Tabela 12, os quais foram adquiridos pela Integrated DNA Technologies (Belo Horizonte, MG, Brasil).

Tabela 12. Sequência dos *primers* utilizados para a realização das análises de expressão dos RNA mensageiros de *NRF2*, *HO1* e *FOS* através da técnica de reação quantitativa em cadeia da polimerase em tempo real.

Gene	Sequência (5' – 3')	Nº GenBank ^a
<i>NRF2</i>	AGT GGA TCT GCC AAC TAC TC CAT CTA CAA ACG GGA ATG TCT G	S74017.1
<i>HO1</i>	CAT GAC ACC AAG GAC CAG AG AGT GTA AGG ACC CAT CGG AG	GQ221778.1
<i>FOS</i>	TGC CTC TCC TCA ATG ACC CTG A ATA GGT CCA TGT CTG GCA CGG A	CR542267.1
<i>HPRT1</i>	TGA CAC TGG CAA AAC AAT GAC GGT CCT TTT CAC CAG CAA GCT	CR407645.1

^aDisponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>.

Abreviaturas: *FOS* - *Fos proto-oncogene*, *HO1* - *Heme oxygenase 1*, *HPRT1* - *Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*, *NRF2* - *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*

Todos os *primers* foram verificados em relação a sua especificidade através da verificação da curva de *melting*. A eficiência das reações para cada *primer* foi otimizada anteriormente ao início das reações propriamente ditas. Concentrações variando de 2 a 5 mM de MgCl₂ e de 0,2 a 0,5 µM de cada *primer* foram utilizadas para se determinar em quais condições a reação obteria a melhor eficiência. Condições essas sugeridas pelo fabricante do equipamento.

As reações de qPCR foram realizadas com o sistema Rotor-Gene Q (Quiagen, Hilden, Alemanha), utilizando o kit *SsoAdvancedTM Universal SYBR[®] Green Supermix* (Bio-Rad). O perfil das reações foi determinado seguindo a fórmula sugerida pelo fabricante do equipamento. Para cada uma das reações, a água foi utilizada como controle negativo, e o produto das reações foi quantificado utilizando o *software* do próprio fabricante. *HPRT1* foi utilizado como o gene de referência (“housekeeping gene”) para a normalização dos valores.

5.8 ENSAIOS DE ATIVAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

Os ensaios de ativação de células dendríticas foram conduzidos utilizando diferentes metodologias envolvendo a linhagem celular U937 (metodologia U-SENSTM), células dendríticas derivadas de monócitos isolados de sangue periférico humano (metodologia *peripheral blood monocyte-derived dendritic cell test*, PBMDCT) e células derivadas da linhagem MUTZ-3 (metodologia *genomic allergen rapid detection*, GARDTM skin). As duas primeiras metodologias consistem na análise do aumento da expressão da proteína de membrana CD86, um marcador envolvido no processo de ativação de célula dendrítica; enquanto que GARDTM skin consiste na avaliação da modulação da expressão dos 200 genes envolvidos no processo de sensibilização dérmica. Adicionalmente, o modelo envolvendo a linhagem U937 também foi usado para se quantificar os níveis de IL-8, outro biomarcador de ativação de célula dendrítica.

5.8.1 Preparo das soluções-estoque dos materiais-teste

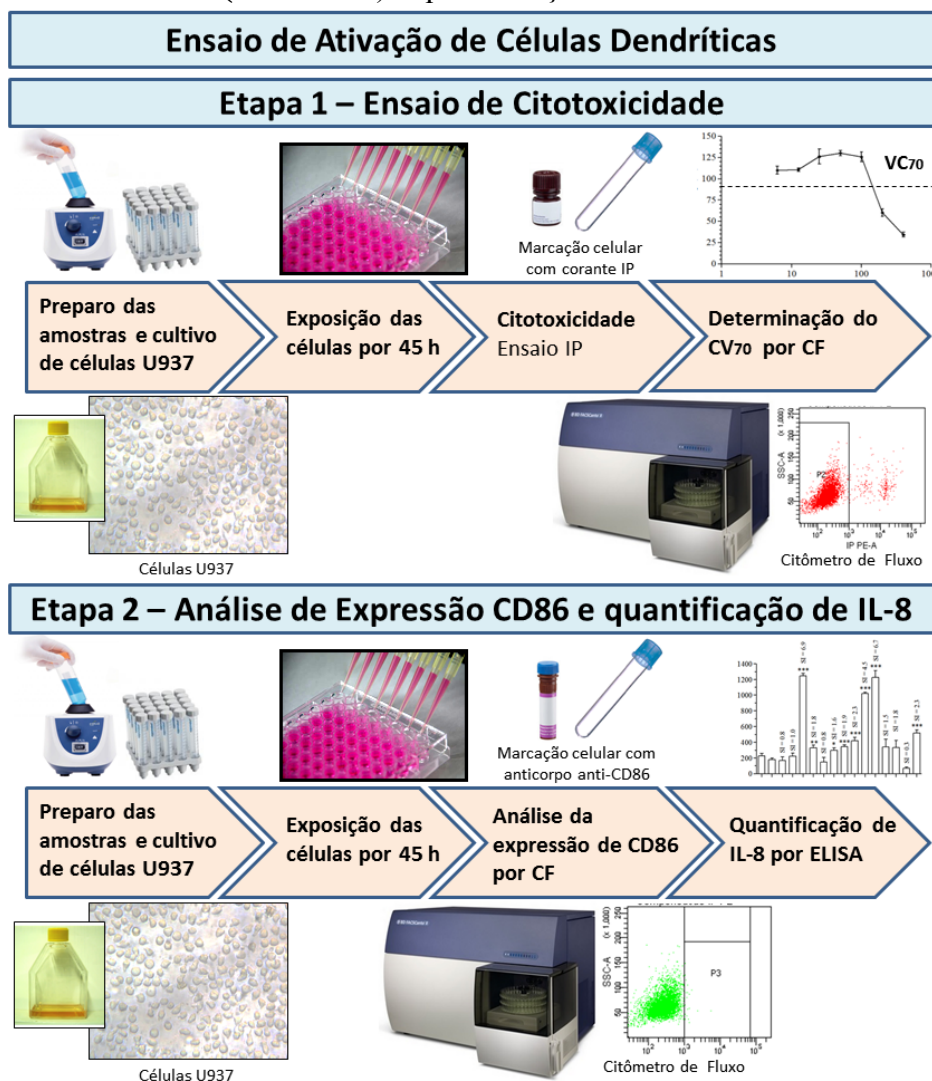
Os materiais-teste foram dissolvidos em meio de cultura completo ou DMSO, conforme o item 5.7.1. Os materiais diluídos em DMSO foram, posteriormente, diluídos 250 vezes em meio de cultura completo, de tal modo que cada concentração fosse duas vezes maior àquela desejada no poço da placa de cultura. A concentração desejada foi posteriormente atingida ao misturar a solução-teste com a suspensão celular (1:1, v/v).

5.8.2 U-SENSTM e análise dos níveis de IL-8

Esse ensaio U-SENSTM, que utiliza a linhagem U937 como modelo de células dendríticas humanas, foi conduzido através da metodologia descrita pelo guia OECD nº 447E (OECD, 2018c). Como primeira etapa, foi realizado o ensaio de

citotoxicidade para determinar a concentração de cada material-teste que mantém a viabilidade celular em 70% (VC₇₀) e, na segunda etapa do ensaio, a expressão de CD86 e produção de IL-8 em concentrações não citotóxicas ($\geq$ VC₇₀) foram avaliadas através de três experimentos independentes. Figura 16 esquematiza o fluxograma de trabalho para realização desses ensaios.

Figura 16. Representação das etapas experimentais de condução dos ensaios *U937 cell line activation test* (U-SENS™) e quantificação de IL-8.



Abreviação: CF - citometria de fluxo; ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; IL - interleucina; IP - iodeto de propídio; VC₇₀ - concentração de cada material-teste que mantém a viabilidade celular em 70%.

Fonte: próprio autor.

5.8.2.1 Ensaio de citotoxicidade

A viabilidade celular foi determinada usando o corante fluorescente iodeto de propídio. Em células em processo de morte celular, a membrana plasmática se torna permeável, permitindo a entrada do iodeto de propídio, que se liga ao material

genético celular (CROWLEY *et al.*, 2016). Assim, é possível distinguir células vivas daquelas em processo de morte celular (células marcadas com iodeto de propídio) dentro de uma amostra celular.

As células U937 (100 µL/poço na concentração de $0,5 \times 10^6$ células/mL) foram semeadas em placas de 96 poços e, em seguida, foram expostas a cinco concentrações de cada material-teste (100 µL/poço; 0,4 – 200 µg/mL). Grupos controle e veículo (DMSO 0,1%) também foram realizados paralelamente. Após período de incubação de 45 h, as células foram transferidas para microtubos e lavadas uma vez com 500 µL de salina gelada tamponada com fosfato. Após centrifugação (1000 rpm, 5 min e a 4°C), as células foram ressuspensas com 100 µL de salina gelada contendo iodeto de propídio (3 µg/mL) e incubadas por 15 min, à temperatura ambiente e protegidas da luz. Posteriormente, as células foram analisadas em citômetro de fluxo (BD FACSCANTO II, BD Biosciences, NJ, EUA) através da aquisição de 10.000 eventos/amostra. O valor médio de VC₇₀ para cada material-teste foi obtido por análise de regressão linear.

5.8.2.2 Análise da expressão de CD86

As células U937 (100 µL/poço na concentração de $0,5 \times 10^6$ células/mL) foram semeadas em placas de 96 poços e, em seguida, foram expostas a cinco diferentes concentrações de cada material-teste (100 µL/poço). Inicialmente, a maior concentração testada correspondia a 70% da VC₇₀; caso não fosse encontrado aumento na expressão de CD86, as quatro concentrações foram aumentadas de modo que não ultrapassasse o valor de VC₇₀. Grupos controle e veículo (DMSO 0,1%) também foram realizados paralelamente.

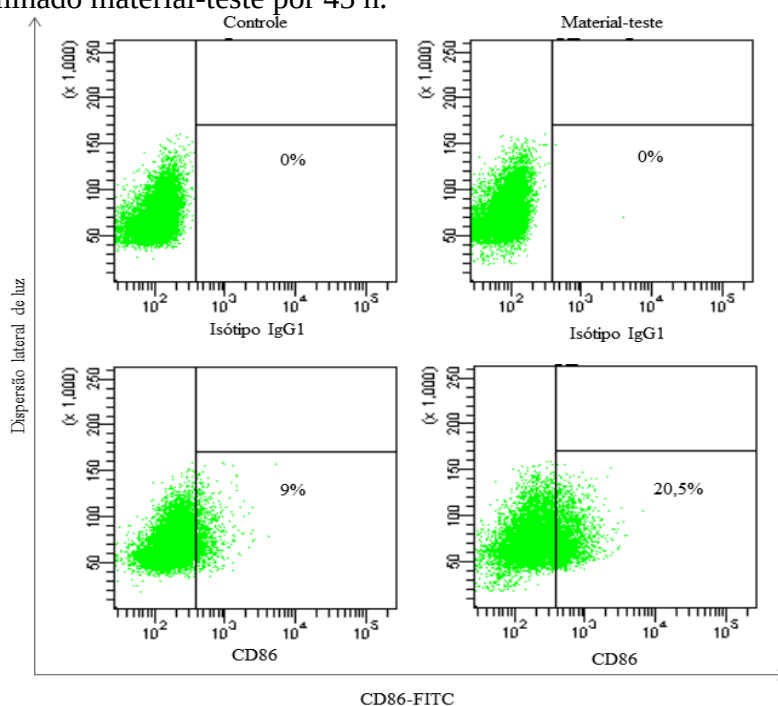
Após 45 h de incubação, as células foram transferidas para microtubos, lavadas uma vez com 500 µL de salina gelada tamponada com fosfato contendo 5% de soro fetal bovino inativado, a 1000 rpm e 4°C. Posteriormente, as células foram incubadas com 5 µL de anticorpo anti-CD86-FITC ou seu controle isótipo IgG1-FITC, em um volume final de 100 µL de salina. Após 30 min de incubação a 4°C, as células foram lavadas uma vez com 500 µL de salina e outra apenas com salina, ambas geladas. Para leitura em citômetro de fluxo, as células foram ressuspensas em 100 µL de salina (controle de autofluorescência) ou salina contendo iodeto de propídio (3 µg/mL). A análise de expressão de CD86 foi conduzida em 10.000 células viáveis (não marcadas com iodeto de propídio).

Para cada concentração do material-teste, foi calculado o IE da seguinte forma:

$$IE = \frac{\%CD86 \text{ tratado} - \%Isótipo \text{ IgG1 tratado}}{\%CD86 \text{ controle} - \%Isótipo \text{ IgG1 controle}} \times 100$$

O material-teste que promoveu um $IE \geq 150$ foi classificado como sensibilizante dérmico. Nesse caso, a partir de uma curva concentração-resposta, a concentração teórica do material-teste que induz um IE de 150% (C_{IE150}) foi determinada por regressão linear. Figura 17 representa células U937 não expostas (grupo controle) e expostas a um determinado material-teste, o qual se observa um aumento relevante da expressão de CD86.

Figura 17. Representação de uma análise de *U937 cell line activation test* (U-SENS™), destacando a expressão basal de CD86 em células U937 não expostas (grupo controle) e o aumento da expressão de CD86 em células U937 após exposição a um determinado material-teste por 45 h.



Fonte: próprio autor.

5.8.2.3 Análise da produção de IL-8

As células U937 (100 µL/poço na concentração de $0,5 \times 10^6$ células/mL) foram semeadas em placas de 96 poços e, em seguida, foram expostas a C_{EI150} ou VC₇₀ (100 µL/poço) de cada material-teste. Grupos controle e veículo também foram

realizados. Após 45 h, o sobrenadante e o lisado celular (obtido conforme item 5.7.3) foram armazenados a -80°C até análise.

A quantificação dos níveis de IL-8 nas amostras foi realizada usando o produto *Human IL-8 ELISA Set* (BD Biosciences), conforme recomendações do fabricante. Os dados foram expressos em pg/mL ou pg/mg de proteína para as amostras de sobrenadante e lisado celular, respectivamente.

5.8.3 PBMDCT

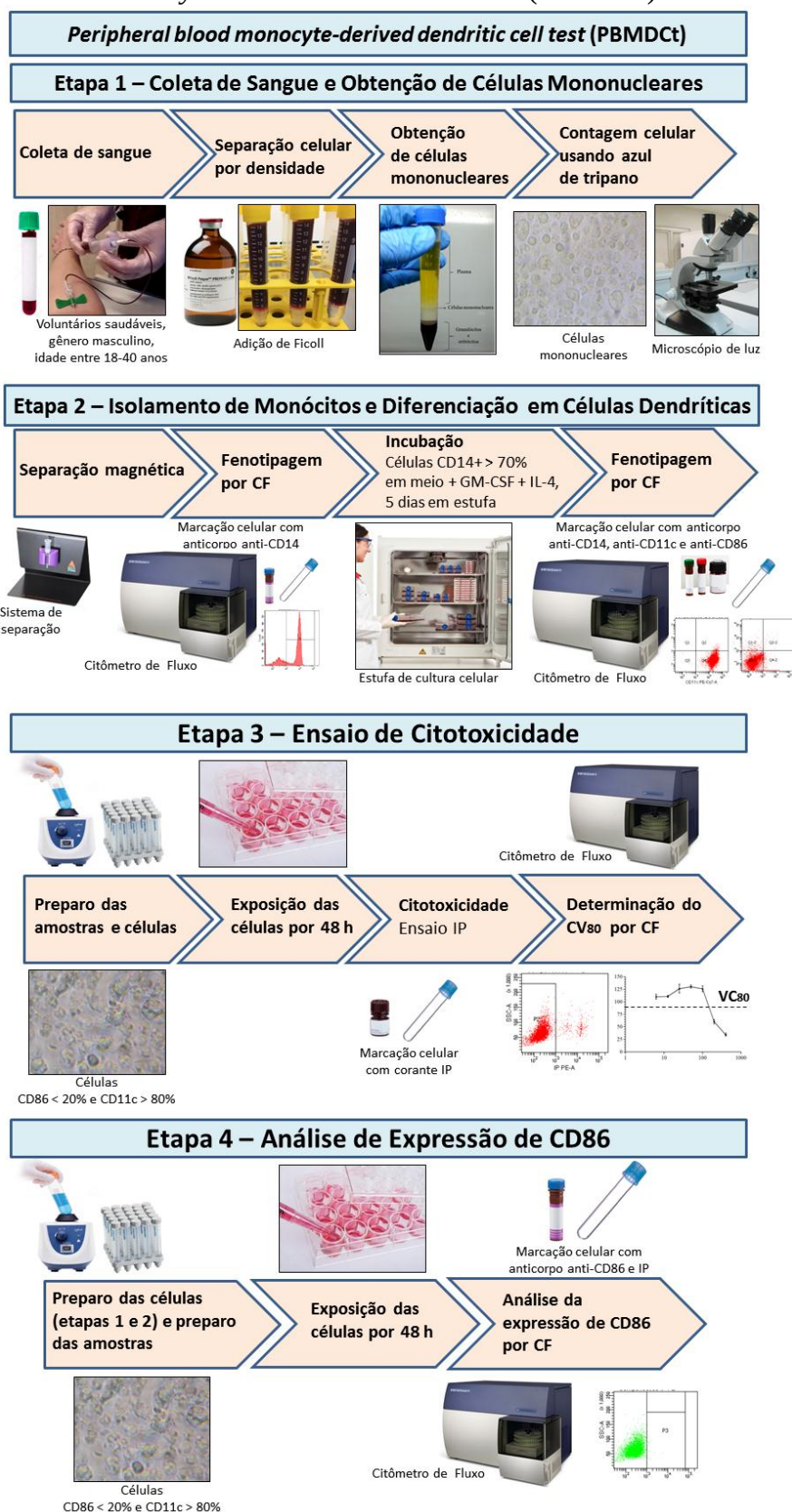
Esse ensaio foi realizado em diferentes etapas, conforme protocolo descrito por REUTER *et al.* (2011): 1) coleta de sangue e obtenção de células mononucleares; 2) isolamento de monócitos e diferenciação para células dendríticas; 3) ensaio de citotoxicidade; 4) análise de expressão de CD86 (Figura 18).

5.8.3.1 Obtenção de amostras de sangue periférico

As amostras de sangue utilizadas nesse ensaio foram doadas por voluntários saudáveis, do gênero masculino, com idade entre 18-40 anos. Os indivíduos selecionados eram alunos da Universidade Federal de Goiás. A coleta de sangue e realização dos ensaios foram realizadas na Faculdade de Farmácia da mesma Instituição. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (parecer nº 2.324.753/2017) (Anexo 1).

Após concordância do doador em participar da pesquisa, bem como sua assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 2), a coleta de sangue foi realizada através de punção endovenosa de um dos braços do indivíduo. Para minimizar os riscos aos indivíduos (ex.: desconforto, dor e formação de hematomas no local da coleta), a coleta de sangue foi feita utilizando dispositivo escalpe (BD Biosciences) e, posteriormente, acoplado a tubos a vácuo de 10 mL contendo anticoagulante EDTA (BD Biosciences). Foram utilizados cerca de 10 tubos, totalizando em um volume de sangue coletado de aproximadamente 100 mL por indivíduo.

Figura 18. Representação das etapas experimentais de condução do ensaio *peripheral blood monocyte-derived dendritic cell test* (PBMDcT).



Abreviação: CF - citometria de fluxo; GM-CSF - *human granulocyte macrophage-colony stimulating factor*; IL - interleucina; IP - iodeto de propídio; VC₈₀ - concentração de cada material-teste que mantém a viabilidade celular em 80%.

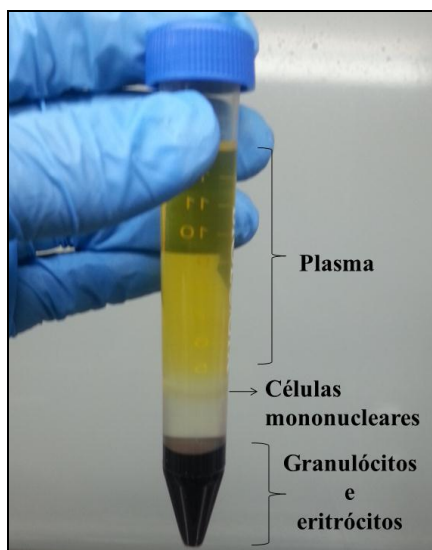
Fonte: próprio autor.

