

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JENIFFER ARAÚJO VIANA LARANJEIRA

**O uso de métodos alternativos à experimentação animal no desenvolvimento
de produtos cosméticos**

CURITIBA

2015

JENIFFER ARAÚJO VIANA LARANJEIRA

O uso de métodos alternativos à experimentação animal no desenvolvimento de produtos cosméticos

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito para a obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.^a Dra. Carolina Camargo de Oliveira

Coorientadora: Prof.^a Dra. Camila Miranda de Carvalho

CURITIBA

2015

RESUMO

Produtos cosméticos, apesar de pouco relacionados a riscos de saúde, podem causar efeitos adversos aos usuários, uma vez que seu uso é cumulativo e uma pessoa utiliza mais de um produto cosmético por dia ao longo da vida. Sendo assim, todo produto cosmético deve passar por avaliações de toxicidade antes de ser utilizado. A segurança dos produtos cosméticos é normalmente avaliada através da análise dos efeitos *in vivo* e *in vitro* de componentes da sua fórmula, quando esse ainda não foi descrito na literatura. No final da década de 60 a preocupação com a utilização de animais na experimentação ganhou força após a publicação de um trabalho que introduziu a teoria dos 3 R's: *reduce*, *refine* e *replace*, isso é, reduzir o número de animais em experimentos, refinar as técnicas para causar menos sofrimento e finalmente, substituir o uso de animais em testes por métodos alternativos, como *in vitro* e *in silico*. No Brasil, o tema ganhou força em 2008, quando foi aprovada a Lei Arouca que estabeleceu uma série de regras no que diz respeito a ensaios com animais. Após, foi criado o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), que estabeleceu em 2014 na Resolução Normativa nº 17/2014, 17 métodos alternativos que devem ser implantados nos laboratórios de todo o país em 5 anos. O objetivo desse trabalho foi descrever os métodos alternativos preconizados pelo CONCEA para avaliação de produtos cosméticos no âmbito da exposição dérmica, baseados nas diretrizes da Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD). A partir do levantamento realizado verificou-se que houve o desenvolvimento de várias metodologias substitutivas aos testes em animais nos últimos anos, e mesmo nas técnicas *in vivo* que ainda não permitiram substituição, o refinamento para diminuir o sofrimento dos animais é ressaltado. A substituição de todos os métodos *in vivo* ainda não é possível, mas há um esforço da comunidade científica nesse sentido e novas diretrizes deverão surgir para aprimorar essas técnicas no desenvolvimento de produtos cosméticos.

Palavras-chave: métodos alternativos, experimentação animal, avaliação de segurança, cosméticos, revisão.

ABSTRACT

Cosmetics, although little related to health risks, may cause users adverse effects that are cumulative, by the fact that a person uses more than one cosmetic product a day during life. Cosmetic products safety is evaluated by its component when it has not yet been described in literature. The evaluation is made by toxicity tests, which is based on the use of experimental animals. In the late 60's, concerns about experimental animal use were raised after one publication that introduced the 3 R's theory: reduce, refine and replace. Reduce the experimental animal number, refine techniques to cause less suffering, and replace animal use in testing by alternative methods such as *in vitro* and *in silico*. In Brazil this concern emerged in 2008, when Arouca Law was approved establishing a set of rules for animal testing. National Council for Animal Experiments Control (CONCEA), established in 2014, 17 alternative methods that must be implemented in Brazilian laboratories in up to five years. The goal of this study was to compare the alternative methods advocated by CONCEA, for evaluation of cosmetic products under the dermal exposure to "in vivo" methods, based on the Organization's guidelines for Economic Cooperation and Development (OECD). In recent years, several substitutive methods to animal testing were developed. Even *in vivo* techniques that could not be replaced, were improved to reduce animal suffering. Yet, the replacement of all "in vivo" methods is not possible, but new guidelines should arise to improve these techniques in the development of cosmetic products.