5.8.3.2 Processamento do sangue

5.8.3.2.1 Obtenção de células mononucleares

O sangue foi transferido para tubos de polipropileno, diluído na proporção de 1:1 (v/v) com solução salina de cloreto de sódio 0,9% (p/v) e homogeneizado cuidadosamente por inversão. Em seguida, 10 mL do sangue diluído foi cuidadosamente adicionado a tubos de polipropileno contendo 3 mL de Ficoll-PaqueTM PLUS (Ge Healthcare, Uppsala, Suécia). Após centrifugação, a separação celular aconteceu pela diferença de densidade entre as células: granulócitos e eritrócitos foram precipitados através do Ficoll e as células mononucleares permaneceram na interface Ficoll-plasma (Figura 19).

Figura 19. Células mononucleares isoladas em amostras de sangue periférico humano.



Fonte: próprio autor.

Após centrifugação (2000 rpm, 25 min), as células mononucleares foram coletadas com auxílio de pipeta de Paster e transferidas para um novo tubo de polipropileno. As células foram lavadas duas vezes com salina, seguido por etapa de centrifugação (1800 rpm, 8 min). Posteriormente, as células foram lavadas novamente com meio RPMI-1640 e centrifugadas (1000 rpm, 8 min). Em seguida, as células foram ressuspensas em 10 mL de meio RPMI-1640. Uma alíquota de 10 μ L de suspensão celular foi misturada com outra de corante azul de tripano (1:1, v/v) seguido por análise utilizando câmara de Neubauer (Boeco, Alemanha) para determinação da concentração e viabilidade celular.

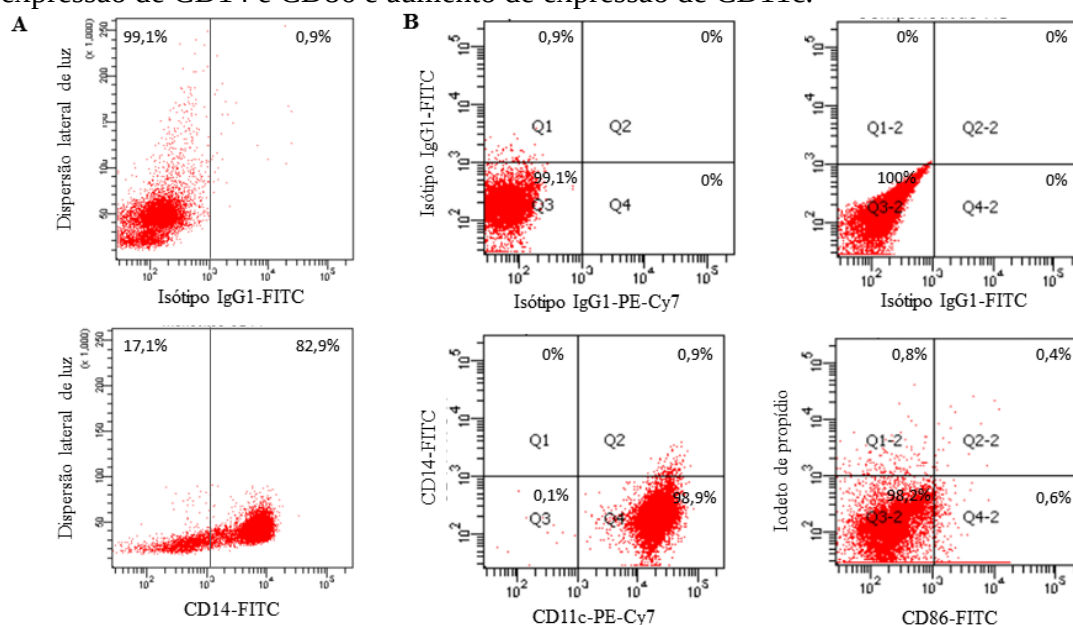
5.8.3.2.2 Isolamento de monócitos e diferenciação em células dendríticas

As células mononucleares foram usadas para isolar os monócitos utilizando um produto comercial de separação magnética (*Monocyte isolation kit II human*, Miltenyi Biotec, Rio de Janeiro, RJ), seguindo protocolo recomendado pelo fabricante. Assim, os monócitos humanos foram isolados por depleção de células não-monócitos (seleção negativa). Primeiro, as células não-monócitos foram marcadas magneticamente com um coquetel de anticorpos monoclonais conjugados à biotina, como reagente de marcação primário, e anticorpos monoclonais anti-biotina conjugados a *MicroBeads*, como reagente de marcação secundária. Posteriormente, as células não-monócitos marcadas magneticamente foram eliminadas da amostra celular total: essas células ficaram retidas em uma coluna de campo magnético, enquanto que os monócitos (não marcados) passaram através da coluna.

Posteriormente, uma alíquota de suspensão celular contendo os monócitos isolados foi incubada com anticorpo anti-CD14 (10 μ L) em tampão fosfato (90 μ L) durante 30 min, seguido de lavagem com tampão fosfato. As células foram ressuspendidas em tampão fosfato (200 μ L) e analisadas em citômetro de fluxo. Células de cada doador com expressão de CD14 > 70% foram usadas para obtenção de células dendríticas (Figura 20A).

Os monócitos isolados (1×10^6 células/mL) foram então plaqueados em placas de 6 poços (2 mL/poço). O meio de cultura utilizado foi o meio RPMI-1640 suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado, penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 mg/mL), GM-CSF (25 ng/mL) e IL-4 (25 ng/mL). Após 5 dias de incubação, alíquotas de amostras de cada doador foram incubadas com anticorpos FITC-anti-CD14 (10 μ L), PE Cy7-anti-CD11c (0,75 μ L) e FITC-anti-CD86 (10 μ L) em tampão fosfato (volume final: 100 μ L) durante 30 min. Em seguida, as células foram lavadas com tampão fosfato, ressuspendidas com 200 μ L de tampão fosfato contendo iodeto de propídio (3 μ g/mL) e analisadas por citômetro de fluxo. Debris, linfócitos e células mortas (positivas para iodeto de propídio) foram excluídos da análise. Amostras contendo células expressando CD86 < 20% e CD11c > 80% (Figura 20B) foram então utilizadas nos ensaios de análise da expressão de CD86 após exposição aos materiais-teste.

Figura 20. Fenotipagem representativa de monócitos e células dendríticas: A) monócitos isolados de sangue periférico humano, observando alta expressão de CD14; B) células dendríticas imaturas derivadas de monócitos, observando baixa expressão de CD14 e CD86 e aumento de expressão de CD11c.



Abreviação: Q1 - células positivas para CD14 ou iodeto de propídio, Q2 - células duplamente positiva, Q3 - células duplamente negativa, Q4 - células positivas para CD11c ou CD86.

Fonte: próprio autor.

5.8.3.2.3 Avaliação de citotoxicidade e análise da expressão de CD86

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços ($7,5 \times 10^5$ células/mL; 0,4 mL/poço) e expostas a diferentes concentrações de cada material-teste (0,4 – 200 μ g/mL). Após 48 h de exposição, a análise de citotoxicidade para determinação do VC₈₀ foi realizada usando o corante iodeto de propídio (conforme descrito no item 5.8.2.1).

Para avaliação da expressão de CD86, as células foram expostas a diferentes concentrações não citotóxicas ($>VC_{80}$) de cada material-teste por 48 h. Posteriormente, as células foram lavadas em tampão fosfato e a marcação com anticorpo anti-CD86-FITC realizada conforme descrito no item 5.8.2.2. As amostras foram analisadas utilizando citômetro de fluxo e a expressão de CD86 foi calculada da seguinte forma: $\Delta CD86 = (\% CD86_{tratado} - \% \text{isótipo IgG1}_{tratado}) - (\% CD86_{controle} - \% \text{isótipo IgG1}_{controle})$. O material-teste foi classificado como sensibilizante dérmico quando $\Delta CD86 > 20\%$ para qualquer concentração testada. O EC₂₀, concentração do material-teste que induz um CD86 = 20%, foi também obtido através de uma regressão linear. Cada material-teste foi testado em pelo menos cinco ensaios independentes, correspondendo a cinco dados diferentes.

5.8.4 GARD™ skin

A quantificação dos níveis transcricionais de 200 biomarcadores genômicos, denominados como a assinatura de predição do GARD™ skin, foi conduzida usando a plataforma tecnológica de codificação de barras digitais (NanoString® nCounter, NanoString® Technologies, Seattle, WA, EUA), de acordo com os protocolos previamente publicados (JOHANSSON *et al.*, 2011; FORRERYD *et al.*, 2016). Tabela 13 mostra os 200 biomarcadores genômicos e os 24 genes de referência que compõem o sistema GARD™ skin. Figura 21 resume os procedimentos experimentais, dividido em 3 etapas, na condução desse ensaio: 1) ensaio de citotoxicidade, 2) extração de RNA, e 3) análise da assinatura de predição do GARD™ skin.

Tabela 13. Relação dos genes de referência e dos biomarcadores genômicos, a assinatura de predição do *Genomic Allergen Rapid Detection* (GARD™ skin).

Biomarcadores		Acesso	Identidade do	Identidade da
Símbolo	Nome		cluster do transcript Affymetrix	
Genes de referência				
ABCF1 (2)	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1	NM_001090.2	8179112	NM_001090.2:796
ABCF1 (1)	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1	BC034488.2	8177797	BC034488.2:836
ABCF1 (3)	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1	BC034488.2	8117929	BC034488.2:420
ARF1/MIR3620	ADP-ribosylation factor 1/microRNA 3620	NM_001658.3	7910229	NM_001658.3:1446
AVL9	AVL9 homolog	NM_015060.1	8132188	NM_015060.1:418
B2M	Beta-2-microglobulin	NM_004048.2	7983360	NM_004048.2:573
CLTC	Clathrin, heavy chain (Hc)	NM_004859.3	8008834	NM_004859.3:6144
CSNK1D	Casein kinase 1, delta	NM_001893.3	8019463	NM_001893.3:1535
G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	NM_001042351.2	8176133	NM_001042351.2:2020
GNAS	GNAS complex locus	NM_001077488	8063668	GPS_8063668.1:4962
GNB1	Guanine nucleotide binding protein (G protein), Polypeptide 1	NM_002074.2	7911619	NM_002074.2:2165
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	NM_000194.1	8169984	NM_000194.1:240
LDHA	Lactate dehydrogenase A	NM_005566.3	7938777	NM_005566.3:2123
LDHC	Lactate dehydrogenase C	NM_017448.3	7938788	NM_017448.3:551
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	NM_000291.3	8168500	NM_000291.3:192
POLR2A	Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A, 220kDa	NM_000937.2	8004431	NM_000937.2:3775
RPL19	Ribosomal protein L19	NM_000981.3	8006845	NM_000981.3:582
RPLP0	Ribosomal protein, large, P0	NM_053275.3	7966996	NM_053275.3:72
SDHA	Succinate dehydrogenase complex,	NM_004168.1	8104166	NM_004168.1:230

TBP	subunit A, flavoprotein TATA box binding protein	68.1 NM_003194.4	8123507	NM_003194.4:602
Continuação Tabela 13				
TRIM27 (2)	Tripartite motif containing 27	AJ420519.1	8124610	AJ420519.1:2234
TRIM27 (1)	Tripartite motif containing 27	NM_006510.4	8179575	NM_006510.4:1724
UBA52	Ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	NM_001033930.1	8027024	NM_001033930.1:677
UBE2D2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2D 2	NM_181838.1	8108435	NM_181838.1:698
Assinatura de predição do GARD™ skin				
ABAT	4-aminobutyrate aminotransferase	18	7993126	NM_020686.5:268
ABHD5	abhydrolase domain containing 5	51099	8079153	NM_016006.4:910
ACER2	alkaline ceramidase 2	340485	8154563	NM_001010887.2:1306
ACLY	ATP citrate lyase	47	8015460	NM_001096.2:3990
ACTR10	actin-related protein 10 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	55860	7974587	NM_018477.2:1016
ADAM20	ADAM metallopeptidase domain 20	8748	7979927	NM_003814.4:1420
ALDH18A1	aldehyde dehydrogenase 18 fam., member A1	5832	7935230	NM_001017423.1:2617
ALDH1B1	aldehyde dehydrogenase 1 fam., member B1	219	8155327	NM_000692.3:1255
ANAPC1	anaphase promoting complex subunit 1	64682	8043349	NM_022662.3:7202
ANAPC5	anaphase promoting complex subunit 5	51433	7967149	NM_016237.4:1444
ANKRA2	ankyrin repeat, fam. A (RFXANK-like), 2	57763	8112596	NM_023039.4:741
ARFGAP3	ADP-ribosylation factor GTPase activating protein 3	26286	8076515	NM_001142293.1:2362
ARHGAP9	Rho GTPase activating protein 9	64333	7964436	BC006107.1:1808
ASB7	ankyrin repeat and SOCS box-containing 7	140460	7986433	NM_024708.3:1280
ATP6V0D1/ /ATP6V0D1	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 38 kDa, V0 subunit d1//ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 38 kDa, V0 subunit d1	9114//9114	8002041	NM_004691.4:1101
ATP6V0E1	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 9 kDa, V0 subunit e1	8992	8110022	NM_003945.3:617
ATP6V1H	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 50/57 kDa, V1 subunit H	51606	8150797	NM_213620.2:1095
BCL7A	B-cell CLL/lymphoma 7A	605	7959354	NM_001024808.1:594
BIN2	bridging integrator 2	51411	7963289	NM_016293.2:855
BLMH	bleomycin hydrolase	642	8014008	NM_000386.3:2088
BXDC1//RP F2	brix domain containing 1//ribosome production factor 2 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	84154//84154	8062211	ENST00000424137.1:288
C11orf61	chromosome 11 open reading frame 61	79684	7952445	NM_024631.2:1622
C11orf67//I NTS4	chromosome 11 open reading frame 67//integrator complex subunit 4	28971//92105	7942783	NM_024684.2:110
C12orf57	chromosome 12 open reading frame 57	113246	7953564	NM_138425.2:152
C13orf18	chromosome 13 open reading frame 18	80183	7971486	NM_025113.3:648
C15orf24	chromosome 15 open reading frame 24	56851	7987172	NM_020154.2:147

<i>C19orf46//A LKBH6</i>	<i>chromosome 19 open reading frame 46//alkB, alkylolation repair homolog 6 (E. coli)</i>	163183//8 4964	8036242	NM_032878.3:838
Continuação Tabela 13				
<i>C19orf54</i>	<i>chromosome 19 open reading frame 54</i>	284325	8036956	NM_198476.3:1349
<i>C1orf174</i>	<i>chromosome 1 open reading frame 174</i>	339448	7911897	NM_207356.2:1372
<i>C1orf183</i>	<i>chromosome 1 open reading frame 183</i>	55924	7918552	NM_019099.4:410
<i>C20orf111</i>	<i>chromosome 20 open reading frame 111</i>	51526	8066402	NM_016470.7:1035
<i>C20orf24</i>	<i>chromosome 20 open reading frame 24</i>	55969	8062326	NR_026562.1:645
<i>C3orf62//U SP4</i>	<i>chromosome 3 open reading frame 62//ubiquitin specific peptidase 4 (proto-oncogene)</i>	375341//7 375	8087374	ENST00000343010.1:9 42
<i>C9orf89</i>	<i>chromosome 9 open reading frame 89</i>	84270	8156404	NM_032310.3:204
<i>CARM1</i>	<i>coactivator-associated arginine methyltransferase 1</i>	10498	8025766	NM_199141.1:2352
<i>CD33</i>	<i>CD33 molecule</i>	945	8030804	NM_001082618.1:786
<i>CD86</i>	<i>CD86 molecule</i>	942	8082035	NM_175862.4:289
<i>CD93</i>	<i>CD93 molecule</i>	22918	8065359	NM_012072.3:4270
<i>COX7A2L</i>	<i>cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2 like</i>	9167	8051777	NM_004718.2:635
<i>CRHBP</i>	<i>corticotropin releasing hormone binding protein</i>	1393	8106418	NM_001882.3:1140
<i>CSGALNAC T2</i>	<i>chondroitin sulfate N- acetylgalactosaminyltransferas e 2</i>	55454	7927146	NM_018590.4:647
<i>CYP51A1</i>	<i>cytochrome P450, fam. 51, subfam. A, polypeptide 1</i>	1595	8140864	NM_000786.3:240
<i>DDRGK1</i>	<i>DDRGK domain containing 1</i>	65992	8064601	NM_023935.1:800
<i>DDX19A</i>	<i>DEAD (Asp-Glu-Ala-As) box polypeptide 19A</i>	55308	7997059	NM_018332.3:2236
<i>DDX21</i>	<i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 21</i>	9188	7927936	NM_004728.3:338
<i>DHCR24</i>	<i>24-dehydrocholesterol reductase</i>	1718	7916432	NM_014762.3:1385
<i>DHCR7</i>	<i>7-dehydrocholesterol reductase</i>	1717	7950067	NM_001360.2:2352
<i>DHX33</i>	<i>DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 33</i>	56919	8011861	NM_001199699.1:2550
<i>DNAJB4</i>	<i>DnaJ (Hsp40) homolog, subfam. B, member 4</i>	11080	7902512	NM_007034.3:949
<i>DNAJB9</i>	<i>DnaJ (Hsp40) homolog, subfam. B, member 9</i>	4189	8135480	NM_012328.2:274
<i>DNAJC5</i>	<i>DnaJ (Hsp40) homolog, subfam. C, member 5</i>	80331	8064208	NM_025219.2:1510
<i>DNAJC9</i>	<i>DnaJ (Hsp40) homolog, subfam. C, member 9</i>	23234	7934320	NM_015190.3:42
<i>DRAM2//C EPT1</i>	<i>DNA-damage regulated autophagy modulator 2//choline/ethanolamine phosphotransferase 1</i>	128338//1 0390	7918474	NM_178454.4:628
<i>DTD1</i>	<i>D-tyrosyl-tRNA deacylase 1 homolog (S. cerevisiae)</i>	92675	8061211	NM_080820.4:1085
<i>EDEM2</i>	<i>ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 2</i>	55741	8065855	NM_018217.2:1366
<i>EVI2B</i>	<i>ecotropic viral integration site 2B</i>	2124	8014063	NM_006495.3:467
<i>FAM36A//N CRNA00201</i>	<i>fam. with sequence similarity 36, member A</i>	116228//2 84702	7911085	NM_198076.4:155
<i>FAM86A</i>	<i>fam. with sequence similarity 86, member A</i>	196483	7999304	NM_201400.3:654
<i>FAS</i>	<i>Fas (TNF receptor superfam.,</i>	355	7929032	NM_000043.4:398