Keywords: alternative methods, animal experimentation, safety assessment, cosmetics, review.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BraCVAM - Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos

BrdU - 5-bromo-2-desoxiuridina

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DCA - Dermatite de contato alérgica

DO - Densidade óptica

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

EHR - Epiderme humana reconstituída

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FDA - *The Food and Drug Administration*

FRAME - *The Fund of the Replacement of Animals in Medical Experiments*

GHS - Sistema Harmonizado Globalmente para a Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos

ICCVAM - *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade

MS - Margem de segurança

NOAEL - Nível de efeito adverso não observado

OECD - Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento

RENAMA – Rede Nacional de Métodos Alternativos

SCCS - *Scientific Committee on Consumer Safety*

SDQ - Sistema de detecção de substâncias químicas

TER - Resistência elétrica transcutânea

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. OBJETIVOS.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
4.1 Avaliação de segurança de produtos cosméticos	10
4.2 Histórico – Métodos alternativos	11
4.3 Métodos alternativos validados no Brasil	14
4.4. Métodos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> validados no Brasil no âmbito da exposição dérmica	15
4.4.1. Avaliação do potencial de irritação e corrosão da pele	16
4.4.2. Avaliação da absorção cutânea	24
4.4.3. Avaliação do potencial de sensibilização cutânea	26
4.4.4. Avaliação do potencial de fototoxicidade	30
4.4.5. Avaliação de genotoxicidade	32
5. CONCLUSÃO.....	34
6. REFERÊNCIAS.....	35

1. INTRODUÇÃO

Cosméticos, segundo a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), “são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência, corrigir odores corporais e ou protegê-los ou mantê-los em bom estado”.

Apesar de pouco relacionados com sérios riscos à saúde, os produtos cosméticos podem causar efeitos adversos aos usuários. A longo prazo os aspectos de segurança devem ser criteriosamente analisados, uma vez que esses produtos são usados em larga escala por milhões de pessoas, incluindo os grupos mais vulneráveis como: crianças, idosos e gestantes (VINARDELL, 2015).

A segurança toxicológica dos produtos cosméticos é determinada por uma série de estudos de toxicidade como: irritação e sensibilização cutânea, irritação ocular primária, toxicidade aguda dérmica, fototoxicidade entre outros. Anteriormente, esses testes eram todos feitos com animais (testes *in vivo*), porém atualmente a maioria dos laboratórios vem se conscientizando e cada vez mais utilizando metodologias alternativas. Além disso, segundo regulamentações, caso exista um método científico já validado *in vitro* ensaios com animais não devem ser realizados (CHORILLI, *et al.*, 2007).

Quando se trata de estudos toxicológicos *in vivo*, sabe-se que o modelo animal é o mais utilizado (CAZARIN, *et al.*, 2004). O uso de animais em métodos científicos está dividido em: testes de toxicidade de medicamentos e de produtos biológicos (30 a 40%), à educação, principalmente nas Universidades (25%), ao desenvolvimento de novos produtos (10%) e ao diagnóstico (<5%) (HUMANE, 2003). A preocupação com o bem-estar animal é crescente e a utilização de animais na pesquisa vem sofrendo críticas. Uma vez que esse procedimento vem passando por modificações, a tendência dessas proporções é diminuir.

A reconsideração dos testes toxicológicos *in vivo* foi concretizada a partir do surgimento de diversas instituições com o objetivo de desenvolver e validar métodos alternativos, e da implementação regulatória desses novos testes em diversos países, com intenção de legalizar e acordar o uso dos mesmos (SCHECHTMAN, *et al.*, 2002).

2. JUSTIFICATIVA

Recentemente, foram validados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) métodos alternativos a testes em animais para produtos cosméticos. Sendo assim, nesse trabalho serão revisadas as diretrizes da Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD), a fim de descrever os métodos validados.

3. OBJETIVOS

Descrever os métodos alternativos baseados na teoria dos 3 R's: *reduce*, *refine* e *replace*, isso é, reduzir o número de animais em experimentos, refinar as técnicas para causar menos sofrimento e, substituir o uso de animais em testes por métodos alternativos, como *in vitro* e *in silico*, validados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal para desenvolvimento de produtos cosméticos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Buscas na internet foram realizadas a fim de identificar trabalhos relacionados com métodos alternativos ao uso de animais no desenvolvimento de produtos cosméticos validados no Brasil. O trabalho foi baseado nos guias de testes da OECD. Websites de base de dados como Medline (Pubmed) e o Portal da CAPES foram utilizados para complementação de informações a respeito de alguns testes.

Os critérios de inclusão para os possíveis estudos encontrados foi a literatura publicada em âmbito nacional e internacional com as seguintes palavras-chave: métodos alternativos, testes em animais, toxicologia, corrosão dérmica *in vivo*, corrosão dérmica *in vitro*, irritação cutânea *in vivo*, irritação cutânea *in vitro*, fototoxicidade *in vitro*, absorção cutânea *in vivo*, absorção cutânea *in vitro*, sensibilização cutânea *in vivo*, sensibilização cutânea *in vitro* e genotoxicidade *in vitro*; *alternative methods to animal testing*, *toxicology*, *in vivo dermal corrosion*, *in vitro dermal corrosion*, *in vivo skin irritation*, *in vitro skin irritation*, *in vitro phototoxicity*, *in vivo dermal absorption*, *in vitro dermal absorption*, *in vivo skin sensitization*, *in vitro skin sensitization* e *in vitro genotoxicity*. Foram excluídos artigos contendo descrição de resultados obtidos através de testes de drogas, fármacos e testes para produtos cosméticos fora do âmbito de exposição dérmica.

5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

5.1. Avaliação de segurança de produtos cosméticos

Os produtos cosméticos, de acordo com os artigos 3º e 26º da Lei 6.360/76 1 e 3º, 49º e 50º do Decreto 79.094/77, são classificados pelo grau de risco que oferecem em: grau 1 (produtos com menor risco) geralmente enxaguáveis, e grau 2 (aqueles com maior risco) que podem ter uma grande área de contato com a pele e uso por um longo período de tempo (CHORILLI, 2007).

Segundo o “Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos” registrado pela ANVISA em 2012, os produtos cosméticos são formulações com um pequeno número de componentes e, uma vez que os efeitos observados a partir do produto acabado são dependentes dos seus ingredientes, o conhecimento prévio do risco de uso dos mesmos permite avaliar um parâmetro para as avaliações nos produtos acabados.

Entre os parâmetros observados na avaliação dos ingredientes se destacam os dados toxicológicos, que se baseiam na margem de segurança adequada para cada ingrediente. A margem de segurança (MS) corresponde à razão entre o nível de efeito adverso não observado (NOAEL)* no teste de toxicidade subaguda, e a dose diária absorvida pela pele (DS).

$$MS = \frac{NOAEL}{DS}$$

* o NOAEL representa a maior dose de uma substância administrada em um estudo de toxicidade subcrônico em doses repetidas (30, 60 e 90 dias) em que não se observa nenhum efeito adverso nos animais de experimentação.

Para ser considerado um ingrediente seguro esta relação deve ser maior que 100. Porém, há duas classes de substâncias a serem avaliadas, umas delas são as que tem a toxicidade relacionada à concentração de uso do ingrediente, como irritantes e corrosivas, para essa classe o cálculo de MS é utilizado. Mas há também substâncias mutagênicas, carcinogênicas e teratogênicas, no caso dessas o cálculo

de MS não é útil, pois a concentração de uso não define seus potenciais tóxicos. Logo, o cálculo da margem de segurança não é suficiente para definir o perfil toxicológico do ingrediente, outras informações complementares são requeridas.

A margem de segurança é usada para determinar uma concentração que apresente segurança adequada para ser incorporada à fórmula do produto, porém quando se trata da definição do potencial tóxico do produto aí recorre-se aos estudos de toxicidade, isto é, métodos experimentais *in vivo* e/ ou *in vitro*.