FASN	member 6) fatty acid synthase	2194	8019392	NM_004104.4:1450
Continuação Tabela 13				
FBXO10/T OMM5	F-box protein 10/translocase of outer mitochondrial membrane 5 homolog (yeast)	26267//40 1505	8161229	NM_012166.2:651
FDPSP2	farnesyl diphosphate synthase pseudogene 2	619190	8140443	NR_003262.1:388
FDXR	ferredoxin reductase	2232	8018236	NM_004110.4:1758
FOXO4	forkhead box O4	4303	8168205	NM_005938.3:1252
FTHP15	ferritin, heavy polypeptide 1 pseudogene 5	2509	8126948	J04755.1:308
FUCA2	fucosidase, alpha-L- 2, plasma	2519	8129974	NM_032020.4:868
GAS2L3	growth arrest-specific 2 like 3	283431	7957850	NM_174942.1:1315
GDAP2	ganglioside induced differentiation associated protein 2	54834	7918955	NM_001135589.2:957
GDF11	growth differentiation factor 11	10220	7956026	NM_005811.3:738
GLRX	glutaredoxin (thioltransferase)	2745	8113214	NM_002064.2:309
GNL3L	guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)-like	54552	8167797	NM_001184819.1:3915
GNPNAT1	glucosamine-phosphate N- acetyltransferase 1	64841	7979196	NM_198066.3:2056
GSR	glutathione reductase	2936	8150112	NM_000637.3:1628
GTF2IRD2/ /GTF2IRD2 B	GTF2I repeat domain containing 2//GTF2I repeat domain containing 2B	84163//38 9524	8133549	GPS_8133549b.1
GTF2IRD2/ /GTF2IRD2 B	GTF2I repeat domain containing 2//GTF2I repeat domain containing 2B	84163//38 9524	8140170	GPS_8140170.1
GTF3C2	general transcription factor IIIC, polypeptide 2, beta 110 kDa	2976	8051075	NM_001521.2:3555
HBP1//CO G5	HMG-box transcription factor 1//component of oligomeric golgi complex 5	26959//10 466	8135392	NM_012257.3:1330
HIST1H1C	histone cluster 1, H1c	3006	8124397	NM_005319.3:401
HIST1H1E	histone cluster 1, H1e	3008	8117377	NM_005321.2:172
HIST1H2AE	histone cluster 1, H2ae	3012	8117408	NM_021052.2:455
HIST1H2BE	histone cluster 1, H2be	8344	8117389	NM_003523.2:321
HIST1H3G	histone cluster 1, H3g	8355	8124440	NM_003534.2:348
HIST1H3J	histone cluster 1, H3j	8356	8124537	NM_003535.2:364
HIST1H4A	histone cluster 1, H4a	8359	8117334	NM_003538.3:47
HIST- 2H2AB//2H 2AC//2H2A A3//2H2AA 4	histone cluster 2, H2ab//histone cluster 2, H2ac//histone cluster 2, H2aa3//histone cluster 2, H2aa4	8338//833 7//723790	7905079	BC001629.1:306
HIST- 2H2AB//2H 2AC//2H2A A3//2H2AA 4	histone cluster 2, H2ab//histone cluster 2, H2ac//histone cluster 2, H2aa3//histone cluster 2, H2aa4	8338//833 7//723790	7919619	BC001629.1:2
HIST- 2H2BF//2H 2BE//2H2B A	histone cluster 2, H2bf//histone cluster 2, H2be//histone cluster 2, H2ba	440689//8 349//3378 75	7919606	NM_001024599.2:1305
HMGB3	high-mobility group box 3	3149	8170468	NM_005342.3:2332
HMGCR//H MGCR	3-hydroxy-3-methylglutaryl- Coenzyme A reductase//3- hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase	3156//315 6	8106280	NM_000859.2:3634
HMGCS1// HMGCS1	3-hydroxy-3-methylglutaryl- Coenzyme A synthase 1 (soluble)//3-hydroxy-3-	3157//315 7	8111941	NM_002130.7:335

	<i>methylglutaryl-CoA synthase 1 (soluble)</i>			
HMOX1	<i>heme oxygenase (decycling) 1</i>	3162	8072678	NM_002133.2:866
Continuação Tabela 13				
HNRNPL	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L</i>	3191	8036613	NM_001533.2:1382
IRS2	<i>insulin receptor substrate 2</i>	8660	7972745	NM_003749.2:775
ISCU	<i>iron-sulfur cluster scaffold homolog (E. coli)</i>	23479	7958414	NM_014301.3:733
ISG20L2	<i>interferon stimulated exonuclease gene 20 kDa-like 2</i>	81875	7921110	NM_030980.1:1492
KCNE3	<i>potassium voltage-gated channel, Isk-related fam., member 3</i>	10008	7950409	NM_005472.4:2528
KGFLP1//F	<i>keratinocyte growth factor-like protein 1//fibroblast growth</i>	387628//2	8155530	NR_003674.2:542
GF7//KGFL	<i>factor 7 (keratinocyte growth</i>	252//6544		
P2//FLJ204	<i>factor)//keratinocyte growth</i>	66//40332		
44	<i>factor-like protein 2//hypothetical protein FLJ20444</i>	3		
LPAR1	<i>lysophosphatidic acid receptor 1</i>	1902	8163257	NM_001401.3:1184
LRPPRC	<i>leucine-rich PPR-motif containing</i>	10128	8051882	NM_133259.3:4710
LY96	<i>lymphocyte antigen 96</i>	23643	8146934	NM_015364.2:360
MAP2K1//S	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 1//small nuclear</i>	5604//103	7984319	NM_002755.3:640
NAPC5	<i>RNA activating complex, polypeptide 5, 19 kDa</i>	02		
MAPK13	<i>mitogen-activated protein kinase 13</i>	5603	8119016	NM_002754.4:1004
METTL2A	<i>methyltransferase like 2A</i>	339175	8009008	NM_181725.3:298
MGST3	<i>microsomal glutathione S-transferase 3</i>	4259	7906978	NM_004528.2:195
MRPL30	<i>mitochondrial ribosomal protein L30</i>	51263	8043848	NM_145212.3:2278
MRPL4	<i>mitochondrial ribosomal protein L4</i>	51073	8025586	NM_015956.2:766
MRPS17//G	<i>mitochondrial ribosomal protein S17//glioblastoma</i>	51373//26	8132922	NM_015969.2:238
BAS//ZNF7	<i>amplified sequence//zinc finger</i>	31//34907		
13	<i>protein 713</i>	5		
MTPAP//LO	<i>mitochondrial poly(A) polymerase</i>	55149//72	7932834	NM_017442.3:656
C729668	<i>5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase</i>	9668		
MTR	<i>neighbor of BRCA1 gene 1</i>	4548	7910752	NM_000254.2:6816
NBR1	<i>nuclear import 7 homolog (S. cerevisiae)</i>	4077	8007471	NM_031858.2:602
NIP7	<i>NLR fam., pyrin domain containing 12</i>	51388	7996934	NM_016101.4:880
NLRP12	<i>nucleolar protein fam. 6 (RNA-associated)</i>	91662	8039096	NM_033297.2:2097
NOL6	<i>NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1</i>	65083	8160682	NM_022917.4:4362
NQO1	<i>nuclear receptor binding protein 1</i>	1728	8002303	NM_000903.2:790
NRBP1	<i>nucleotide binding protein-like</i>	29959	8040927	NM_013392.2:1681
NUBPL	<i>nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 14</i>	80224	7973826	NM_025152.2:374
NUDT14	<i>nuclear fragile × mental retardation protein interacting protein 1</i>	256281	7981566	NM_177533.4:712
NUFIP1	<i>nucleoporin 153 kDa</i>	26747	7971361	NM_012345.2:1005
NUP153	<i>olfactory receptor, fam. 5,</i>	9972	8124059	NM_001278209.1:4915
OR5B21		219968	7948330	NM_001005218.1:292

PASK	subfam. B, member 21 PAS domain containing serine/threonine kinase	23178	8060205	NM_015148.3:2619
Continuação Tabela 13				
PAWR	PRKC, apoptosis, WT1, regulator	5074	7965112	NM_002583.2:824
PDAP1	PDGFA associated protein 1	11333	8141273	NM_014891.6:364
PDE1B	phosphodiesterase 1B, calmodulin-dependent	5153	7955943	NM_000924.3:498
PFAS	phosphoribosylformylglycinami dine synthase	5198	8004804	NM_012393.2:4655
PHLDA3	pleckstrin homology-like domain, fam. A, member 3	23612	7923372	NM_012396.3:532
PIK3AP1	phosphoinositide-3-kinase adaptor protein 1	118788	7935337	NM_152309.2:598
PINK1	PTEN induced putative kinase 1	65018	7898663	NM_032409.2:1610
PMM2	phosphomannomutase 2	5373	7993148	NM_000303.2:36
PNO1	partner of NOB1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	56902	8042381	NM_020143.2:875
POLR2E	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide E, 25 kDa	5434	8032149	NM_002695.3:340
POLR3E	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide E (80 kD)	55718	7993973	NM_018119.3:3054
PPM1D//PP M1D	protein phosphatase 1D magnesium-dependent, delta isoform//protein phosphatase, Mg2+/Mn2+ dependent, 1D	8493//849 3	8008922	NM_003620.3:2783
PREX1	phosphatidylinositol-3,4,5- trisphosphate-dependent Rac exchange factor 1	57580	8066848	NM_020820.3:6075
PSTPIP1	proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 1	9051	7985099	NM_003978.3:1752
PTMA	prothymosin, alpha	5757	7954006	OTTHUMT000004001 36.1:189
PTMA	prothymosin, alpha	5757	7961022	NR_036466.1:476
RAB33B	RAB33B, member RAS oncogene fam.	83452	8097507	NM_031296.1:825
RENBP	renin binding protein	5973	8175933	NM_002910.5:480
RFC2	replication factor C (activator 1) 2, 40 kDa	5982	8140151	NM_181471.2:921
RNASEH1	ribonuclease H1	246243	8050079	NM_002936.4:1003
RNF146	ring finger protein 146	81847	8121927	NM_030963.2:510
RNF24	ring finger protein 24	11237	8064766	NM_007219.2:955
RNF26	ring finger protein 26	79102	7944510	NM_032015.3:2275
RPSA//SNO RA62	ribosomal protein SA//small nucleolar RNA, H/ACA box 62	3921//604 4	8078918	NM_002295.4:160
RPUSD2	RNA pseudouridylate synthase domain containing 2	27079	7982753	NM_152260.2:462
RRP12	ribosomal RNA processing 12 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	23223	7935425	NM_001145114.1:112
RXRA	retinoid x receptor, alpha	6256	8159127	NM_002957.5:3940
SCARB2	scavenger receptor class B, member 2	950	8101158	NM_005506.3:3015
SERBP1	SERPINE1 mRNA binding protein 1	26135	7916836	NM_001018068.1:4610
SFPQ//SFP Q	splicing factor proline/glutamine-rich (polypyrimidine tract binding protein associated)//splicing factor proline/glutamine-rich	6421//642 1	7914791	ENST00000357214.1:2 798
SLC25A32// DCAF13	solute carrier fam. 25, member 32//DDB1 and CUL4 associated factor 13	81034//25 879	8152255	NM_030780.4:1323
SLC35B3	solute carrier fam. 35, member B3	51000	8123825	NM_001142540.1:501

SLC37A4	solute carrier fam. 37 (glucose-6-phosphate transporter), member 4	2542	7952132	NM_001164277.1:1248
Continuação Tabela 13				
SLC5A6	solute carrier fam. 5 (sodium-dependent vitamin transporter), member 6	8884	8051030	NM_021095.2:548
SMPD4	sphingomyelin phosphodiesterase 4, neutral membrane (neutral sphingomyelinase-3)	55627	8055183	NM_017751.4:2258
SNHG1//SNORD26	small nucleolar RNA host gene 1 (non-protein coding)//small nucleolar RNA, C/D box 26	23642//9302	7948908	AK095849.1:268
SNHG12	small nucleolar RNA host gene 12 (non-protein coding)	85028	7914202	NR_024127.1:560
SNORA45	small nucleolar RNA, H/ACA box 45	677826	7938293	NR_002977.1:0
SNX27	sorting nexin fam. member 27	81609	7905444	NM_030918.5:1770
SPNS2//MYBBP1A	spinster homolog 2 (Drosophila)//MYB binding protein (P160) 1a	124976//10514	8011640	NM_014520.3:2644
SPRY2	sprouty homolog 2 (Drosophila)	10253	7972217	NM_005842.2:1481
SQLE	squalene epoxidase	6713	8148280	NM_003129.3:250
SREBF2	sterol regulatory element binding transcription factor 2	6721	8073522	NM_004599.3:3905
ST3GAL6	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6	10402	8081219	NM_001271148.1:1000
STK17B	serine/threonine kinase 17b	9262	8057887	NM_004226.3:821
TAPT1	transmembrane anterior posterior transformation 1	202018	8099506	NM_153365.2:1777
TAS2R5	taste receptor, type 2, member 5	54429	8136647	NM_018980.2:248
TBCEL	tubulin folding cofactor E-like	219899	7944623	NM_152715.3:1350
TCTN2	tectonic fam. member 2	79867	7959638	NM_001143850.2:75
TLR6	toll-like receptor 6	10333	8099841	NM_006068.4:261
TMEM150B	transmembrane protein 150B	284417	8039453	NM_001085488.2:723
TMEM55A	transmembrane protein 55A	55529	8151756	NM_018710.2:957
TMEM59	transmembrane protein 59	9528	7916372	NM_004872.3:316
TMEM97	transmembrane protein 97	27346	8005839	NM_014573.2:446
TNFRSF10C	tumor necrosis factor receptor superfam., member 10c, decoy without an intracellular domain	8794	8145244	GPS_8145244b.1:46
TOMM34	translocase of outer mitochondrial membrane 34	10953	8066461	NM_006809.4:1436
TOMM40	translocase of outer mitochondrial membrane 40	10452	8029521	NM_001128916.1:1584
TP53I3	tumor protein p53 inducible protein 3	9540	8050702	NM_001206802.2:16
TP53INP1	tumor protein p53 inducible nuclear protein 1	94241	8151890	NM_001135733.1:700
TWF2//TLR9	twinfilin, actin-binding protein, homolog 2 (Drosophila)//toll-like receptor 9	11344//54106	8087860	NM_007284.3:284
TXNRD1	thioredoxin reductase 1	7296	7958174	NM_001093771.2:1018
UFC1	ubiquitin-fold modifier conjugating enzyme 1	51506	7906662	NM_016406.3:911
USP10	ubiquitin specific peptidase 10	9100	7997633	NM_001272075.1:1660
VAMP3	vesicle-associated membrane protein 3 (cellubrevin)	9341	7897370	NM_004781.3:1875
VARS	valyl-tRNA synthetase	7407	8125091	NM_006295.2:680
VARS	valyl-tRNA synthetase	7407	8178609	BC12808.2:3946
VPS37A	vacuolar protein sorting 37 homolog A (S. cerevisiae)	137492	8144774	NM_152415.2:920
ZNF211	zinc finger protein 211	10520	8031792	NM_001265600.1:714

ZNF223	zinc finger protein 223	7766	8029360	NM_013361.4:690
ZNF561	zinc finger protein 561	93134	8033795	NM_152289.2:832
ZNF79	zinc finger protein 79	7633	8158022	NM_007135.2:101

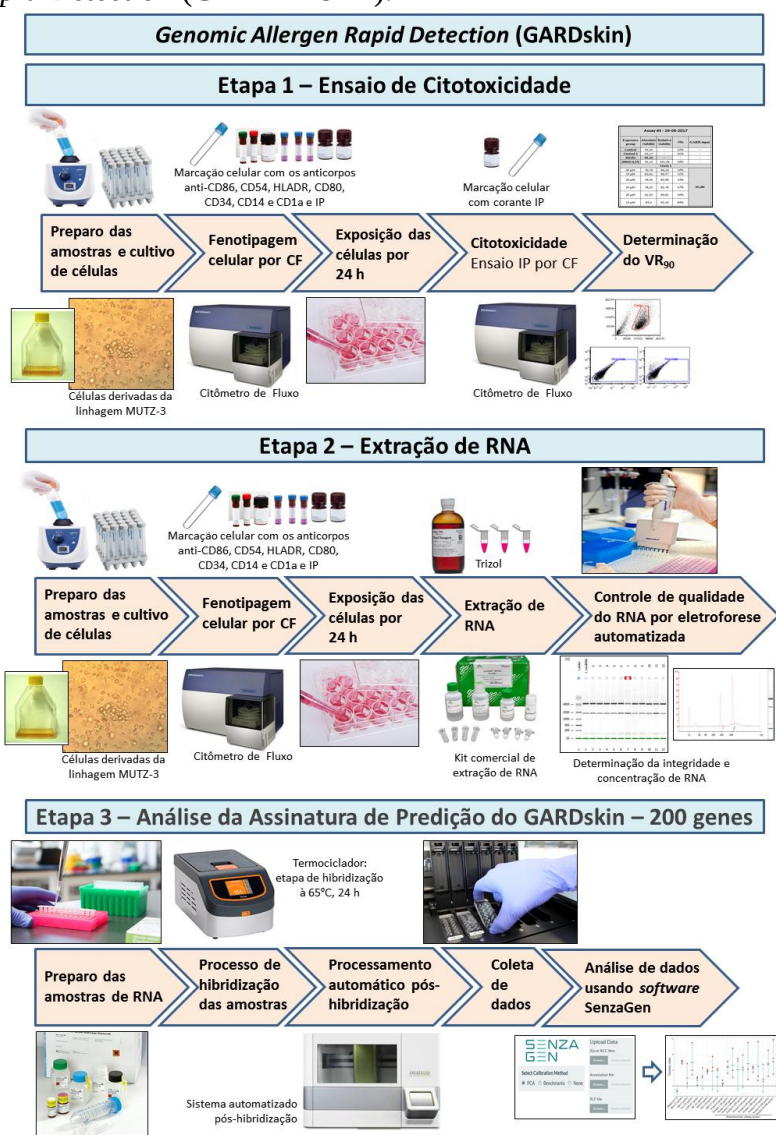
Continuação Tabela 13

-	-	-	7910385	ENST00000466086.1:182
-	-	-	7966223	ENST00000363404.1:5
-	-	-	7979694	ENST00000445822.1:110
-	-	-	8130495	ENST00000538672.1:63
-	-	-	8180237	b
-	-	-	8180268	b
-	-	-	8180417	b
-	-	-	7946567	b

^aIdentidade *Entrez gene* disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>.

^bBiomarcadores da assinatura de predição do GARD™ skin sem combinação com as identidades das *Nanostring probes* e incluídas no conjunto personalizado para avaliações no sistema nCounter.

Figura 21. Representação das etapas experimentais de condução do ensaio *Genomic Allergen Rapid Detection* (GARD™ skin).



Abreviação: CF - citometria de fluxo, IP - iodo de propídio, VR₉₀ - concentração do material-teste que promove 90% de viabilidade celular relativa.

Fonte: próprio autor.

5.8.4.1 Preparo das soluções-estoque dos materiais-teste

Os materiais-teste foram dissolvidos em água deionizada estéril ou DMSO, conforme os itens 5.7.1 e 5.8.1. Os materiais diluídos em DMSO foram, posteriormente, diluídos 100 vezes em meio de cultura semi-completo (sem GM-CSF), de tal modo que cada concentração fosse duas vezes maior àquela desejada no poço da placa de cultura. A concentração desejada foi posteriormente atingida ao misturar a solução-teste com a suspensão celular (1:1, v/v).

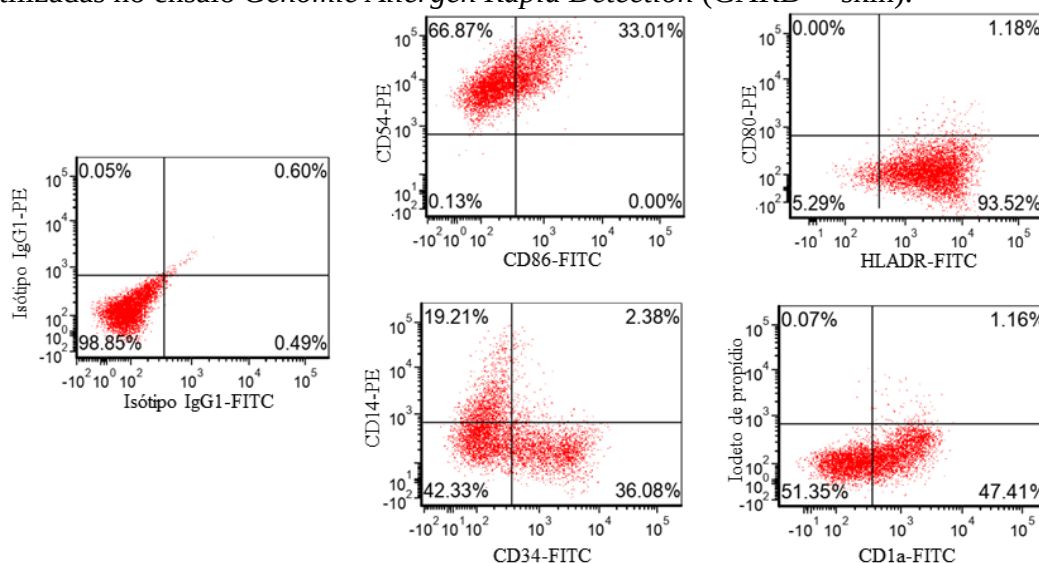
5.8.4.2 Análise fenotípica das células derivadas da linhagem MUTZ-3

As células foram cultivadas em meio de cultura contendo fator estimulante (GM-CSF). Para verificar a capacidade das células em se diferenciar, sob estímulo de GM-CSF, em um perfil similar ao apresentado por células dendríticas humanas, a análise fenotípica foi conduzida antes de realizar os ensaios. Assim, as células foram lavadas duas vezes com tampão fosfato contendo albumina de soro bovino (1%, p/v) e, posteriormente, incubadas com anticorpos contra os seguintes marcadores: CD1a, CD34, CD86, HLA-DR, CD14, CD54, CD80 e controles dos isótipos. A viabilidade celular também foi analisada utilizando iodeto de propídio (1 µg/mL). Quadro 3 mostra o volume de cada anticorpo e iodeto de propídio usados para um volume de reação de 50 µL de tampão. Após incubação de 15 min à 4°C, as células foram lavadas duas vezes com tampão e ressuspensas com 200 µL de tampão para análise em citômetro de fluxo. Figura 22 mostra um perfil fenotípico representativo das células utilizadas nesse estudo.