Para a avaliação de segurança de produtos cosméticos são preconizados pela ANVISA os seguintes métodos:

TABELA 1. ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DE SEGURANÇA DE PRODUTOS COSMÉTICOS

Métodos <i>in silico</i>
SAR (structure-activity relationship - relação estrutura-atividade)
QSAR (quantitative structure activity relationship - relação quantitativa estrutura-atividade)
Métodos <i>in vivo</i>
Método de Doses Fixas
Método Up-and-Down
Método de Classes
Irritação/Corrosividade Ocular
Irritação/Corrosividade Cutânea
Avaliação da Irritação Primária
Avaliação da Irritação Acumulada
Sensibilização Dérmica
Teste de Irritação da Mucosa Oral
Teste de Irritação da Mucosa Vaginal
Teste de Irritação da Mucosa Peniana
Teste de Comedogenicidade
Métodos <i>in vitro</i>
Avaliação do potencial de irritação ocular
Avaliação do potencial de irritação cutânea
Avaliação do potencial fototóxico
Avaliação da permeação e retenção cutâneas

FONTE: ANVISA, 2012.

5.2. Histórico – Métodos alternativos

Desde o século XIX a ideia da criação de metodologias alternativas ao uso de animais vem sendo desenvolvida. Em 1876, na Grã-Bretanha, foi criada a primeira legislação para regulamentar a utilização de animais em experimentos científicos (STEPHENS, *et al.*, 2001), porém foi só a partir de 1959 com a publicação da metodologia dos 3R's no artigo "Princípios das Técnicas Experimentais Humanas" (*The principles of Humane Experimental Technique*) de Russell e Burch, que o tema passou a ser foco de atenção da comunidade científica (CAZARIN, *et al.*, 2004). Nessa publicação, a ideia central era a da substituição do uso de animais para a avaliação de toxicidade, no sentido de humanizar a experimentação científica minimizando o uso de animais e seu sofrimento, sem comprometer a qualidade do trabalho científico. Esse novo método se resume no princípio dos 3 R's:

- *Refine* (refinamento), no sentido de diminuir a severidade dos procedimentos aplicados;
- *Reduce* (reduzir) o número de animais usados no experimento, sem prejudicar a confiabilidade dos resultados;
- *Replace* (substituir) os animais, lançar mão de métodos alternativos ao uso de animais (RUSSEL E BURCH, 1959).

Alguns acontecimentos ocorreram nessa área nos próximos anos que seguiram a publicação, como é o caso da criação do fundo de substituição de animais em experimentos médicos (*The Fund of the Replacement of Animals in Medical Experiments* – FRAME) em 1969, no Reino Unido, para promover junto à comunidade científica a ideia de métodos alternativos, mas foi a partir dos anos 80 que a causa tomou grandes proporções. Reduzir, refinar e substituir tornaram-se obrigações legais e morais, houve a fundação de diversas instituições, crescentes encontros e seminários sobre o tema.

Em 1980 o FDA (*The Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos declarou que não iria mais requerer o teste de toxicidade aguda (DL50), no qual mais de 100 animais eram utilizados (normalmente ratos e camundongos) para cada substância testada. O teste de toxicidade aguda tem o objetivo de determinar a dose única, derivada de cálculos estatísticos, que pode causar a morte de 50% de uma dada população, em condições experimentais definidas (DL50) (BOTHAM, 2002). Cinco anos depois, o conselho de Ministros da Comunidade Europeia legalizou a diretiva EC 86/609, solicitando que os países membros desenvolvessem legislação

que difundisse os 3R's. Na mesma data a OECD anunciou mudanças nos protocolos de toxicidade aguda e iniciou a discussão sobre os métodos alternativos.

Na década de 90 foram fundadas duas organizações de grande importância para fortalecer e expandir a criação e validação de métodos alternativos: em 1991, o Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos - ECVAM (*European Center for the Validation of Alternative Methods*), e em 1997, nos Estados Unidos, o Comitê de Coordenação Interagências para Validação de Métodos Alternativos - ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*), criado pelo governo federal (CAZARIN, *et al.*, 2004).

Os primeiros *guidelines* de métodos alternativos validados e aderidos pela OECD foram de testes correspondentes à determinação da toxicidade aguda. Esses protocolos foram revisados em 2001, sendo estabelecido o período de um ano para a interrupção de uso do *guideline* 401 referente à toxicidade aguda oral, que foi invalidado pela OECD em 2002 (BOTHAM, 2002).

Em 2009, em sua 7ª alteração, a diretiva de Cosméticos da União Europeia proibiu o lançamento de cosméticos testados em animais no mercado europeu a partir de 2013. Após a alteração, a comissão europeia junto aos demais interessados, como países membros da União Europeia e da SCCS (*Scientific Committee on Consumer Safety*), indústria e organizações não governamentais, identificaram peritos nas diversas áreas da toxicologia e os convidaram para analisar o cenário atual e as perspectivas da implantação de métodos alternativos nessas áreas. Os cientistas deveriam estimar o tempo necessário para substituição total dos ensaios com animais. Na conclusão do trabalho, os peritos determinaram que seriam necessários entre sete e nove anos para a substituição completa dos testes *in vivo* para avaliação da segurança toxicológica dos produtos cosméticos (VINARDELL, 2015).

No Brasil, em 2008, após 13 anos de tramitação no Congresso Nacional, houve a aprovação da Lei Arouca (Lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008), cujo nome homenageia o médico, sanitarista e ex-presidente da Fiocruz Sergio Arouca, autor do projeto de lei. Em seis capítulos, a Lei 11.794 estabelece um conjunto de regras, como a criação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e a constituição de Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAS), nas quais as instituições devem ter seus protocolos de pesquisas aprovados. Além disso, lista as condições de criação e uso dos animais e as

penalidades administrativas às instituições e pesquisadores que transgredirem as suas disposições e seu regulamento (BRASIL. Lei n. 11.794, 2008).

Em seu art. 5º, a Lei Arouca impõe ao CONCEA a competência de “formular e zelar pelo cumprimento das normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica”, isso é, sempre que possível, reduzir o número de animais e evitar seu sofrimento. Também é de responsabilidade do CONCEA credenciar as instituições que fazem uso de cobaias para ensaios científicos; e estabelecer e averiguar, técnicas alternativas que possam substituir o uso de animais na pesquisa (OLIVEIRA, 2013).

A partir de uma parceria entre o Instituto Nacional de Controle de Qualidade (INCQS/ Fiocruz) e a ANVISA, surge o BraCVAM (Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos) em setembro de 2012, com o propósito de validar e coordenar estudos de substituição, redução ou refinamento do uso de animais em ensaios de laboratório. Sob as diretrizes do BraCVAM está a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA), uma rede de laboratórios e instituições de pesquisa credenciados para criar e validar novos métodos (LANG, 2014).

5.3. Métodos alternativos validados no Brasil

Até setembro de 2014, nenhum método alternativo havia sido reconhecido oficialmente no Brasil. Nessa data o CONCEA, na Resolução Normativa nº 17/2014, legalizou 17 métodos alternativos aos testes em animais propostos pelo BraCVAM com o intuito de aplicar o princípio dos 3 R's (LANG, 2014). A resolução determinou que os laboratórios e instituições de pesquisa tem o prazo de cinco anos para a substituição obrigatória dos métodos antigos pelos novos, sendo eles:

TABELA 2. NOVOS MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DE SEGURANÇA APROVADOS PELO CONCEA

	Método OECD TG			
Avaliação do potencial de irritação e corrosão da pele	430 – Corrosão dérmica <i>in vitro</i> : Teste de Resistência Elétrica Transcutânea	431 – Corrosão dérmica <i>in vitro</i> : teste da Epiderme Humana Reconstituída	435 – Teste de Membranade Barreira <i>in vitro</i>	439 – Teste de irritação Cutânea <i>in vitro</i>
Avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular	437 – Teste de Permeabilidade e Opacidade de Córnea Bovina	438 – teste de Olho Isolado de Galinha	460 – teste de Permeação de Fluoresceína	
Avaliação do potencial de fototoxicidade	432 – teste de Fototoxicidade <i>in vitro</i> 3T3 NRU			
Avaliação da absorção cutânea	428 – Absorção Cutânea método <i>in vitro</i>			
Avaliação do potencial de sensibilização cutânea	429 – Sensibilização Cutânea: Ensaio do Linfonodo Local	442a e 442b – Versões não radioativas do Ensaio do Linfonodo Local		
Avaliação de toxicidade aguda	420 – Toxicidade Aguda Oral – Procedimento de Doses Fixas	423 – Toxicidade Aguda Oral – Classe Tóxica Aguda	425 – Toxicidade Aguda Oral – procedimento “Up and Down”	129 – estimativa da dose inicial para teste de toxicidade aguda oral sistêmica
Avaliação de genotoxicidade	487 – Teste do Micronúcleo em Célula de Mamífero <i>in vitro</i>			

FONTE: CONCEA, 2014.