Quadro 3. Relação dos volumes de anticorpos e iodeto de propídio usados na análise fenotípica das células derivadas da linhagem mieloide para condução do ensaio *Genomic Allergen Rapid Detection* (GARDTM skin).

Nº do tubo	Anticorpo	Volume
1	Isótipo IgG1-FITC	2 µL
	Isótipo IgG1-PE	2 µL
2	CD86-FITC	2 µL
	CD54-PE	2 µL
3	HLADR-FITC	0,5 µL
	CD80-PE	1 µL
4	CD34-FITC	1 µL
	CD14-PE	1 µL
5	CD1a-FITC	1 µL
	Iodeto de propídio	1 µL

Figura 22. Fenotipagem representativa das células derivadas da linhagem mieloide utilizadas no ensaio *Genomic Allergen Rapid Detection* (GARD™ skin).



Fonte: próprio autor.

5.8.4.3 Análise de citotoxicidade

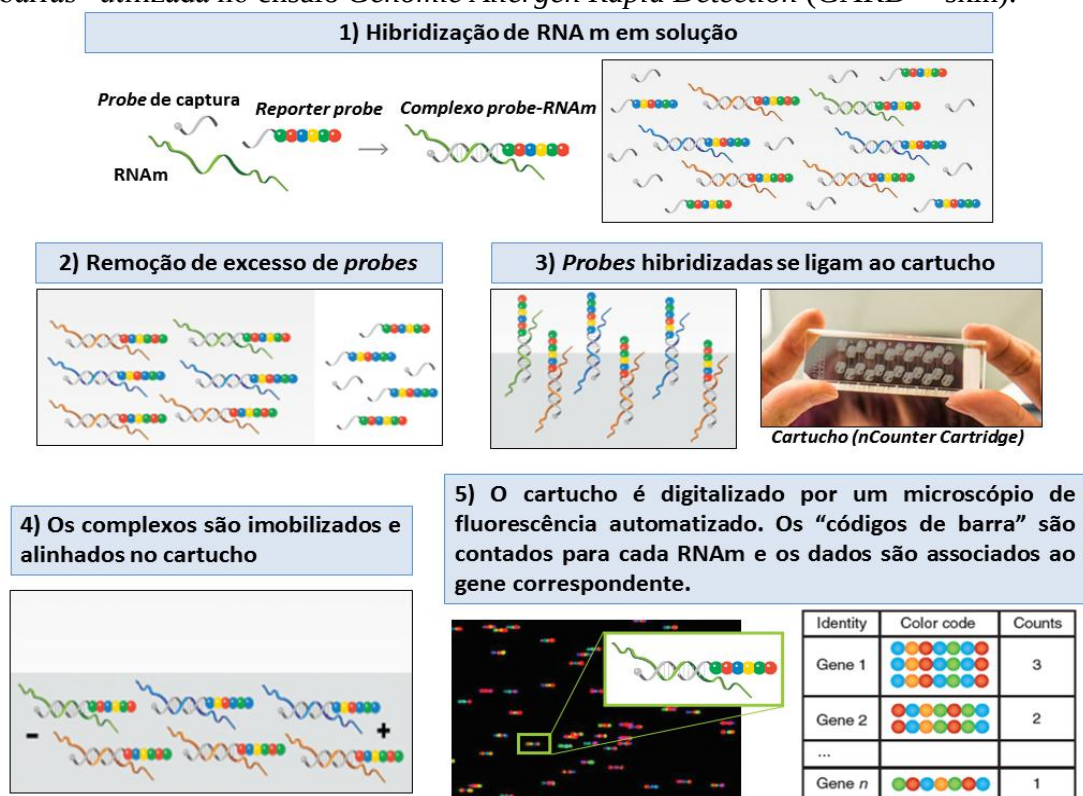
Após análise fenotípica, as células (2×10^5 células/mL) foram semeadas em placas de 24 poços e expostas a diferentes concentrações dos materiais-teste, veículos (água deionizada ou DMSO 0,1%) ou meio de cultura somente (células controle) por 24 h. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes com tampão fosfato contendo albumina (1%, p/v) e coradas com iodeto de propídio (1 μ g/mL) para análise em citômetro de fluxo para avaliar a viabilidade celular. A concentração do material-teste que promove 90% de viabilidade celular relativa (VR₉₀), quando comparado com as células controle, foi determinada para cada amostra.

5.8.4.4 Análise da assinatura gênica do GARD™ skin

A análise da expressão gênica foi realizada utilizando a plataforma digital de codificação de barras NanoString® nCounter. O princípio da técnica consiste no uso de “códigos de barras” moleculares e a geração de uma imagem microscópica de alta resolução, os quais permitem a contagem de diversas moléculas de RNA em uma única reação, ou seja, uma análise *multiplex*. Figura 23 ilustra as etapas para condução dessa análise. A primeira etapa do GARD™ skin se inicia com a adição à amostra de *probes* específicas (contendo uma sequência de pares de bases associado a “códigos de barras” moleculares fluorescentes) que irá se hibridizar com moléculas de RNA mensageiro (RNAm) em solução. Essas *probes* são denominadas de *reporters* (carregam um sinal), enquanto uma segunda *probe* (*probe* de captura), que

contém biotina, permite que o complexo *probe*/RNA seja imobilizado para a coleta de dados. A segunda etapa inclui a remoção do excesso de *probe*, seguido por alinhamento e imobilização dos complexos *probes*/RNAs. A imobilização ocorre dentro de um cartucho revestido com estreptavidina, o *nCounter Cartridge*, que se liga à biotina das *probes* de captura, permitindo assim o processo de contagem digital usando um microscópio de fluorescência automatizado.

Figura 23. Etapas para condução da análise *multiplex* no formato “códigos de barras” utilizada no ensaio *Genomic Allergen Rapid Detection* (GARD™ skin).



Fonte: adaptado da Nanostring Technologies
(https://www.nanostring.com/download_file/view/601/8213)

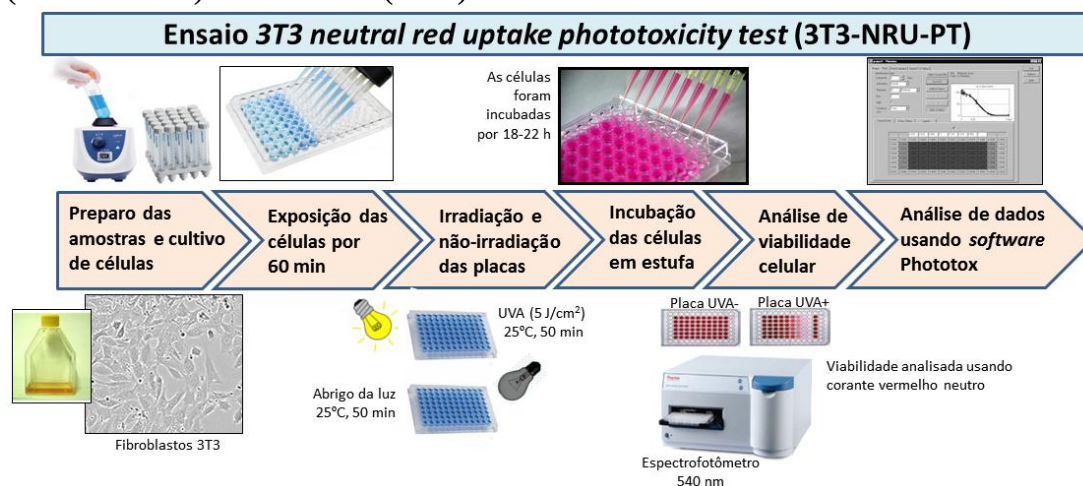
Primeiramente, as células (2×10^5 células/mL) foram semeadas em placas de 12 poços e expostas a VR₉₀ de cada material-teste durante 24 h. As células foram então lisadas com reagente Trizol (500 µL) e armazenadas a -20°C até a extração de RNA total, que foi realizada usando kit comercial (*Direct-zol™ RNA MiniPrep*, Zymo Research, Irvine, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A integridade e concentração de RNA em cada amostra foram determinadas por eletroforese automatizada utilizando o equipamento *Agilent Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), seguindo o protocolo fornecido pelo fornecedor.

Dessa forma, as amostras de RNA armazenadas à -80°C foram descongeladas em gelo e alíquotas de 7 µL foram preparadas à uma concentração de 20 ng/µL em água livre de RNase. Em seguida, 5 µL de solução de RNA de cada amostra foram misturados com 8 µL de mistura principal (tampão de hibridização + *Reporter CodeSet*[®]) e 2 µL de sistema de captura (*Capture ProbeSet*[®]), seguido de processo de hibridização usando um termociclador ³Prime (Bibby Scientific, Staffordshire, Reino Unido), à 65°C durante 24 h. Posteriormente, as amostras foram submetidas a processamento automatizado pós-hibridização usando o equipamento *GEN2 Prep Station 5s*. Nessa etapa, as amostras foram inseridas em cartuchos nCounter[®]. Após a conclusão do processamento pós-hibridização, os cartuchos foram selados com uma fita adesiva e transferidos para o equipamento *Digital Analyzer 5s* para coleta de dados usando resolução máxima. Os dados obtidos foram analisados usando o programa SenzaGen (versão 1.0) (Lund, Suécia, disponível em: <https://senzagen.shinyapps.io/GDAA/>), o qual também realizou o controle de qualidade da reação Nanostring[®] e normalização do dados por análise de componentes principais como método de calibração. Um material-teste foi classificado como sensibilizante dérmico quando o valor de saída mediano da máquina de vetores de suporte (do inglês, *support vector machine*, SVM) das três réplicas independentes foi superior a zero. As análises foram realizadas em três ensaios independentes utilizando diferentes lotes de células.

5.9 Ensaio de fototoxicidade

A avaliação do potencial fototóxico dos materiais-teste foi conduzida utilizando a metodologia descrita pelo guia OECD 432 – *3T3 neutral red uptake phototoxicity test* (3T3-NRU-PT) (OECD, 2004). Esse ensaio tem como princípio comparar a citotoxicidade de um material-teste em duas condições experimentais: na presença e na ausência de exposição à irradiação UVA. Figura 24 esquematiza os procedimentos experimentais para condução dessa técnica.

Figura 24. Etapas para condução do ensaio *3T3 neutral red uptake phototoxicity test* (3T3-NRU-PT) - OECD 432 (2004).



Fonte: próprio autor.

5.9.1 Preparo das soluções-estoque dos materiais-teste

Os materiais-teste (glifosato, surfactante POEA e formulações de agrotóxicos) foram dissolvidos em solução salina balanceada de Hank (SSBH) e testados em uma concentração máxima de 1000 µg/mL.

5.9.2 Exposição aos materiais-teste

Os fibroblastos 3T3 (1×10^5 células/mL) foram semeados em placas de 96 poços por um período de 24 h (7,5% CO₂, 37 °C, 90% de umidade). Em seguida, o meio de cultura foi removido, as células lavadas com 150 µL de SSBH e expostas aos materiais-testes por período de 60 min ao abrigo da luz (7,5% CO₂, 37 °C, 90% de umidade). Posteriormente, as células de cada material-teste foram incubadas por um período adicional de 50 min em contato com irradiação UVA (5 J/cm², a 25°C) ou ao abrigo da luz e em temperatura ambiente (25°C). Após essa etapa, o sobrenadante dos poços das placas foi removido seguido por lavagem com 150 µL de SSBH para remoção do material-teste residual. As células foram então incubadas com meio de cultura por um período de 18-22 h em estufa de cultura celular (7,5% CO₂, 37 °C, 90% de umidade).

No terceiro dia, as células foram lavadas com 150 µL de SSBH e 100 µL de meio de cultura livre de soro fetal bovino inativado contendo vermelho neutro (50 µg/mL) foram adicionados em cada poço. Após incubação de 3 h (7,5% CO₂, 37 °C, 90% de umidade), o sobrenadante foi removido, as células lavadas com 150 µL de SSBH e 150 µL de solução de extração de vermelho neutro (50% de etanol, 49% de

água deionizada e 1% de ácido acético) foram adicionados em cada poço. Após agitação automática, a absorbância de cada poço foi medida em espectrofotômetro a 540 nm. O programa *Phototox* (versão 2.0), disponibilizado pela OECD, foi usado para calcular o fator de fotoirritação (*photo-irritation-factor*, PIF) e o efeito foto médio (*mean photo effect*, MPE). Cada material-teste foi testado em três ensaios independentes e depois classificado de acordo com a Tabela 14.

Tabela 14. Modelo de predição do teste de fototoxicidade *in vitro* baseado na captação de vermelho neutro por células 3T3.

Valores de PIF ou MPE	Predição ^a
MPE < 0,1 ou PIF < 2	Não fototóxico
0,1 < MPE < 0,15 ou 2 < PIF < 5	Provavelmente fototóxico
MPE > 0,15 ou PIF > 5	Fototóxico

Abreviações: MPE - *mean photo effect*, PIF - *photo-irritation-factor*.

^aModelo de predição baseado no guia OECD 432 (SPIELMANN *et al.*, 1998; OECD, 2004).

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são expressos como média ou mediana $\pm$ desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes. A análise estatística foi realizada utilizando o programa Graph Pad Prism 5 (versão 5.0) para Windows 98 (San Diego, CA, EUA). A variação intergrupo foi medida por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunnett, respectivamente. Significância estatística foi estabelecida como $p < 0,05$.

6 PUBLICAÇÕES

Esse trabalho gerou três artigos de pesquisa experimental, relacionados ao desenvolvimento e/ou implementação de métodos *in vitro* e ao estabelecimento de uma estratégia integrada de testes de relevância humana. Como um desdobramento, também foram gerados dois artigos de revisão: um abordando o progresso da sociedade brasileira para a implementação de métodos alternativos à experimentação animal; e outro um levantamento de técnicas inovadoras de relevância humana, existentes até o momento, para avaliação de sensibilização e fotossensibilização dérmica sem o uso de animais de laboratório, em um contexto dentro da Toxicologia do Séc. XXI.

Artigo 1	<i>In vitro</i> assessment of skin sensitization, photosensitization and phototoxicity potential of commercial glyphosate-containing formulations
Autores	<u>Renato Ivan de Ávila</u> ¹ , Gabriel Campos Teixeira ¹ , Danillo Fabrini Maciel Costa Veloso ² , Larissa Cleres Moreira ¹ , Eliana Lima Martins ² , Marize Campos Valadares ¹ ¹ Laboratory of Teaching and Education of <i>In Vitro</i> Toxicology, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil. ² Laboratory of Pharmaceutical Technology - FarmaTec, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil. Publicado na Toxicology <i>In Vitro</i> : v. 45, p. 386-392, 2017. DOI: 10.1016/j.tiv.2017.04.001.

Artigo 2	Evaluation of <i>in vitro</i> testing strategies for hazard assessment of the skin sensitization potential of “real-life” mixtures: the case of henna-based hair coloring products containing <i>p</i> -phenylenediamine
Autores	<u>Renato Ivan de Ávila</u> ¹ , Danillo Fabrini Maciel Costa Veloso ² , Gabriel Campos Teixeira ¹ , Thaisângela Lopes Rodrigues ¹ , Tim Lindbergh ³ , Malin Lindstedt ³ , Simone Gonçalves Fonseca ⁴ , Eliana Martins Lima ² , Marize Campos Valadares ¹ ¹ Laboratory of Teaching and Education of <i>In Vitro</i> Toxicology, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil. ² Laboratory of Pharmaceutical Technology - FarmaTec, Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil. ³ Department of Immunotechnology, Medicon Village, Lund University, Lund, Sweden. ⁴ Institute of Tropical Pathology and Public Health, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil.

Artigo 3	Effects of hair dye ingredients on the oxidative stress response: modulation of the mRNA expressions of <i>NRF2</i> , <i>HO-1</i> and <i>FOS</i> in human HaCaT keratinocytes
Autores	<u>Renato Ivan de Ávila</u> , Thaisângela Lopes Rodrigues, Marize Campos Valadares ¹ Laboratory of Teaching and Education of <i>In Vitro</i> Toxicology, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, State of Goiás, Brazil.

Artigo 4	Brazilian society moves towards the introduction of laws, regulatory acceptance and implementation of innovative methods to replace animal experimentation
Autores	<u>Renato Ivan de Ávila</u> , Marize Campos Valadares Laboratory of Teaching and Education of <i>In Vitro</i> Toxicology, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, State of Goiás, Brazil.

Artigo 5	The 21st Century movement within the area of skin sensitization and photosensitization assessments: from the animal <i>in vivo</i> context towards current human <i>in vitro</i> testing practices
Autores	<u>Renato Ivan de Ávila</u> ¹ , Malin Lindstedt ² , Marize Campos Valadares ¹ ¹ Laboratory of Teaching and Education of <i>In Vitro</i> Toxicology, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, State of Goiás, Brazil. ² Department of Immunotechnology, Medicon Village, Lund University, Lund, Sweden.

7 CONCLUSÕES

O refinamento na técnica DPRA (OECD 442C/2015) foi realizado com dois propósitos: tornar essa técnica mais acessível do ponto de vista econômico com a redução dos custos das análises, e também alinhada aos princípios da Química Verde através da redução do uso de solventes orgânicos. Essas modificações permitiram a “miniaturização da técnica”, denominada mDPRA, a qual se mostrou com desempenho similar ao DPRA convencional na identificação de substâncias alergênicas e produtos acabados como formulações de agrotóxicos.

Além disso, foi estabelecido um segundo refinamento que originou o desenvolvimento de outra técnica, o photo-mDPRA, capaz de identificar fotoalérgenos de contato, o que não era possível pela técnica disponível de fototoxicidade já validada (3T3-NRU-PT – OECD 432/2004). Da mesma forma que o mDPRA, o photo-mDPRA também apresentou aplicabilidade para substâncias puras e misturas exemplificadas pelas formulações contendo glifosato e surfactantes.

Outro ponto desse trabalho foi o estabelecimento de uma plataforma multiparamétrica *in vitro* para avaliação da sensibilização dérmica de ingredientes de tintura capilar e suas misturas da “vida-real” (tinturas hennas). Além do mDPRA e análise de expressão gênica em queratinócitos HaCaT, foram implementados *in house* sete diferentes métodos inovadores. Quatro deles apresentaram superioridade frente aos tradicionais modelos em roedores na identificação de ingredientes cosméticos com potencial alergênico: DPRA/mDPRA, quantificação de IL-18 em queratinócitos humanos HaCaT, U-SENSTM e GARDTM skin. Cabe destacar que essas técnicas *in vitro* foram originalmente desenvolvidas utilizando apenas substâncias puras. Nesse trabalho, foi realizada a prova de conceito das técnicas na avaliação de misturas. Assim, a aplicabilidade dessa estratégia foi expandida pela avaliação de produtos naturais comerciais de tintura capilar contendo henna.

Como primeiro passo da avaliação das hennas, foram realizadas a análise de rótulo e a caracterização dessas misturas quanto à presença do potente alérgeno de contato PPD e do biomarcador da henna, o lawsone. Contrastando com o que foi declarado nos rótulos pelos fabricantes, todos os produtos continham PPD e um deles não apresentou teores detectáveis de lawsone. Portanto, deparou-se com duas problemáticas: adulteração e falsificação de produtos henna. Ademais, outra questão

surgiu na avaliação de sensibilização dérmica utilizando a abordagem integrada de testes *in vitro* estabelecida nesse trabalho: todos os dez produtos testados apresentaram potencial em promover dermatite de contato alérgica em humanos.

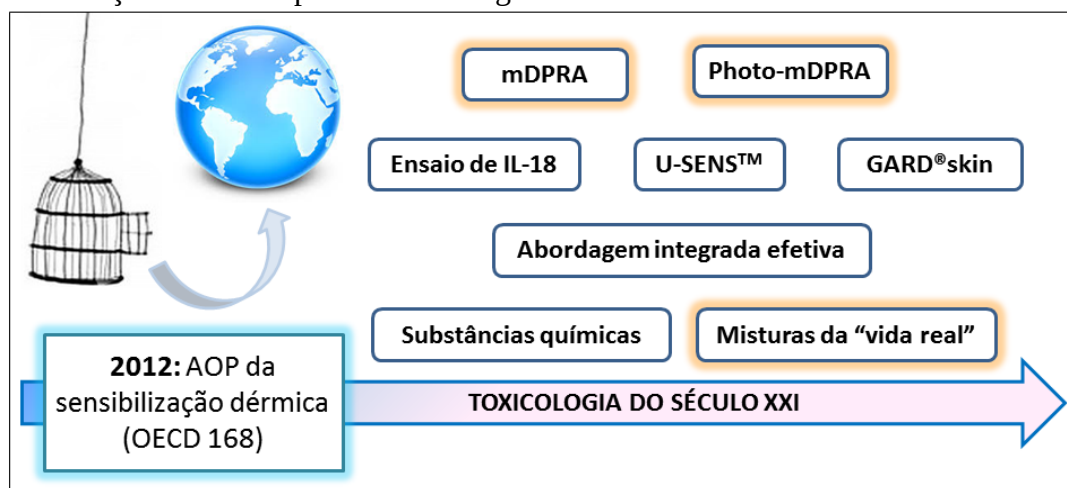
Em paralelo, os efeitos de ingredientes de tintura capilar, incluindo o PPD, na resposta celular ao estresse oxidativo foi também investigado utilizando a linhagem HaCaT como modelo experimental *in vitro* de queratinócitos humanos. Foi verificado que esses materiais podem promover uma modulação da resposta ao estresse oxidativo através da alteração da expressão de RNAm de *NRF2*, *HO1* e *FOS*. Assim, esses biomarcadores se mostram promissores no desenvolvimento de ensaios mecanísticos *in vitro* para avaliação de sensibilização dérmica de materiais cosméticos, por exemplo.

Assim, ressaltam-se as consequências toxicológicas do uso não declarado de PPD em produtos naturais à base de henna, bem como os riscos associados, que podem envolver a sensibilização de consumidores suscetíveis e casos de dermatite de contato alérgica em indivíduos previamente sensibilizados. Além disso, a avaliação de dano realizada aqui demonstrou que as respostas imunes a essas misturas são complexas em vista dos efeitos de potencialização entre henna, ingredientes sintéticos adicionados e seus derivados de reação formados durante o processo de tintura de cabelo.

8 PERSPECTIVAS

A sensibilização dérmica representa um parâmetro toxicológico mandatório para finalidades regulatórias que, historicamente, era avaliado usando principalmente modelos animais, como cobaias e camundongos. Hoje, grande desenvolvimento tem sido alcançado no desenvolvimento de métodos livres de animais de laboratório, principalmente após a descoberta mecanística da sensibilização dérmica, cuja AOP foi publicada em 2012 pela OECD. Um resumo dos principais achados deste trabalho, os quais acrescentam na literatura científica mundial na área de métodos inovadores substituíveis aos modelos animais, está representado na Figura 25.

Figura 25. Resumo dos principais achados deste trabalho no contexto da via do efeito adverso (*adverse outcome pathway*, AOP) da sensibilização dérmica: a contribuição do estudo para a Toxicologia do Século XXI.



Abreviações: AOP - *adverse outcome pathway*, GARDTM skin – *genomic allergen rapid detection*, IL – interleucina, mDPRA – *micro-direct peptide reactivity assay*, OECD - *Organisation for Economic Co-operation and Development*, photo-mDPRA – *photo-micro-direct peptide reactivity assay*, U-SENSTM - *U937 cell line activation test*.

Fonte: próprio autor.

Assim, diante da presença de tantas tecnologias na Toxicologia do Séc. XXI, acredita-se que estamos em uma nova etapa do desenvolvimento de abordagens *in vitro* de relevância humana para sensibilização dérmica: refinar, aprimorar as técnicas que até então têm se mostrado promissoras; estabelecer estratégias corretas de avaliação de dano e risco; e identificar os ensaios que possuem aplicabilidade para produtos acabados, misturas da “vida real”.

O presente estudo também trouxe avanços para a área de métodos inovadores substitutivos aos modelos animais de avaliação de sensibilização dérmica por propor um refinamento com impactos no custo da técnica DPRA; uma nova metodologia para avaliação de fotossensibilização, o photo-mDPRA; e uma plataforma multiparamétrica para avaliação de misturas. Assim, o mDPRA/photo-mDPRA e a abordagem de testes *in vitro* para sensibilização dérmica desenvolvidos aqui amplia o arsenal metodológico livre de animais, principalmente para a avaliação toxicológica de produtos acabados. Contudo, tais proposições necessitam de serem avaliadas utilizando um maior espaço amostral de materiais testados que incluam diferentes categorias químicas para conhecer o desempenho e domínio de aplicação das técnicas frente a diferentes misturas.

Outro aspecto é que a avaliação de fotossensibilização dérmica ainda necessita de avanços científicos para a consolidação das vias de evento adverso e desenvolvimento de métodos *in vitro*, uma vez que também é um parâmetro de avaliação de dano exigido por muitas agências regulatórias, incluindo a ANVISA. Nesse contexto, o photo-mDPRA se destaca numa perspectiva futura de validação do ensaio no Brasil pelo BrACVAM.

Ainda, um desdobramento de grande relevância desse trabalho foi o reconhecimento internacional da utilidade das técnicas mDPRA e photo-mDPRA para misturas da “vida real”, que culminou na premiação do autor da tese no “*The 2017 Lush Prize*” na categoria “*Young Researcher Americas*” (Figura 26). O prêmio recebido (£10.000, aproximadamente R\$ 43.000) foi gasto na aquisição de insumos laboratoriais para finalização dessa tese.

Também, esse trabalho tem contribuído na promoção da inovação e autonomia tecnológica do Brasil dentro da área da Toxicologia do Séc. XXI através do estabelecimento e desenvolvimento de abordagem e ferramentas *in vitro* para avaliação da sensibilização dérmica. Isso permitiu a qualificação do Laboratório de Pesquisa e Educação em Toxicologia *In Vitro* – Tox In em técnicas de avaliação do potencial alergênico de materiais. Como consequência, deu suporte ao grupo de pesquisa Tox In em ser pioneiro na área de sensibilização dérmica no País e responsável por atividades de extensão e treinamentos das técnicas inovadoras *in vitro* na Plataforma Regional de Métodos Alternativos ao Uso de Animais de Experimentação – PReMASUL/MCTIC. Assim, diferentes perfis de profissionais e estudantes, do Brasil e de outros países da América Latina, foram treinados em

métodos inovadores substitutivos aos tradicionais modelos animais: alunos de graduação e pós-graduação, pesquisadores, profissionais da indústria e da área regulatória. Como parte desse trabalho de treinamento técnico de alunos e profissionais, o grupo de pesquisa Tox In também foi reconhecido na edição de 2018 do “*The Lush Prize*”, na categoria “*Training*” (Figura 26).

Da mesma forma que a Ciência avança, mudanças regulatórias e legislativas também são necessárias. Assim, espera-se que esse trabalho também tenha impacto no estabelecimento de monitoramento de produtos cosméticos, por exemplo, a fim de garantir a qualidade dos mesmos e, consequentemente, a saúde do indivíduo. Além disso, a inovação do arcabouço legal brasileiro é importante com o intuito de viabilizar o progresso científico e a aceitação regulatória de métodos inovadores para avaliação de toxicidade de materiais como cosméticos, medicamentos, produtos agrícolas, entre outros.

Figura 26. Processo de internacionalização da pesquisa brasileira: alguns exemplos de chamadas de noticiários destacando o reconhecimento dos trabalhos obtidos durante o desenvolvimento dessa tese.



¹<https://www.ufg.br/n/101980-pesquisa-de-doutorando-da-ufg-e-destaque-em-premio-internacional>

²<https://www.jornalopcao.com.br/ultimas-noticias/goiano-ganha-premio-internacional-sobre-substituicao-de-animais-em-pesquisas-109773/>

³<https://www.opopular.com.br/noticias/cidades/pesquisa-da-faculdade-de-farm%C3%A1cia-da-ufg-faz-alerta-para-tinturas-1.1738275>

⁴<http://www.fapeg.go.gov.br/pesquisadores-da-ufg-recebem-premiacao-por-metodos-inovadores-em-toxicologia/>

⁵<https://www.opopular.com.br/editorias/cidades/grupo-da-ufg-vence-pr%C3%AAmio-em-berlim-1.1669707>

⁶<https://noticias.uol.com.br/ciencia/ultimas-noticias/redacao/2017/11/11/brasileiros-sao-premiados-por-pesquisas-que-substituem-animais-em-testes.htm>

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALÉPÉE, N.; PIROIRD, C.; AUJOULAT, M.; DREYFUSS, S.; HOFFMANN, S.; HOHENSTEIN, A.; MELONI, M.; NARDELLI, L.; GERBEIX, C.; COTOVIO, J. Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. **Toxicology In Vitro**, v. 30, n. 1, p. 373-382, 2015.

AMERIO, P.; MOTTA, A.; TOTO, P.; POUR, S. M.; PAJAND, R.; FELICIANI, C.; TULLI, A. Skint toxicity from glyphosate-surfactant formulation. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v. 42, n. 3, p. 317-319, 2004.

ANDERSON, S. E.; SIEGEL, P. D.; MEADE, B. J. The LLNA: a brief review of recent advances and limitations. **Journal of Allergy**, v. 2011, p. 1-11, 2011.

ANGERS-LOUSTAU, A.; TOSTI, L.; CASATI, S. The regulatory use of the local lymph node assay for the notification of new chemicals in Europe. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 60, n. 3, p. 300-307, 2011.

ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 14, de 28 de fevereiro de 2007**. Aprova o regulamento técnico para produtos saneantes com ação antimicrobiana harmonizado no âmbito do Mercosul através da Resolução GMC nº 50/06, que consta em anexo à presente Resolução. Brasília: Ministério da Saúde, [2007]. Disponível em: <https://cevs.rs.gov.br/upload/arquivos/201611/08140937-rdc-14-2007.pdf>. Acesso em: 01 set. 2018.

ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 35, de 16 de agosto de 2010**. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para produtos com ação antimicrobiana utilizados em artigos críticos e semicríticos. Brasília: Ministério da Saúde, [2010a]. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0035_16_08_2010.html. Acesso em: 01 set. 2018.

ANVISA. **Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 34, de 16 de agosto de 2010**. Dispõe sobre o regulamento técnico para produtos saneantes desinfestantes. Brasília, DF: Ministério da Saúde, [2010b]. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_34_2010.pdf/0259adb1-e660-467c-be79-b1e165fd9e71?version=1.0 . Acesso em: 01 set. 2018.

ANVISA. **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. Brasília: ANVISA, 2012. *E-book*. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/106351/107910/Guia+para+Avalia%C3%A7%C3%A3o+de+Seguran%C3%A7a+de+Produtos+Cosm%C3%A9ticos/ab0c660d-3a8c-4698-853a-096501c1dc7c>. Acesso em: 01 set. 2018.

ANVISA. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília, ANVISA, 2013a. *E-book*. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/351410/Guia%2Bde%2BEstudos%2BN%C3%A3o%2BCL%25C3%25ADnicos%2B->

%2Bvers%25C3%25A3o%2B2.pdf/0afb3f3b-7a32-4232-a7e2-de8ef460c9f7. Acesso em: 01 set. 2018.

ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 19, de 10 de abril de 2013.** Dispõe sobre os requisitos técnicos para a concessão de registro de produtos cosméticos repelentes de insetos e dá outras providências. Brasília, Ministério da Saúde, [2013b]. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_19_2013_.pdf/3b230914-a359-48c2-af0b-5ed7f2655446. Acesso em: 01 set. 2018.

ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 35, de 07 de agosto de 2015.** Dispõe sobre a aceitação dos métodos alternativos de experimentação animal e conhecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Brasília, Ministério da Saúde, [2015a]. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_35_2015_.pdf/e96e3d5d-0572-4e50-8b76-561223a23b80. Acesso em: 01 set. 2018.

ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 15, de 24 de abril de 2015.** Dispõe sobre os requisitos técnicos para a concessão de registro de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes infantis e dá outras providências. Brasília, Ministério da Saúde, [2015b]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/areas/coges/legislacao/2015/RDC_15_2015.pdf. Acesso em: 01 set. 2018.

ANVISA. **Consulta Pública nº 260, de 10 de outubro de 2016.** Dispõe sobre os critérios e exigências para avaliação toxicológica de agrotóxicos, componentes, afins e preservativos de madeira no âmbito da ANVISA. Brasília, Ministério da Saúde, [2016]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2858730/CONSULTA+P%C3%9ABLICA+N+260+GGTOX.pdf/662743b8-045b-46b6-bd1c-5a098ac66f4c?version=1.0>. Acesso em: 01 set. 2018.

API, A. M.; BASKETTER, D. A.; CADBY, P. A.; CANO, M.-F.; ELLIS, G.; GERBERICK, G. F.; GRIEM, P.; MCNAMEE, P. M.; RYAN, C. A.; SAFFORD, R. Dermal sensitization quantitative risk assessment (QRA) for fragrance ingredients. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 52, n. 1, p. 53-61, 2008.

ARANCIOGLU, S.; ULKER, O. C.; KARAKAYA, A. Utilization of the *ex vivo* LLNA: BrdU-ELISA to distinguish the sensitizers from irritants in respect of 3 end points - lymphocyte proliferation, ear swelling, and cytokine profiles. **International Journal of Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 24-30, 2015.

ASHIKAGA, T.; SAKAGUCHI, H.; SONO, S.; KOSAKA, N.; ISHIKAWA, M.; NUKADA, Y.; MIYAZAWA, M.; ITO, Y.; NISHIYAMA, N.; ITAGAKI, H. A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 38, n.4, p. 275-284, 2010.

ASHIKAGA, T.; YOSHIDA, Y.; HIROTA, M.; YONEYAMA, K.; ITAGAKI, H.; SAKAGUCHI, H.; MIYAZAWA, M.; ITO, Y.; SUZUKI, H.; TOYODA, H.

Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: the human cell line activation test (h-CLAT): I. Optimization of the h-CLAT protocol. **Toxicology in Vitro**, v. 20, n. 5, p. 767-773, 2006.

ÁVILA, R. I.; DE SOUSA VIEIRA, M.; GAETI, M. P. N.; MOREIRA, L. C.; DE BRITO RODRIGUES, L.; DE OLIVEIRA, G. A. R.; BATISTA, A. C.; VINHAL, D. C.; MENEGATTI, R.; VALADARES, M. C. Toxicity evaluation of the photoprotective compound LQFM048: eye irritation, skin toxicity and genotoxic endpoints. **Toxicology**, v. 376, n. 1, p. 83-93, 2017.

BASKETTER, D. A. The human repeated insult patch test in the 21st century: a commentary. **Cutaneous and Ocular Toxicology**, v. 28, n. 2, p. 49-53, 2009.

BASKETTER, D. A.; GERBERICK, G. F.; KIMBER, I. Measurement of allergenic potency using the local lymph node assay. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 6, p. 264-265, 2001.

BASKETTER, D. A.; YORK, M.; MCFADDEN, J. P.; ROBINSON, M. K. Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. **Contact Dermatitis**, v. 51, n. 1, p. 1-4, 2004.

BAUCH, C.; KOLLE, S. N.; FABIAN, E.; PACHEL, C.; RAMIREZ, T.; WIENCH, B.; WRUCK, C. J.; RAVENZWAAY, B. V.; LANDSIEDEL, R. Intralaboratory validation of four *in vitro* assays for the prediction of the skin sensitizing potential of chemicals. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 6, p. 1162-1168, 2011.

BAUCH, C.; KOLLE, S. N.; RAMIREZ, T.; ELTZE, T.; FABIAN, E.; MEHLING, A.; TEUBNER, W.; VAN RAVENZWAAY, B.; LANDSIEDEL, R. Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 63, n. 3, p. 489-504, 2012.

BELTRANI, V. S. Occupational dermatoses. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 3, n. 2, p. 115-123, 2003.

BRASIL. **Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989**. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Brasília, DF: Presidência da República, [1989]. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L7802.htm. Acesso em: 01 set. 2018.

BRASIL. **Portaria nº 03, de 16 de janeiro de 1992**. Ratificar os termos das "Diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins – nº 1, de 9 de dezembro de 1991", publicadas no Diário Oficial da União em 13 dez. 91. Brasília, DF: Ministério da Saúde, [1992]. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs1/1992/prt0003_16_01_1992.html. Acesso em: 01 set. 2018.

BRASIL. **Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002.** Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Brasília, DF: Ministério da Saúde, [2002]. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/D4074.htm. Acesso em: 01 set. 2018.

BRASIL. **Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008.** Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Brasília, DF: Presidência da República, [2008]. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm. Acesso em: 01 set. 2018.

BRASIL. Extrato de Acordo de Cooperação Técnica. **Diário Oficial da União**, seção 3, nº 13, p.122, 2012.

BRUNNER, M. J.; SMILJANIC, A. Procedure for evaluating skin-sensitizing power of new materials. **American Medical Association Archives of Dermatology and Syphilology**, v. 66, n. 6, p. 703-705, 1952.

BRUYNZEEL, D. P.; FERGUSON, J.; ANDERSEN, K.; GONÇALO, M.; ENGLISH, J.; GOOSSENS, A.; HOLZLE, E.; IBBOTSON, S. H.; LECHA, M.; LEHMANN, P.; LEONARD, F.; MOSELEY, H.; PIGATTO, P.; TANEW, A. Photopatch testing: a consensus methodology for Europe. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 18, n. 6, p. 679-682, 2004.

BUEHLER, E. V. Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. **Archives of Dermatology**, v. 91, n. 2, p. 171-175, 1965.

CALOGIURI, G.; DI LEO, E.; BUTANI, L.; PIZZIMENTI, S.; INCORVAIA, C.; MACCHIA, L.; NETTIS, E. Hypersensitivity reactions due to black henna tattoos and their components: are the clinical pictures related to the immune pathomechanism? **Clinical and Molecular Allergy**, v. 15, p. 1-6, 2017.

CASATI, S.; HOFFMANN, S.; STRICKLAND, J.; PARIS, M.; STOKES, W.; TICE, R.; MALERBA, I.; HARTUNG, T. **Analysis of the correlation between *in vitro* cytotoxicity data and acute toxic effects in humans.** Berlin, Germany, 2005. 5th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences.

CHIPINDA, I.; AJIBOLA, R. O.; MORAKINYO, M. K.; RUWONA, T. B.; SIMOYI, R. H.; SIEGEL, P. D. Rapid and simple kinetics screening assay for electrophilic dermal sensitizers using nitrobenzenethiol. **Chemical Research in Toxicology**, v. 23, n. 5, p. 918-925, 2010.

ČIHÁK, R. REACH – an overview. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 2, n. 2, p. 42-44, 2009.

CONNOR, D. S.; RITZ, H. L.; AMPULSKI, R. S.; KOWOLLIK, H. G.; LIM, P.; THOMAS, D. W.; PARKHURST, R. Identification of certain sultones as the sensitizers in an alkyl ethoxy sulfate. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 77, n. 1, p. 25-29, 1975.

CORSINI, E.; GALBIATI, V.; MITJANS, M.; GALLI, C. L.; MARINOVICH, M. NCTC 2544 and IL-18 production: a tool for the identification of contact allergens. **Toxicology In Vitro**, v. 27, n. 3, p. 1127-1134, 2013.

CORSINI, E.; ROGGEN, E. L. Immunotoxicology: opportunities for non-animal test development. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 37, n. 4, p. 387-397, 2009.