5.4. Métodos *in vivo* e *in vitro* validados no Brasil no âmbito da exposição dérmica

A aceitação regulamentar de um método de ensaio, segundo o ECVAM, é a sua aceitação formal pelas autoridades reguladoras indicando que o método experimental pode ser usado para fornecer informações para atender a uma exigência regulamentar específica. Isso inclui, mas não está limitado à adoção formal de um método de ensaio pela OECD.

A OECD é uma organização intergovernamental na qual representantes de 30 países da América do Norte, Europa e Pacífico reúnem-se para coordenar e harmonizar políticas, discutir questões de interesse mútuo, e trabalhar juntos para responder aos problemas internacionais (ECVAM, 2014). Suas diretrizes para ensaios de produtos químicos avaliam os efeitos potenciais das substâncias sobre a saúde humana e o meio ambiente. Essas são aceitas internacionalmente como métodos de referência para testes de segurança, e suas orientações são usadas por profissionais da indústria, acadêmicos e governo envolvidos na experimentação e avaliação de produtos químicos. As orientações são atualizadas regularmente com a

assistência de milhares de peritos nacionais dos países membros da Organização (OECD, 2014).

Os métodos alternativos ao uso de animais no âmbito da exposição dérmica validados recentemente no Brasil seguem ensaios preconizados pela OECD por meio de *guidelines (Test Guidance)* e foram utilizados como base para a descrição dos próximos tópicos.

5.4.1. Avaliação do potencial de irritação e corrosão da pele

Irritação dérmica ou dermatite de contato irritante é uma resposta inflamatória que se desenvolve na sequência de uma exposição cutânea a um agente perigoso, o contato precede a erupção por 1 a 4 dias. A dermatite de contato irritante é caracterizada por prurido, dor, eritema, edema, formação de pápulas e descamação da pele seca. Essa dermatite se apresenta em duas formas: dermatite de contato cumulativa crônica, que se desenvolve como resultado de exposições repetidas; e dermatite de contato irritante aguda, que ocorre após uma exposição a um irritante forte ou uma substância química cáustica (LURATI, 2015).

A corrosão cutânea, segundo o Sistema Harmonizado Globalmente para a Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS) da ONU, é definida como a produção de danos irreversíveis na pele como a necrose, visível através da epiderme e na derme, após a aplicação da substância de ensaio. As reações corrosivas típicas são úlceras, sangramento, crostas ensanguentadas, e após alguns dias, até descoloração, grandes áreas com perda de pelos e cicatrizes (ALÉPÉE, N., *et al.*, 2014).

A fim de avaliar o potencial de irritação e corrosão da pele, no momento, estão validadas as técnicas descritas a seguir.

OECD TG 404 - Irritação/ Corrosão dérmica

As diretrizes preconizadas pela OECD TG 404 (1981, revisada em 2002) para ensaios *in vivo* de irritação ou corrosão da pele relatam que os experimentos devem ser realizados em coelhos, através da aplicação do produto diretamente sobre a pele depilada do animal.