CROWLEY, L. C.; SCOTT, A. P.; MARFELL, B. J.; BOUGHABA, J. A.; CHOJNOWSKI, G.; WATERHOUSE, N. J. Measuring cell death by propidium iodide uptake and flow cytometry. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 7, p. 647-651, 2016.

DANIEL, A. B.; STRICKLAND, J.; ALLEN, D.; CASATI, S.; ZUANG, V.; BARROSO, J.; WHELAN, M.; RÉGIMBALD-KRNEL, M. J.; KOJIMA, H.; NISHIKAWA, A.; PARK, H.-K.; LEE, J. K.; KIM, T. S.; DELGADO, I.; RIOS, L.; YANG, Y.; WANG, G.; KLEINSTREUER, N. International regulatory requirements for skin sensitization testing. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 95, p. 52-65, 2018.

DE ÁVILA, R. I.; TEIXEIRA, G. C.; VELOSO, D. F. M. C.; MOREIRA, L. C.; LIMA, E. M.; VALADARES, M. C. *In vitro* assessment of skin sensitization, photosensitization and phototoxicity potential of commercial glyphosate-containing formulations. **Toxicology In Vitro**, v.45, n.3, p. 386-392, 2017.

DENUGA, D.; WOOLHISER, M. R.; GOLLAPUDI, B. B.; BOVERHOF, D. R. Differential gene expression responses distinguish contact and respiratory sensitizers and nonsensitizing irritants in the local lymph node assay. **Toxicological Sciences**, v. 126, n. 2, p. 413-425, 2012.

DE SILVA, O.; PEREZ, M. J.; PINEAU, N.; ROUGIER, A.; DOSSOU, K. G. Local lymph node assay: study of the *in vitro* proliferation and control of the specificity of the response by FACScan analysis. **Toxicology In Vitro**, v. 7, n. 4, p. 299-303, 1993.

DESCOTES, J. Identification of contact allergens: the mouse ear sensitization assay. **Journal of Toxicology: Cutaneous and Ocular Toxicology**, v. 7, n. 4, p. 263-272, 1988.

DESCOTES, J. **Immunotoxicology of drugs and chemicals: an experimental and clinical approach. Volume I: principles and methods of immunotoxicology.** Amsterdã: Elsevier, 2004. *E-book* (398 p.). ISBN 978-04-445-1093-8. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/bookseries/immunotoxicology-of-drugs-and-chemicals-an-experimental-and-clinical-approach>. Acesso em: 20 jul. 2017.

DIEPGEN, T. L.; OFENLOCH, R. F.; BRUZE, M.; BERTUCCIO, P.; CAZZANIGA, S.; COENRAADS, P.-J.; ELSNER, P.; GONCALO, M.; SVENSSON, Å.; NALDI, L. Prevalence of contact allergy in the general population in different European regions. **British Journal of Dermatology**, v. 174, n. 2, p. 319-329, 2016.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; HOLTZCLAW, W. D.; KENSLER, T. W. The role of keap1 in cellular protective responses. **Chemical Research in Toxicology**, v. 18, n. 12, p. 1779-1791, 2005.

DOS SANTOS, G. G.; REINDERS, J.; OUWEHAND, K.; RUSTEMEYER, T.; SCHEPER, R. J.; GIBBS, S. Progress on the development of human *in vitro* dendritic cell based assays for assessment of the sensitizing potential of a compound. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 236, n. 3, p. 372-382, 2009.

DOUSSOU, K.; SICARD, C.; KALOPISSIS, G.; REYMOND, D.; SCHAEFER, H. Guinea pig allergy test adapted to cosmetic ingredients. **Current Problems in Dermatology**, v. 14, p. 248-262, 1985.

DRAIZE, J. H. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 82, n. 3, p. 377-390, 1944.

DRAIZE, J. H. Appraisal of the safety of chemicals in foods, drugs and cosmetics (Estados Unidos). In: The Association of Food & Drug Officials of the United States (Estados Unidos). **Dermal toxicity**. [Austin, Texas]: Draize, J. H, 1959a.

DRAIZE, J. H. Appraisal of the safety of chemicals in food and cosmetics (Estados Unidos). In: The Association of Food & Drug Officials of the United States (Estados Unidos). **Intracutaneous sensitization test on guinea pig**. [Austin, Texas]: Draize, J. H, 1959b.

ECETOC. **Technical report No.87. Contact sensitisation: classification according to potency**. Brussels: The European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, 2003. *E-book* (33 p.). ISSN 0773-8072-87. Disponível em: <http://www.ecetoc.org/wp-content/uploads/2014/08/ECETOC-TR-087.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2017.

ECHA. **Guidance to Regulation (EC) No 1272/2008 on classification, labelling and packaging (CLP) of substances and mixtures, version 5.0**. Helsinki, 2017. *E-book* (647 p.). ISBN: 978-92-9020-050-5. Disponível em: https://echa.europa.eu/documents/10162/23036412/clp_en.pdf. Acesso em: 24 set. 2017.

ECVAM. **European Union Reference Laboratory for Alternatives Methods to Animal Testing. Direct peptide reactivity assay (DPRA) ECVAM validation study report**. Luxemburgo, 2012. Disponível em: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/files-dpra/DPRA%20Validation%20Study%20Report.pdf>. Acesso em: 01 dec. 2017.

ECVAM. **Human cell line activation test (h-CLAT) validation study report 2015.** Luxemburgo, 2015. Disponível em: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/news/news_docs/h-clat-validation-study-report. Acesso em: 01 dec. 2017.

EMTER, R.; ELLIS, G.; NATSCH, A. Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 245, n. 3, p. 281-290, 2010.

EMTER, R.; NATSCH, A. Dual regulation of skin sensitizer-induced HMOX1 expression by Bach1 and Nrf2: comparison to regulation of the AKR1C2-ARE element in the KeratinoSens cell line. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 288, n. 3, p. 281-288, 2015.

ESTADÃO. **Empresas cosméticas tentam impedir proibição de testes em animais no Rio de Janeiro.** São Paulo, 14 set. 2018. Disponível em: <https://emails.estadao.com.br/blogs/lindeza/empresas-cosmeticas-tentam-impedir-proibicao-de-testes-em-animais-no-rio-de-janeiro/>. Acesso em: 02 jan. 2019.

ESTADO DE MINAS GERAIS. **Lei nº 23.050, de 25 de julho de 2018.** Proíbe a utilização, no Estado, de animais para desenvolvimento, experimento e teste de perfumes e produtos cosméticos e de higiene pessoal e seus componentes. Minas Gerais: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, [2018]. Disponível em: <https://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=LEI&num=23050&comp=&ano=2018>. Acesso em: 31 ago. 2018.

ESTADO DE PERNAMBUCO. Meio ambiente acata projeto para proibir uso de animais em testes de cosméticos. **Diário Oficial do Estado de Pernambuco - Poder Legislativo:** ano XCV, n. 134, p. 4, 15 ago. 2018. Disponível em: [http://200.238.105.211/cadernos/2018/20180815/6-PoderLegislativo/PoderLegislativo\(20180815\).pdf](http://200.238.105.211/cadernos/2018/20180815/6-PoderLegislativo/PoderLegislativo(20180815).pdf). Acesso em: 01 set. 2018.

ESTADO DE SÃO PAULO. **Lei nº 15.316, de 23 de janeiro de 2014.** Proíbe a utilização de animais para desenvolvimento, experimento e teste de produtos cosméticos e de higiene pessoal, perfumes e seus componentes e dá outras providências. São Paulo: Assembleia Legislativa do Estado de São Paulo, [2014]. Disponível em: <https://www.al.sp.gov.br/repositorio/legislacao/lei/2014/lei-15316-23.01.2014.html>. Acesso em: 31 ago. 2018.

ESTADO DO AMAZONAS. **Lei nº 289, de 03 de dezembro de 2016.** Proíbe a utilização de animais para desenvolvimento, experimentos e testes de produtos cosméticos, de higiene pessoal, perfumes e seus componentes no Estado do Amazonas, e dá outras providências. Amazonas: Assembleia Legislativa do Estado do Amazonas, [2016]. Disponível em: <https://sapl.al.am.leg.br/norma/9412>. Acesso em: 31 ago. 2018.

ESTADO DO MATO GROSSO DO SUL. **Lei nº 4.538, de 03 de junho de 2014.** Proíbe a utilização de animais para desenvolvimento, experimento e teste de produtos cosméticos e de higiene pessoal, perfumes e seus componentes e dá outras

providências. Mato Grosso do Sul: Assembleia Legislativa do Estado do Mato Grosso do Sul, [2014]. Disponível em: <http://aacpdappls.net.ms.gov.br/appls/legislacao/secoge/govato.nsf/448b683bce4ca84704256c0b00651e9d/76a1b291c530658904257ced004a957c?OpenDocument>. Acesso em: 31 ago. 2018.

ESTADO DO PARÁ. **Lei nº 8.361, de 13 de maio de 2016.** Proíbe a utilização de animais para desenvolvimento, experimento e teste de produtos cosméticos e de higiene pessoal, perfumes e seus componentes. Pará: Assembleia Legislativa do Estado do Pará, [2016]. Disponível em: <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=320483>. Acesso em: 31 ago. 2018.

ESTADO DO PARANÁ. **Lei nº 18.668, de 23 de dezembro de 2015.** Proíbe a utilização de animais para desenvolvimento de experimentos e testes de produtos cosméticos, de higiene pessoal, perfumes, e seus componentes. Paraná: Assembleia Legislativa do Estado do Paraná, [2015]. Disponível em: <https://www.legislacao.pr.gov.br/legislacao/pesquisarAto.do?action=exibir&codAto=151117&indice=1&totalRegistros=3&dt=23.0.2019.9.57.58.350>. Acesso em: 31 ago. 2018.

ESTADO DO RIO DE JANEIRO. **Lei nº 7.814, de 15 de dezembro de 2017.** Proíbe a utilização de animais para desenvolvimento, experimentos e testes de produtos cosméticos, higiene pessoal, perfumes, limpeza e seus componentes, no âmbito do estado do rio de janeiro, sem prejuízo de proibições e sanções previstas em outros dispositivos legais: municipal, estadual ou federal, e dá outras providências. Rio de Janeiro: Assembleia Legislativa do Estado do Rio de Janeiro, [2017]. Disponível em: <http://alerjln1.alerj.rj.gov.br/CONTLEI.NSF/c8aa0900025feef6032564ec0060dfff/004d830341147e03832581fb005bfbf9?OpenDocument>. Acesso em: 31 ago. 2018.

EURL ECVAM. **EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing.** Luxemburgo, 2017. *E-book* (28 p.). ISBN: 978-92-79-67786-1. Disponível em: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC106410>. Acesso em: 24 set. 2018.

EUROPEAN UNION. **Regulation (EC) no. 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC.** Brussels: The European Parliament, [2006]. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R1907&from=EN>. Acesso em: 21 nov. 2018.

EUROPEAN UNION. **Regulation (EC) no. 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products.** Brussels: The European Parliament, [2009]. Disponível em:

https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/endocrine_disruptors/docs/cosmetic_1223_2009_regulation_en.pdf. Acesso em: 16 mar. 2016.

EZENDAM, J.; BRAAKHUIS, H. M.; VANDEBRIEL, R. J. State of the art in non-animal approaches for skin sensitization testing: from individual test methods towards testing strategies. **Archives of Toxicology**, v. 90, n. 12, p. 2861-2883, 2016.

EZENDAM, J.; MULLER, A.; HAKKERT, B. C.; VAN LOVEREN, H. Evaluation of the performance of the reduced local lymph node assay for skin sensitization testing. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 66, n. 1, p. 66-71, 2013.

FITZPATRICK, J. M.; ROBERTS, D. W.; PATLEWICZ, G. What determines skin sensitization potency: Myths, maybes and realities. The 500 molecular weight cut-off: An updated analysis. **Journal of Applied Toxicology**, v. 37, n. 1, p. 105-116, 2017.

FORRERYD, A.; ZELLER, K. S.; LINDBERG, T.; JOHANSSON, H.; LINDSTEDT, M. From genome-wide arrays to tailor-made biomarker readout – Progress towards routine analysis of skin sensitizing chemicals with GARD. **Toxicology in Vitro**, v. 37, p. 178-188, 2016.

FRANKILD, S.; VØLUND, A.; WAHLBERG, J.; ANDERSEN, K. E. Comparison of the sensitivities of the Buehler test and the guinea pig maximization test for predictive testing of contact allergy. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 80, n. 4, p. 256-262, 2000.

G1. No Brasil, 41% da população é contra testes com animais, revela pesquisa. São Paulo, 12 dez. 2014. Disponível em: <http://g1.globo.com/ciencia-e-saude/noticia/2014/12/no-brasil-41-da-populacao-e-contra-testes-com-animais-revela-pesquisa.html>. Acesso em: 21 nov. 2018.

GAD, S. C.; DUNN, B. J.; DOBBS, D. W.; REILLY, C.; WALSH, R. D. Development and validation of an alternative dermal sensitization test: The mouse ear swelling test (MEST). **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 84, n. 1, p. 93-114, 1986.

GERBERICK, G. F.; CRUSE, L. W.; RYAN, C. A.; HULETTE, B. C.; CHANEY, J. G.; SKINNER, R. A.; DEARMAN, R. J.; KIMBER, I. Use of a B cell marker (B220) to discriminate between allergens and irritants in the local lymph node assay. **Toxicology Sciences**, v. 68, n. 2, p. 420-428, 2002.

GERBERICK, G. F.; RYAN, C. A. A predictive mouse ear-swelling model for investigating topical photoallergy. **Food and Chemical Toxicology**, v. 28, n. 5, p. 361-368, 1990.

GERBERICK, G. F.; VASSALLO, J. D.; BAILEY, R. E.; CHANEY, J. G.; MORRALL, S. W.; LEPOITTEVIN, J.-P. Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. **Toxicology Science**, v. 81, n. 2, p. 332-343, 2004.

GERBERICK, G. F.; VASSALLO, J. D.; FOERTSCH, L. M.; PRICE, B. B.; CHANEY, J. G.; LEPOITTEVIN, J.-P. Quantification of chemical peptide reactivity

for screening contact allergens: a classification tree model approach. **Toxicology Science**, v. 97, n. 2, p. 417-427, 2007.

GIROTTI, A. W. Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 63, n. 1-3, p. 103-113, 2001.

GLEICHMANN, H. Studies on the mechanism of drug sensitization: T-cell-dependent popliteal lymph node reaction to diphenylhydantoin. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 18, n. 2, p. 203-211, 1981.

GOODWIN, B. F. J.; CREVEL, R. W. R.; JOHNSON, A. W. A comparison of three guinea-pig sensitization procedures for the detection of 19 reported human contact sensitizers. **Contact Dermatitis**, v. 7, n. 5, p. 248-258, 1981.

GRIFFITH, J. F. Predictive and diagnostic testing for contact sensitisation. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 3, p. 90-102, 1969.

GUERRA-TAPIA, A.; GONZALEZ-GUERRA, E. Hair cosmetics: dyes. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 105, n. 9, p. 833-839, 2014.

GUILLOT, J. P.; GONNET, J. F.; CLÉMENT, C.; FACCINI, J. M. Comparative study of methods chosen by the Association Française de Normalisation (AFNOR) for evaluating sensitizing potential in the Albino guinea-pig. **Food and Chemical Toxicology**, v. 21, n. 6, p. 795-805, 1983.

HARRISON, R. K. Phase II and phase III failures: 2013–2015. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 12, p. 817-818, 2016.

HARTUNG, T. Opinion versus evidence for the need to move away from animal testing. **Alternatives to Animal Experimentation**, v. 34, n.2, 193-200, 2017.

HASEMAN, J. K.; STRICKLAND, J.; ALLEN, D.; SALICRU, E.; PARIS, M.; TICE, R. R.; STOKES, W. S. Safety assessment of allergic contact dermatitis hazards: An analysis supporting reduced animal use for the murine local lymph node assay. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 59, n. 1, p. 191-196, 2011.

HAYES, B.; PATRICK, E.; MAIBACH, H. Dermatotoxicology. In: (Ed.). **Hayes' Principles and Methods of Toxicology**, Sixth Edition: CRC Press, 2014. p.1345-1384. ISBN 978-1-84214-536-4.

HINDSON, C.; DIFFEY, B. Phototoxicity of glyphosate in a weedkiller. **Contact Dermatitis**, v. 10, n. 1, p. 51-52, 1984.

HINO, R.; ORIMO, H.; KABASHIMA, K.; ATARASHI, K.; NAKANISHI, M.; KUMA, H.; TOKURA, Y. Evaluation of photoallergic potential of chemicals using THP-1 cells. **Journal of Dermatological Science**, v. 52, n. 2, p. 140-143, 2008.

HOFFMANN, S.; KLEINSTREUER, N.; ALÉPÉE, N.; ALLEN, D.; API, A. M.; ASHIKAGA, T.; CLOUET, E.; CLUZEL, M.; DESPREZ, B.; GELLATLY, N.;

GOEBEL, C.; KERN, P. S.; KLARIC, M.; KÜHNL, J.; LALKO, J. F.; MARTINOZZI-TEISSIER, S.; MEWES, K.; MIYAZAWA, M.; PARAKHIA, R.; VAN VLIET, E.; ZANG, Q.; PETERSOHN, D. Non-animal methods to predict skin sensitization (I): the Cosmetics Europe database. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 48, n. 5, p. 344-358, 2018.

HOLNESS, D. L. Workers with Occupational Contact Dermatitis: Work Outcomes and Return to Work Process in the First Six Months following Diagnosis. **Journal of Allergy**, v. 2011, p. 1-4, 2011.

HOMEY, B.; VON SCHILLING, C.; BLÜMEL, J.; SCHUPPE, H.-C.; RUZICKA, T.; AHR, H. J.; LEHMANN, P.; VOHR, H.-W. An Integrated Model for the Differentiation of Chemical-Induced Allergic and Irritant Skin Reactions. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 153, n. 1, p. 83-94, 1998.

ICCVAM. The murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds. The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NATIONAL INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL HEALTH SCIENCES, N. P. N.-. 1999.

IKARASHI, Y.; TSUCHIYA, T.; NAKAMURA, A. A sensitive mouse lymph node assay with two application phases for detection of contact allergens. **Archives of Toxicology**, v. 67, n. 9, p. 629-636, 1993.

INCQS. **Portaria INCQS/FIOCRUZ nº 29/2013**. Cria o Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativo (BraCVAM – Brazilian Center for Validation of Alternative Methods). Rio de Janeiro, RJ: Fundação Oswaldo Cruz, [2013].

JOHANSSON, H.; LINDSTEDT, M.; ALBREKT, A.-S.; BORREBAECK, C. A. K. A genomic biomarker signature can predict skin sensitizers using a cell-based in vitro alternative to animal tests. **BMC Genomics**, v. 12 n.399, p. 1-19, 2011.

JORDAN, W. P.; KING, S. E. The development of allergic contact dermatitis in females during the comparison of two predictive patch tests. **Contact Dermatitis**, v. 3, n. 1, p. 19-26, 1977.

JUNG, K.-M.; BAE, I.-H.; KIM, B.-H.; KIM, W.-K.; CHUNG, J.-H.; PARK, Y.-H.; LIM, K.-M. Comparison of flow cytometry and immunohistochemistry in non-radioisotopic murine lymph node assay using bromodeoxyuridine. **Toxicology Letters**, v. 192, n. 2, p. 229-237, 2010.

KAIDBEY, K. H.; KLIGMAN, A. M. Photomaximization test for identifying photoallergic contact sensitizers. **Contact Dermatitis**, v. 6, n. 3, p. 161-169, 1980.

KERR, A.; FERGUSON, J. Photoallergic contact dermatitis. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 26, n. 2, p. 56-65, 2010.

KIMBER, I.; BASKETTER, D. A.; GERBERICK, G. F.; DEARMAN, R. J. Allergic contact dermatitis. **International Immunopharmacology**, v. 2, n. 2, p. 201-211, 2002.

KIMBER, I.; DEARMAN, R. J.; BETTS, C. J.; GERBERICK, G. F.; RYAN, C. A.; KERN, P. S.; PATLEWICZ, G. Y.; BASKETTER, D. A. The local lymph node assay and skin sensitization: a cut-down screen to reduce animal requirements? **Contact Dermatitis**, v. 54, n. 4, p. 181-185, 2006.