Quando a tese é de que a substância possui um potencial corrosivo recomenda-se que o teste seja feito inicialmente com um animal. Se a corrosão da substância for comprovada, a avaliação se encerra. No entanto, se os dados forem inconclusivos, novos ensaios devem ser realizados, mas dessa vez com tempos de exposição mais curtos. O fato de iniciar o teste com apenas um animal, e em caso de resultados inconclusivos novas exposições serem feitas, mas com tempos mais curtos, fazem parte da estratégia de ensaio sequencial destacada pelo guia, já demonstrando a preocupação em reduzir o número de animais no teste e o seu sofrimento. Se o efeito corrosivo não for constatado no ensaio inicial, a reação de irritação deve ser avaliada utilizando até dois animais adicionais. Nos casos em que a tese é de que a substância tenha caráter irritativo, a substância também é aplicada inicialmente em um animal, e se o efeito irritante for observado, o teste de confirmação deve ser efetuado através da exposição de dois animais adicionais ou aderir ao ensaio sequencial, com tempos de exposição menores. Após a aplicação do produto em teste vem a fase de observação, que deve durar o suficiente para avaliar a reversibilidade total dos efeitos observados, uma vez que o guia baseia-se na definição do Sistema Harmonizado Globalmente para a Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS) da ONU, que define irritação dérmica como produção de danos reversíveis na pele após 4 horas da aplicação da substância de ensaio, e corrosão cutânea como a produção de danos irreversíveis na pele na sequência da aplicação de uma substância de ensaio por até 4 horas.

É importante ressaltar que já no *guideline in vivo* haviam ressalvas em relação aos testes com animais. Destaca-se ao longo do texto a importância de evitar o uso desnecessário de animais e minimizar os ensaios que possam causar reações graves. Cita-se também que todas as informações sobre a substância a ser avaliada devem ser pesquisadas antes de considerar os ensaios *in vivo*, pois muitas vezes esse já está descrito em literatura.

Em seu suplemento, o guia inclui os métodos *in vitro* já validados na estratégia de ensaio sequencial, também na tentativa de reduzir o uso de mais animais.

OECD TG 431 - Corrosão cutânea *in vitro*: ensaio com epiderme humana reconstituída (EHR)

O *guideline* OECD 431 (2004, revisado em 2013/2014) descreve uma técnica *in vitro* que permite a identificação de substâncias corrosivas e não corrosivas a partir de epiderme humana reconstituída (RHE, do inglês, *reconstructed human epidermis*). A RHE é constituída por queratinócitos humanos cultivados de modo a formar um modelo de múltiplas camadas, altamente diferenciado (NETZLAFF, *et al.*, 2005). Uma vez que modelos de epiderme humana reconstituída são cultivados na interface ar-líquido, as substâncias em teste podem ser diretamente aplicadas aos modelos RHE de uma maneira semelhante à pele real (SAITO, *et al.*, 2013).

Mais de um modelo de RHE são aprovados cientificamente para uso dentro do método de corrosão cutânea *in vitro*, são eles: EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE e modelos EPICS®.

O modelo EpiSkin™ (SM) criado em 1997 pertence à L'Oréal e é definido pela empresa como “uma matriz de colágeno tipo I bovino, que representa a derme, revestida com uma película de colágeno tipo IV humano”. Os queratinócitos são semeados sobre a matriz de colágenos, e quando incubados por 13 dias em sistema de cultivo interface ar-líquido, esses se diferenciam chegando ao modelo de multicamadas, semelhante à epiderme. Esse modelo é pontuado por apresentar um aumento significativo do número de camadas de células em comparação com amostras de estrato córneo de pele humana, deixando-a mais espessa que a natural. Fato esse que não atrapalhou sua boa performance quando avaliada para o teste irritação com 22 produtos cosméticos (NETZLAFF, *et al.*, 2005). O modelo também foi devidamente validado pelo ECVAM para avaliar a corrosão cutânea (DESHMUKH, *et al.*, 2012).

O modelo EpiDerm™ (EPI-200) foi criado em 1993 pela *MatTek Corporation* nos Estados Unidos e é assim definido pela empresa: “derivado de queratinócitos epidérmicos humanos normais (NHEK), que foram cultivados para formar um modelo de múltiplas camadas, altamente diferenciado de epiderme humana”. Na EpiDerm™ os queratinócitos são cultivados em filtros de policarbonato e dessa forma não formam cristas epiteliais, essa é a diferença destacada em relação à epiderme humana. Quanto aos estratos, todos estão presentes no modelo de penetração da MatTek. Ambos os ensaios, para irritação e corrosão, feitos com a EpiDerm™ foram aprovados. No teste de irritação verificou-se que a EpiDerm™ possui a função de barreira um pouco limitada, logo as concentrações necessárias

para desencadear uma reação são mais baixas do que seriam na pele humana excisada (NETZLAFF, *et al.*, 2005).