KIMBER, I.; HILTON, J.; WEISENBERGER, C. The murine local lymph node assay for identification of contact allergens: a preliminary evaluation of in situ measurement of lymphocyte proliferation. **Contact Dermatitis**, v. 21, n. 4, p. 215-220, 1989.

KIMBER, I.; MAXWELL, G.; GILMOUR, N.; DEARMAN, R. J.; FRIEDMANN, P. S.; MARTIN, S. F. Allergic contact dermatitis: A commentary on the relationship between T lymphocytes and skin sensitising potency. **Toxicology**, v. 291, n. 1, p. 18-24, 2012.

KIMBER, I.; MITCHELL, J. A.; GRIFFIN, A. C. Development of a murine local lymph node assay for the determination of sensitizing potential. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, n. 6, p. 585-586, 1986.

KLECAK, G.; GELEICK, H.; FREY, J. Screening of fragrance materials for allergenicity in the guinea pig. I. Comparison of four testing methods. **Journal of the Society Cosmetic Chemists**, v. 28, p. 53-64, 1977.

KLEINSTREUER, N. C.; HOFFMANN, S.; ALÉPÉE, N.; ALLEN, D.; ASHIKAGA, T.; CASEY, W.; CLOUET, E.; CLUZEL, M.; DESPREZ, B.; GELLATLY, N.; GÖBEL, C.; KERN, P. S.; KLARIC, M.; KÜHN, J.; MARTINOZZI-TEISSIER, S.; MEWES, K.; MIYAZAWA, M.; STRICKLAND, J.; VAN VLIET, E.; ZANG, Q.; PETERSOHN, D. Non-animal methods to predict skin sensitization (II): an assessment of defined approaches. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 48, n. 5, p. 359-374, 2018.

KLIGMAN, A. M. The Identification of Contact Allergens by Human Assay: I. A Critique of Standard Methods. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 47, n. 5, p. 369-374, 1966.

KLIGMAN, A. M.; EPSTEIN, W. Updating the maximization test for identifying contact allergens. **Contact Dermatitis**, v. 1, n. 4, p. 231-239, 1975.

LANDSTEINER, K.; JACOBS, J. Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 61, n. 5, p. 643-656, 1935.

LAU, M. Y. Z.; BURGESS, J. A.; NIXON, R.; DHARMAGE, S. C.; MATHESON, M. C. A Review of the Impact of Occupational Contact Dermatitis on Quality of Life. **Journal of Allergy**, v. 2011, p.1-12, 2011.

LEIST, M.; HARTUNG, T. Inflammatory findings on species extrapolations: humans are definitely no 70-kg mice. **Archives of Toxicology**, v. 87, n. 4, p. 563-567, 2013.

LEIST, M.; HASIWA, N.; DANESHIAN, M.; HARTUNG, T. Validation and quality control of replacement alternatives – current status and future challenges. **Toxicology Research**, v. 1, p. 8-22, 2012.

LOVELESS, S. E.; API, A. M.; CREVEL, R. W. R.; DEBRUYNE, E.; GAMER, A.; JOWSEY, I. R.; KERN, P.; KIMBER, I.; LEA, L.; LLOYD, P.; MEHMOOD, Z.; STEILING, W.; VEENSTRA, G.; WOOLHISER, M.; HENNES, C. Potency values from the local lymph node assay: application to classification, labelling and risk assessment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 56, n. 1, p. 54-66, 2010.

LUEPKE, N. P.; KEMPER, F. H. The HET-CAM test: an alternative to the Draize eye test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, n. 6, p. 495-496, 1986.

MAGNUSSON, B.; KLIGMAN, A. M. The identification of contact allergens by animal assay. the guinea pig maximization test. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 52, n. 3, p. 268-276, 1969.

MAGUIRE, H. C. Induction of delayed hypersensitivity to nitrogen mustard in the guinea-pig. **British Journal of Dermatology**, v. 91, n. 1, p. 21-26, 1974.

MAGUIRE, H. C.; CHASE, M. W. Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. XIII. Sensitization of guinea pigs with picric acid. **Journal of Experiment Medicine**, v. 135, n. 2, p. 357-375, 1972.

MARTÍNEZ, V.; GALBIATI, V.; CORSINI, E.; MARTÍN-VENEGAS, R.; VINARDELL, M. P.; MITJANS, M. Establishment of an *in vitro* photoassay using THP-1 cells and IL-8 to discriminate photoirritants from photoallergens. **Toxicology In Vitro**, v. 27, n. 6, p. 1920-1927, 2013.

MARZULLI, F.; MAGUIRE, H. C. Usefulness and limitations of various guinea-pig test methods in detecting human skin sensitizers - Validation of guinea-pig tests for skin hypersensitivity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 20, n. 1, p. 67-74, 1982.

MARZULLI, F. N.; MAIBACH, H. I. Antimicrobials: experimental contact sensitization in man. **Journal of the Society Cosmetic Chemists**, v. 24, n. 7, p. 399-421, 1973.

MARZULLI, F. N.; MAIBACH, H.I. The use of graded concentrations in studying skin sensitizers: experimental contact sensitization in man. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 12, n. 2, p. 219-227, 1974.

MAURER, T.; ARTHUR, A.; BENTLEY, P. Test Methods for Contact Sensitization. In: BOLT, H. M.;HELLMAN, B., et al (Ed.). **Use of mechanistic information in risk assessment: proceedings of the 1993 EUROTOX congress meeting held in Uppsala, Sweden, June 30–July 3, 1993**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1994. p.71-76. ISBN 978-3-642-78640-2.

MAURER, T.; THOMANN, P.; WEIRICH, E. G.; HESS, R. **The optimization test in the guinea-pig. A method for the predictive evaluation of the contact allergenicity of chemicals.** Agents and Actions, v. 5, n. 2, p. 174-179, 1975.

MCTIC. **Portaria nº 491, de 03 de julho de 2012.** Institui a Rede Nacional de Métodos Alternativos - RENAMA e sua estrutura no âmbito do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI, que será supervisionada por um Conselho Diretor. Brasília, DF: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, [2012]. Disponível em: http://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/portarias/migracao/Portaria_MC_TI_n_491_de_03072012Portaria_MCTI_n_491_de_03072012.html. Acesso em: 01 set. 2018.

MCTIC. **Resolução Normativa nº 17, de 03 de julho de 2014.** Brasília, DF: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, [2014]. Dispõe sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil e dá outras providências. Disponível em: https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-17-de-03.07.2014-D.O.U.-de-04.07.2014-Secao-I-Pag.-51.pdf. Acesso em: 01 set. 2018.

MCTIC. **Resolução Normativa nº 31, de 18 de agosto de 2016.** Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. Brasília, DF: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, [2016]. Disponível em: http://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-31-de-18.08.2016-D.O.U.-de-19.08.2016-Secao-I-Pag.-04.pdf. Acesso em: 01 set. 2018.

MCTIC. **Resolução Normativa nº 38, de 17 de abril de 2018.** Dispõe sobre restrições ao uso de animais em ensino, em complemento à Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica – DBCA. Brasília, DF: Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações, [2018]. Disponível em: https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/Resolucao_Normativa_CONCEA_n_38_de_17042018.html. Acesso em: 01 set. 2018.

MEIGS, L.; SMIRNOVA, L.; ROVIDA, C.; LEIST, M.; HARTUNG, T. Animal testing and its alternatives - the most important omics is economics. **Alternatives to Animal Experimentation**, v. 35, n. 3, p. 275-305, 2018.

MILLER, J. M. Assessment of the ability of mice fed on vitamin A supplemented diet to respond to a variety of potential contact sensitizers. **Contact Dermatitis**, v. 15, n. 1, p. 17-23, 1986.

MINISTÉRIO DO TRABALHO. **Ministério do Meio Ambiente disponibiliza anteprojeto de lei sobre substâncias químicas industriais.** 04 jul. 2016. Disponível em: <http://www.fundacentro.gov.br/noticias/detalhe-da-noticia/2016/7/ministerio-do-meio-ambiente-disponibiliza-o-anteprojeto-de-lei-sobre-substancias-quimicas>. Acesso em: 21 nov. 2018.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Anteprojeto sobre químicos em debate**. 17 out. 2018. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/informma/item/15161-anteprojeto-sobre-qu%C3%ADmicos-em-debate.html>. Acesso em: 21 nov. 2018.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, 1983.

NATSCH, A. The Nrf2-Keap1-ARE toxicity pathway as a cellular sensor for skin sensitizers—functional relevance and a hypothesis on innate reactions to skin sensitizers. **Toxicological Sciences**, v. 113, n. 2, p. 284-292, 2010.

NATSCH, A.; RYAN, C. A.; FOERTSCH, L.; EMTER, R.; JAWORSKA, J.; GERBERICK, F.; KERN, P. A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, n. 11, p. 1337-1352, 2013.

NELSON, J. L.; MOWAD, C. M. Allergic contact dermatitis: patch testing beyond the TRUE test. **The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v. 3, n. 10, p. 36-41, 2010.

NEUMANN, N. J.; BLOTZ, A.; WASINSKA-KEMPKA, G.; ROSENBRUCH, M.; LEHMANN, P.; AHR, H. J.; VOHR, H.-W. Evaluation of phototoxic and photoallergic potentials of 13 compounds by different *in vitro* and *in vivo* methods. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 79, n. 1, p. 25-34, 2005.

NICHOLSON, P. J.; LLEWELLYN, D.; ENGLISH, J. S. Evidence-based guidelines for the prevention, identification and management of occupational contact dermatitis and urticaria. **Contact Dermatitis**, v. 63, n. 4, p. 177-186, 2010.

NRC. **Toxicity testing in the 21st Century: a vision and a strategy**. Washington: The National Academies Press, 2007. *E-book* (216 p.). ISBN 978-0-309-15173-3. Disponível em: <https://www.nap.edu/catalog/11970/toxicity-testing-in-the-21st-century-a-vision-and-a>. Acesso em: 07 nov. 2018.

NUERNBER MILITARY TRIBUNALS. **Trials of war criminals before the Nuernberg Military Tribunals under Control Council Law No. 10 – Volume II**. Nuernberg: U.S. Government Printing Office, 1949. *E-book* (905 p.). Disponível em: https://www.loc.gov/rr/frd/Military_Law/NTs_war-criminals.html. Acesso em: 22 dez. 2018.

OECD. **Test no. 406: skin sensitisation**. Paris: OECD Publishing, 1992. *E-book* (9 p.). ISBN 9789264070660. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264070660-en>. Acesso em: 31 dez. 2016.

OECD. **Test no. 432: *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test**. Paris: OECD Publishing, 2004. *E-book* (15 p.). ISBN 9789264071162. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264071162-en>. Acesso em: 15 mar. 2016.

OECD. **Series on testing and assessment number 34 - Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment.** Paris: OECD Publishing, 2005. *E-book* (96 p.). Disponível em: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>. Acesso em: 10 out. 2018.

OECD. **Test no. 429: Skin Sensitisation – local lymph node assay.** Paris: OECD Publishing, 2010a. *E-book* (20 p.). ISBN 9789264071100. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264071100-en>. Acesso em: 15 mar. 2016.

OECD. **Test no. 442A: skin sensitization: local lymph node assay: DA.** Paris: OECD Publishing, 2010b. *E-book* (20 p.). ISBN 9789264090972. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264090972-en>. Acesso em: 15 mar. 2016.

OECD. **Test no. 442B: skin sensitization: local lymph node assay: BrdU-ELISA.** Paris: OECD Publishing, 2010c. *E-book* (15 p.). Disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/suppdocs/feddocs/oecd/oecd-tg442b.pdf>. Acesso em: 19 nov. 2018.

OECD. **Test no. 442B: skin sensitization: local lymph node assay: BrdU-ELISA or -FCM.** Paris: OECD Publishing, 2018a. *E-book* (15 p.). ISBN 9789264090996. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264090996-en>. Acesso em: 19 nov. 2018.

OECD. **The adverse outcome pathway for skin sensitisation initiated by covalent binding to proteins. Series on testing and assessment, no. 168.** Paris: OECD Publishing, 2014. *E-book* (105 p.). ISBN 9789264221444. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264221444-en>. Acesso em: 03 sep. 2014.

OECD. **Test no. 442C - In chemico skin sensitisation: direct peptide reactivity assay (DPRA).** Paris: OECD Publishing, 2015a. *E-book* (19 p.). ISBN 9789264229709. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264229709-en>. Acesso em: 05 fev. 2015.

OECD. **Test no. 442D: in vitro skin sensitisation. ARE-Nrf2 luciferase test method.** Paris: OECD Publishing, 2015b. *E-book* (20 p.). Disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/suppdocs/feddocs/oecd/oecd-tg442d-508.pdf>. Acesso em: 27 jun. 2018.

OECD. **Test no. 442D: in vitro skin sensitisation. ARE-Nrf2 luciferase test method.** Paris: OECD Publishing, 2018. *E-book* (20 p.). ISBN 9789264229822. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264229822-en>. Acesso em: 27 jun. 2018.

OECD. **Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay.** Paris: OECD Publishing, 2016. Disponível em: https://www.oecd.org/env/ehs/testing/160405-validation-report_REV.pdf. Acesso em: 20 mar. 2017.

OECD. **Guidance document for describing non-guideline *in vitro* test methods. Series on testing and assessment, no. 211.** Paris: OECD Publishing, 2017a. *E-book* (17 p.). ISBN 9789264274730. Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/9789264274730-en>. Acesso em: 13 apr. 2017.

OECD. **Guidance document on the reporting of defined approaches and individual information sources to be used within integrated approaches to testing and assessment (IATA) for skin sensitisation. Series on testing & assessment no. 256.** Paris: OECD Publishing, 2017b. *E-book* (311 p.). ISBN 9789264279285. Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/9789264279285-en>. Acesso em: 11 jul. 2017.

OECD. **Guidance document on the reporting of defined approaches to be used within integrated approaches to testing and assessment. OECD Series on testing and assessment, no. 255.** Paris: OECD Publishing, 2017c. *E-book* (23 p.). ISBN 9789264274822. Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/9789264274822-en>. Acesso em: 13 apr. 2017.

OECD. **Test no. 442E: *in vitro* skin sensitisation assays addressing the key event on activation of dendritic cells on the adverse outcome pathway for skin sensitisation.** Paris: OECD Publishing, 2018c. *E-book* (21 p.). ISBN 9789264264359. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264264359-en>. Acesso em: 27 jun. 2018.

OEDA, S.; HIROTA, M.; NISHIDA, H.; ASHIKAGA, T.; SASA, H.; AIBA, S.; TOKURA, Y.; KOUZUKI, H. Development of an *in vitro* photosensitization test based on changes of cell-surface thiols and amines as biomarkers: the photo-SH/NH₂ test. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 41, n. 1, p. 129-142, 2016.

ONOUE, S.; SETO, Y.; SATO, H.; NISHIDA, H.; HIROTA, M.; ASHIKAGA, T.; API, A. M.; BASKETTER, D.; TOKURA, Y. Chemical photoallergy: photobiochemical mechanisms, classification, and risk assessments. **Journal of Dermatological Science**, v. 85, n. 1, p. 4-11, 2017.

PATLEWICZ, G.; CASATI, S.; BASKETTER, D. A.; ASTURIOL, D.; ROBERTS, D. W.; LEPOITTEVIN, J. P.; WORTH, A. P.; ASCHBERGER, K. Can currently available non-animal methods detect pre and pro-haptens relevant for skin sensitization? **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 82, p. 147-155, 2016.

PIROIRD, C.; OVIGNE, J.-M.; ROUSSET, F.; MARTINOZZI-TEISSIER, S.; GOMES, C.; COTOVIO, J.; ALÉPÉE, N. The myeloid U937 skin sensitization test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. **Toxicology In Vitro**, v. 29, n. 5, p. 901-916, 2015.

PORTO ALEGRE. **Lei nº 11.955, de 23 de novembro de 2015.** Proíbe a utilização de animais para desenvolvimento, experimentos e testes de produtos cosméticos e de produtos de higiene pessoal, bem como de seus componentes, no município de porto alegre e dá outras providências. Porto Alegre: Prefeitura Municipal de Porto Alegre, [2015]. Disponível em: <https://leismunicipais.com.br/a1/rs/p/porto-alegre/lei-ordinaria/2015/1196/11955/lei-ordinaria-n-11955-2015-proibe-a-utilizacao-de>

animais-para-desenvolvimento-experimentos-e-testes-de-produtos-cosmeticos-e-de-produtos-de-higiene-pessoal-bem-como-de-seus-componentes-no-municipio-de-porto-alegre-e-da-outras-providencias?q=11.955. Acesso em: 31 ago. 2018.

RAMIREZ, T.; MEHLING, A.; KOLLE, S. N.; WRUCK, C. J.; TEUBNER, W.; ELTZE, T.; AUMANN, A.; URBISCH, D.; VAN RAVENZWAAY, B.; LANDSIEDEL, R. LuSens: a keratinocyte based ARE reporter gene assay for use in integrated testing strategies for skin sensitization hazard identification. **Toxicology In Vitro**, v. 28, n. 8, p. 1482-1497, 2014.

REUTER, H.; SPIEKER, J.; GERLACH, S.; ENGELS, U.; PAPE, W.; KOLBE, L.; SCHMUCKER, R.; WENCK, H.; DIEMBECK, W.; WITTERN, K.-P.; REISINGER, K.; SCHEPKY, A. G. *In vitro* detection of contact allergens: development of an optimized protocol using human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. **Toxicology In Vitro**, v. 25, n. 1, p. 315-323, 2011.

ROBERTS, D. W.; API, A. M.; APTULA, A. O. Chemical applicability domain of the Local Lymph Node Assay (LLNA) for skin sensitisation potency. Part 2. The biological variability of the murine local lymph node assay (LLNA) for skin sensitisation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 80, p. 255-259, 2016.

ROBERTS, D. W.; API, A. M.; PATLEWICZ, G.; SCHULTZ, T. W. Chemical applicability domain of the local lymph node assay (LLNA) for skin sensitization potency. Part 1. Underlying physical organic chemistry principles and the extent to which they are represented in the LLNA validation dataset. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 80, p. 247-254, 2016.

ROBERTS, D. W.; MEKENYAN, O. G.; DIMITROV, S. D.; DIMITROVA, G. D. What determines skin sensitization potency—myths, maybes and realities. Part 1. The 500 molecular weight cut-off. **Contact Dermatitis**, v. 68, n. 1, p. 32-41, 2013.

ROBERTS, D. W.; SCHULTZ, T. W.; API, A. M. Chemical applicability domain of the local lymph node assay (LLNA) for skin sensitisation potency. Part 3. Apparent discrepancies between LLNA and GPMT sensitisation potential: false positives or differences in sensitivity? **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 80, n. Supplement C, p. 260-267, 2016.

ROVIDA, C.; RYAN, C.; CINELLI, S.; BASKETTER, D.; DEARMAN, R.; KIMBER, I. The local lymph node assay (LLNA). **Current Protocols in Toxicology**, v. 51, n. Supplement. 51, p. 20.7.1-20.7.14, 2012.

SATO, Y.; KATSUMURA, Y.; ICHIKAWA, H.; KOBAYASHI, T.; KOZUKA, T.; MORIKAWA, F.; OHTA, S. A modified technique of guinea pig testing to identify delayed hypersensitivity allergens. **Contact Dermatitis**, v. 7, n. 5, p. 225-237, 1981.

SATO, Y.; KATSUMURA, Y.; ICHIKAWA, H.; KOBAYASHI, T.; NAKAJIMA, K. Development of contact photosensitization test in guinea pigs (adjuvant-strip method). **Nishi Nihon Hifuka**, v. 42, n. 5, p. 831-837, 1980.

SCCNFP. **Scientific committee on cosmetic products and non-food products. SCCNFP/0120/99, Final: Opinion concerning the predictive testing of potentially cutaneous sensitising cosmetic ingredients or mixtures of ingredients, adopted by the SCCNFP during the 11th plenary session of 17 February 2000.** Brussels: Health and Food Safety Scientific Committees, 2000. Disponível em: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/opinions/sccnfp_opinions_97_04/sccp_out102_en.htm. Acesso em: 24 nov. 2017.

SCCP. **Memorandum classification and categorization of skin sensitisers and grading of test reactions. Adopted by the SCCP during the 5th plenary meeting of 20 September 2005.** União Europeia: Health & Consumer Protection Directorate-General, [2005]. Disponível em: https://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_s_01.pdf. Acesso em: 19 ago. 2016.

SCHOLES, E. W.; BASKETTER, D. A.; LOVELL, W. W.; SARLL, A. E.; PENDLINGTON, R. U. The identification of photoallergic potential in the local lymph node assay. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 8, n. 6, p. 249-254, 1991.

SCHÜMANN, J.; BOUDON, S.; ULRICH, P.; LOLL, N.; GARCIA, D.; SCHAFFNER, R.; STREICH, J.; KITTEL, B.; BAUER, D. Integrated preclinical photosafety testing strategy for systemically applied pharmaceuticals. **Toxicological Sciences**, v. 139, n. 1, p. 245-256, 2014.

SCHWARTZ, L.; PECK, S. M. The patch test in contact dermatitis. **Public Health Reports**, v. 59, p. 546-557, 1944.

SENADO FEDERAL. **Projeto de Lei da Câmara nº 70, de 2014.** Altera dispositivos dos arts. 14, 17 e 18 da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, para dispor sobre a vedação da utilização de animais em atividades de ensino, pesquisas e testes laboratoriais com substâncias para o desenvolvimento de produtos de uso cosmético em humanos e aumentar os valores de multa nos casos de violação de seus dispositivos. Brasília, DF: Câmara dos Deputados, [2014]. Disponível em: <https://www25.senado.leg.br/web/atividade/materias/-/materia/118217/pdf>. Acesso em: 01 set. 2018.

SHARP, D. W. The sensitization potential of some perfume ingredients tested using a modified Draize procedure. **Toxicology**, v. 9, n. 3, p. 261-271, 1978.

SHELANSKI, H. A.; SHELANSKI, M. V. A new technique of human patch tests. **Proceedings of the Scientific Section of the Toilet Goods Association**, v. 19, p. 46-49, 1953.

SIKORSKI, E. E.; GERBERICK, G. F.; RYAN, C. A.; MILLER, C. M.; RIDDER, G. M. Phenotypic analysis of lymphocyte subpopulations in lymph nodes draining the ear following exposure to contact allergens and irritants. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 25-35, 1996.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.

SPIELMANN, H.; BALLS, M.; DUPUIS, J.; PAPE, W. J.; PECHOVITCH, G.; DE SILVA, O.; HOLZHÜTTER, H. G.; CLOTHIER, R.; DESOLLE, P.; GERBERICK, F.; LIEBSCH, M.; LOVELL, W. W.; MAURER, T.; PFANNENBECKER, U.; POTTHAST, J. M.; CSATO, M.; SLADOWSKI, D.; STEILING, W.; BRANTOM, P. The international EU/COLIPA *in vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial). Part 1: The 3T3 NRU phototoxicity test. **Toxicology In Vitro**, v. 12, n. 3, p. 305-327, 1998.

SPIELMANN, H.; GRUNE, B.; LIEBSCH, M.; SEILER, A.; VOGEL, R. Successful validation of *in vitro* methods in toxicology by ZEBET, the National Centre for Alternatives in Germany at the BfR (Federal Institute for Risk Assessment). **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 60, n. 2, p. 225-233, 2008.

STEVENS, M. A. Use of the albino guinea-pig to detect the skin-sensitizing ability of chemicals. **British Journal of Industrial Medicine**, v. 24, n. 3, p. 189-202, 1967.

STRAUSS, V.; KOLLE, S. N.; HONARVAR, N.; DAMMANN, M.; GROETERS, S.; FAULHAMMER, F.; LANDSIEDEL, R.; VAN RAVENZWAAY, B. Immunophenotyping does not improve predictivity of the local lymph node assay in mice. **Journal of Applied Toxicology**, v. 35, n. 4, p. 434-445, 2015.

STRICKLAND, J.; ZANG, Q.; KLEINSTREUER, N.; PARIS, M.; LEHMANN, D. M.; CHOKSI, N.; MATHESON, J.; JACOBS, A.; LOWIT, A.; ALLEN, D.; CASEY, W. Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. **Journal of Applied Toxicology**, v. 36, n. 9, p. 1150-1162, 2016.

SUPREMO TRIBUNAL FEDERAL. **Questionadas leis do RJ e AM que proíbem teste com animais para indústria cosmética**. Brasília, 12 set. 2018. Disponível em: <http://www.stf.jus.br/portal/cms/verNoticiaDetalhe.asp?idConteudo=389491>. Acesso em: 02 jan. 2019.

TAKAHASHI, T.; KIMURA, Y.; SAITO, R.; NAKAJIMA, Y.; OHMIYA, Y.; YAMASAKI, K.; AIBA, S. An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. **Toxicological Sciences**, v. 124, n. 2, p. 359-369, 2011.

TAKENOUCHI, O.; FUKUI, S.; OKAMOTO, K.; KUROTANI, S.; IMAI, N.; FUJISHIRO, M.; KYOTANI, D.; KATO, Y.; KASAHARA, T.; FUJITA, M.; TOYODA, A.; SEKIYA, D.; WATANABE, S.; SETO, H.; HIROTA, M.; ASHIKAGA, T.; MIYAZAWA, M. Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. **Journal of Applied Toxicology**, v. 35, n. 11, p. 1318-1332, 2015.

TAKENOUCHI, O.; MIYAZAWA, M.; SAITO, K.; ASHIKAGA, T.; SAKAGUCHI, H. Predictive performance of the human cell line activation test (h-CLAT) for lipophilic chemicals with high octanol-water partition coefficients. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 38, n. 4, p. 599-609, 2013.

TAYLOR, K.; GORDON, N.; LANGLEY, G.; HIGGINS, W. Estimates for worldwide laboratory animal use in 2005. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 36, n. 3, p. 327-342, 2008.

THORNE, P. S.; HAWK, C.; KALISZEWSKI, S. D.; GUINEY, P. D. The noninvasive mouse ear swelling assay: I. Refinements for detecting weak contact sensitizers. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 17, n. 4, p. 790-806, 1991.

TOKURA, Y. Immune responses to photohaptens: implications for the mechanisms of photosensitivity to exogenous agents. **Journal of Dermatological Science**, v. 23, p. S6-S9, 2000.

TOKURA, Y. Photoallergy. **Expert Review of Dermatology**, v. 4, n. 3, p. 263-270, 2009.

TRAUB, E. F.; TUSING, T. W.; SPOOR, H. J. Evaluating of dermal sensitivity: animal and human tests compared. **American Medical Association Archives of Dermatology and Syphilology**, v. 69, n. 4, p. 399-409, 1954.

TSUCHIYA, S.; KONDO, M.; OKAMOTO, K.; TAKASE, Y. The cumulative contact enhancement test. **Current Problems in Dermatology**, v. 14, p. 208-219, 1985.

TSUCHIYAMA, H.; MAEDA, A.; NAKAJIMA, M.; KITSUKAWA, M.; TAKAHASHI, K.; MIYOSHI, T.; MUTSUGA, M.; ASAOKA, Y.; MIYAMOTO, Y.; OSHIDA, K. Gene expression profiles in auricle skin as a possible additional endpoint for determination of sensitizers: a multi-endpoint evaluation of the local lymph node assay. **Toxicology Letters**, v. 280, n. Supplement C, p. 133-141, 2017.

ULKER, O. C.; ATAK, A.; ATES, I.; KARAKAYA, A. Evaluation of auricular lymph node cell lymphocyte proliferation and cytokine production as non-radioactive endpoints during murine contact allergy. **Journal of Immunotoxicology**, v. 8, n. 2, p. 131-139, 2011.

ULRICH, P.; HOMEY, B.; VOHR, H.-W. A modified murine local lymph node assay for the differentiation of contact photoallergy from phototoxicity by analysis of cytokine expression in skin-draining lymph node cells. **Toxicology**, v. 125, n. 2, p. 149-168, 1998.

UNITED NATIONS. **Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)**. Nações Unidas: New York & Geneva, 2017. *E-book* (534 p.) ISBN 978-92-1-117131-0. Disponível em: https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/07files_e0.html. Acesso em: 13 out. 2017.

VAN DER VEEN, J. W.; PRONK, T. E.; VAN LOVEREN, H.; EZENDAM, J. Applicability of a keratinocyte gene signature to predict skin sensitizing potential. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 1, p. 314-322, 2013.

VOHR, H.-W. **Guinea Pig Assays for Sensitization Testing**. In: VOHR, H.-W. (Ed.). Encyclopedia of Immunotoxicology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2005. p.1-4. ISBN 978-3-642-27786-3.

VOSS, J. G. Skin Sensitization by mercaptans of low molecular weight¹¹ from the Research Division, Miami Valley Laboratories, The Procter & Gamble Company, Cincinnati, Ohio. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 31, n. 5, p. 273-279, 1958.

WAKABAYASHI, N.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; HOLTZCLAW, W. D.; KANG, M.-I.; KOBAYASHI, A.; YAMAMOTO, M.; KENSLER, T. W.; TALALAY, P. Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: Fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 7, p. 2040-2045, 2004.

WILHELMUS, K. R. The Draize Eye Test. **Survey of Ophthalmology**, v. 45, n. 6, p. 493-515, 2001.

YAMASHITA, K.; SHINODA, S.; HAGIWARA, S.; ITAGAKI, H. Development of LLNA:DAE: a new local lymph node assay that includes the elicitation phase, discriminates borderline-positive chemicals, and is useful for cross-sensitization testing. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 39, n. 1, p. 147-161, 2014.

YAMASHITA, K. SHINODA, S., HAGIWARA, S. ITAGAKI, H. Further development of LLNA:DAE method as stand-alone skin-sensitization testing method and applied for evaluation of relative skin-sensitizing potency between chemicals. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 40, n. 2, p. 137-150, 2015.

YATIM, K. M.; LAKKIS, F. G. A Brief journey through the immune system. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, n. 7, p. 1274, 2015.

ZHANG, H.; SHI, Y.; WANG, C.; ZHAO, K.; ZHANG, S.; WEI, L.; DONG, L.; GU, W.; XU, Y.; RUAN, H.; ZHI, H.; YANG, X. An improvement of LLNA:DA to assess the skin sensitization potential of chemicals. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 42, n. 2, p. 129-136, 2017.

ZIEGLER, V. Der tierexperimentelle nachweis allergener eigenschaften von industrieprodukten. **Dermatologische Monatsschrift**, v. 163, p. 387-391, 1977.

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética

	UFG - UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
Título da Pesquisa: Abordagens integradas de avaliação do potencial alergênico de ingredientes cosméticos usando testes livres de animais de laboratório		
Pesquisador: Marize campos Valadares		
Área Temática:		
Versão: 2		
CAAE: 70563617.0.0000.5083		
Instituição Proponente: Faculdade de Farmácia Universidade Federal de Goiás		
Patrocinador Principal: FINANCIADORA DE ESTUDOS E PROJETOS - FINEP Capes Coordenação Aperf Pessoal Nivel Superior		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 2.324.753		
Apresentação do Projeto:		
Esse projeto propõe desenvolver uma plataforma livre de ensaios com animais de laboratório para avaliação do potencial de alergenicidade de ingredientes de cosméticos. A plataforma consistirá no uso de ensaios in vitro relacionados aos eventos moleculares e celulares do processo alérgico, entre eles: 1) ensaio de reatividade de proteínas (Direct Peptide Reactivity Assay, DPRA), 2) análise da produção de interleucina-18 em células HaCaT, e 3) análise da expressão da proteína CD86 em células U937 e células dendríticas derivadas de monócitos de sangue periférico humano. Para realização do ensaio envolvendo células dendríticas derivadas de monócitos de sangue periférico humano (único ensaio desse projeto que envolve participação de voluntários humanos), cerca de 10 indivíduos serão aleatoriamente selecionados e, voluntariamente, doarão uma amostra de sangue de cerca de 100 mL para realização do ensaio. Os critérios de inclusão são os seguintes: indivíduos saudáveis, do gênero masculino, com idade entre 18-40 anos. Os participantes a serem selecionados serão alunos da Universidade Federal de Goiás. A coleta de sangue e realização dos ensaios será realizada na Faculdade de Farmácia da mesma Instituição.		
Objetivo da Pesquisa:		
avaliar a aplicabilidade de uma plataforma de ensaios livres de animais de laboratório para investigação do potencial alergênico de ingredientes cosméticos.		
Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131		
Bairro: Campus Samambaia CEP: 74.001-970		
UF: GO Município: GOIANIA		
Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1163 E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com		



Continuação do Parecer: 2.324.753

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Pesquisa de baixo risco, no entanto os riscos foram considerados, bem como os procedimentos para sua minimização.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante e atual, com bom embasamento teórico, desenho metodológico adequado para responder aos objetivos propostos, clareza quanto a população de estudo e procedimentos de coleta e análise de dados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentou TCLE, Termo de compromisso assinado pela equipe de pesquisadores, protocolo da Plataforma Brasil, folha de rosto assinada pelo pesquisador principal e responsável pela unidade proponente.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O protocolo de pesquisa contemplou os requisitos exigidos pelas normas e procedimentos éticos previstos na Resolução de nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, sendo assim aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa/CEP-UFG considera o presente protocolo APROVADO, o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar ao CEP-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Resolução CNS n. 466/12. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_952374.pdf	04/09/2017 03:33:09		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	04/09/2017 03:25:59	Marize campos Valadares	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Modelo_TCLE.pdf	04/09/2017 03:25:36	Marize campos Valadares	Aceito
Recurso Anexado	Carta_Recurso_CEP.pdf	04/09/2017	Marize campos	Aceito

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131

Bairro: Campus Samambaia

CEP: 74.001-970

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3521-1215

Fax: (62)3521-1163

E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com



UFG - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE GOIÁS



Continuação do Parecer: 2.324.753

pelo Pesquisador	Carta_Recurso_CEP.pdf	03:25:18	Valadares	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_Compromisso_CEP.pdf	29/06/2017 09:22:46	Marize campos Valadares	Aceito
Outros	Justificativa_para_dispenza_do_TALE.pdf	29/06/2017 09:22:08	Marize campos Valadares	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	29/06/2017 09:20:30	Marize campos Valadares	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	29/06/2017 09:18:42	Marize campos Valadares	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

GOIANIA, 10 de Outubro de 2017

Assinado por:
João Batista de Souza
(Coordenador)

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131

Bairro: Campus Samambaia

CEP: 74.001-970

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3521-1215

Fax: (62)3521-1163

E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com

Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
Profa. Dra. Marize Campos Valadares



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa intitulada “**Abordagens integradas de avaliação do potencial alergênico de ingredientes cosméticos usando testes livres de animais de laboratório**”. Meu nome é Marize Campos Valadares, pesquisadora responsável desse projeto e minha área de atuação é Ciências da Saúde. Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, se você aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está impresso em duas vias, sendo que uma delas é sua e a outra pertence aos pesquisadores responsáveis. Esclareço que em caso de recusa na participação você não será penalizado(a) de forma alguma. Mas se aceitar participar, as dúvidas sobre a pesquisa poderão ser esclarecidas via e-mail (marizeufg@gmail.com) e, inclusive, sob a forma de ligação a cobrar, através do seguinte contato telefônico: (62) 98117-3040. Ao persistirem as dúvidas sobre os seus direitos como participante desta pesquisa, você também poderá fazer contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, pelo telefone (62) 3521-1215.

1. Informações Importantes sobre a Pesquisa:

Título do projeto:

Abordagens integradas de avaliação do potencial alergênico de ingredientes cosméticos usando testes livres de animais de laboratório

- 1.1 Esse projeto visa estabelecer uma série de ensaios para a avaliação do potencial alergênico de produtos cosméticos. Atualmente, os ensaios aceitos para fins de regulação utilizam animais. O uso de animais para testes com cosméticos tem se tornado insustentável, dado ao desenvolvimento atual da Ciência, questões éticas, políticas e de segurança humana. Além disso, testes em animais não refletem com exatidão ao que realmente ocorre no organismo humano. Assim, nesse projeto, células de sangue humano (chamadas de monócitos) serão utilizadas para avaliação confirmatória da capacidade de um produto cosmético em causar ou não alergias.
- 1.2 Para obtenção dos monócitos, será coletada uma amostra de sangue através de punção endovenosa de um dos braços do participante. Para minimizar os riscos da coleta de sangue (desconforto, dor e formação de manchas roxas no local da coleta), essa será realizada por profissional farmacêutico/biomédico habilitado. Também para minimizar tais riscos, o profissional utilizará dispositivo escalpe e, posteriormente, acoplará tubos a vácuo de 10 mL contendo anticoagulante para coleta de sangue. Serão utilizados cerca de 10 tubos, totalizando em um volume de sangue coletado de aproximadamente 100 mL por participante. A partir do sangue coletado, serão isolados os monócitos para realização dos ensaios para analisar o potencial de alergenicidade de produtos cosméticos.

Esclarecimentos sobre as garantias do sujeito da pesquisa:

- 1.3 Você terá a garantia de, a qualquer tempo, receber informações sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive sobre o esclarecimento de qualquer dúvida.
- 1.4 A participação é voluntária, sem pagamento pela sua doação de sangue, que acontecerá em apenas uma única vez. Também não será fornecido pagamento de alimentação ou transporte público. A recusa em participar da pesquisa de nenhuma forma colocará em risco seus direitos e deveres como cidadão e aluno da UFG.
- 1.5 Os seus dados (nome e CPF) permanecerão sob sigilo, sendo que você e todos os outros participantes não serão identificados em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.
- 1.6 Uma cópia deste termo de consentimento será mantida pelos pesquisadores responsáveis e uma cópia será dada a você.
- 1.7 Em caso de detectarmos algum problema em sua amostra de sangue doada, você será informado sobre esse achado bem como as consequências clínicas que isso possa lhe causar. Além disso, você será encaminhado, caso concorde, a uma unidade de saúde pública para devido acompanhamento médico.

5ª Avenida c/ Rua 240 s/n, Praça Universitária, 74605-170, Goiânia, Goiás, Brasil. Tel. : (62) 3209 6039.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
Profa. Dra. Marize Campos Valadares



- 1.8 Os seguintes eventuais riscos podem ocorrer com a pesquisa: riscos da coleta de sangue, os quais incluem desconforto, dor e formação de manchas roxas no local da coleta. Em virtude do surgimento de tais danos, você terá assistência imediata e/ou integral e será encaminhado, caso concorde, a uma unidade de saúde pública para devido acompanhamento médico. Além disso, você terá direito à cobertura material para reparação de quaisquer danos causados pela pesquisa.
- 1.9 Seu sangue será utilizado exclusivamente para os fins aos quais se destinam esse presente projeto, conforme declarado nos itens 1.1 e 1.2 desse documento.

Desde já agradeço sua compreensão e ressalto que a sua participação é muito importante!



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Eu,, inscrito(a) sob o CPF, abaixo assinado, concordo em participar do estudo intitulado **“Abordagens integradas de avaliação do potencial alergênico de ingredientes cosméticos usando testes livres de animais de laboratório”**. Informo ter mais de 18 anos de idade, e destaco que minha participação nesta pesquisa é de caráter voluntário. Fui, ainda, devidamente informado(a) e esclarecido(a), pelo pesquisador responsável, Marize Campos Valadares, sobre a pesquisa, os procedimentos e métodos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação no estudo. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade. Declaro, portanto, que concordo com a minha participação no projeto de pesquisa acima descrito.

Goiânia, de de

Assinatura por extenso do(a) participante

Marize Campos Valadares

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Eu,, inscrito(a) sob o CPF, abaixo assinado, concordo em participar do estudo intitulado **“Abordagens integradas de avaliação do potencial alergênico de ingredientes cosméticos usando testes livres de animais de laboratório”**. Informo ter mais de 18 anos de idade, e destaco que minha participação nesta pesquisa é de caráter voluntário. Fui, ainda, devidamente informado(a) e esclarecido(a), pelo pesquisador responsável, Marize Campos Valadares, sobre a pesquisa, os procedimentos e métodos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação no estudo. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade. Declaro, portanto, que concordo com a minha participação no projeto de pesquisa acima descrito.

Goiânia, de de

Assinatura por extenso do(a) participante

Marize Campos Valadares