O modelo SkinEthic™ RHE foi criado no Laboratório SkinEthic da França em 1992, e é estabelecido pelo Laboratório como uma “epiderme reconstituída por uma cultura de queratinócitos humanos normais (NHEK), cultivados por 17 dias em meio quimicamente definido em filtros de policarbonato inertes”. Assim como os outros modelos a estrutura geral da epiderme do modelo SkinEthic é altamente semelhante à epiderme humana, mas há algumas diferenças quando se trata, por exemplo, do número de camadas da epiderme e do estrato córneo, que parece diferir na RHE. Mesmo assim, essa estrutura se mostrou uma das mais sensíveis para avaliação de irritação cutânea (NETZLAFF, *et al.*, 2005).

O método de ensaio com RHE baseia-se na premissa de que as substâncias químicas corrosivas ou irritantes são capazes de penetrar no estrato córneo por difusão ou erosão, e são tóxicas para as células nas camadas subjacentes (OECD TG 431).

A viabilidade das células é medida pelo ensaio colorimétrico com o corante vital MTT. O MTT [brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5 diphenyltetrazolium brometo, brometo de tetrazólio azul de tiazolilo] é um substrato de coloração amarelada, que é clivado na presença de células metabolicamente ativas, baseado principalmente na ação de enzimas mitocondriais, convertendo-se em cristais de formazan que possui uma coloração azul escura. Essa coloração pode ser determinada quantitativamente através da mensuração da absorvância por espectrofotômetros, a absorvância é diretamente proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983).

Os valores de densidade óptica (DO) obtidos pelo espectrofotômetro para cada substância testada são utilizados para calcular a porcentagem de viabilidade em relação ao controle, que é fixado em 100%. Os valores percentuais de viabilidade celular distinguem uma substância corrosiva de não corrosiva. As diretrizes recomendam os seguintes parâmetros para avaliação:

Viabilidade medida após três tempos de exposição (t = 3, 60 e 240 minutos)	Predição a ser considerada
< 35% após 3 minutos de exposição	Corrosivo
≥ 35% após 3 minutos de exposição e < 35% após 60 minutos de exposição	Corrosivo
≥ 35% após 240 minutos de exposição	Não corrosivo

FONTE: OECD TG 431.

TABELA 4. MODELO PREDITIVO PARA EpiDerm™, SkinEthic™ RHE e EpiCS®

Viabilidade medida após três tempos de exposição (t = 3 e 60 minutos)	Predição a ser considerada
< 50% após 3 minutos de exposição	Corrosivo
≥ 50% após 3 minutos de exposição e < 15% após 60 minutos de exposição	Corrosivo
≥ 50% após 3 minutos de exposição e ≥ 15% após 60 minutos de exposição	Não corrosivo

FONTE: OECD TG 431.

OECD TG 435 - Corrosão cutânea *in vitro*: ensaio com membrana de barreira

O método de teste descrito pela OECD TG 435, adotada em 2006, consiste na detecção de danos na membrana de barreira *in vitro* causados por substâncias corrosivas após a aplicação dessas na superfície da membrana artificial. Essa membrana de barreira é constituída por dois componentes: um gel aquoso proteico e uma membrana de suporte permeável. O gel proteico deve ser impermeável aos líquidos e sólidos, mas pode ser corroído, e dessa forma permeado, já a membrana permeável proporciona suporte mecânico para o gel durante a exposição à substância em teste. O modelo de membrana de barreira comercial indicado pelo *guideline* é o Corrositex®, desenvolvido pela *In Vitro International* (IN VITRO, 2008).

O modelo Corrositex® consiste em um sistema de detecção de substâncias químicas (SDQ) coberto por uma membrana de barreira. O SDQ é um líquido

colorido composto de água e dois corantes indicadores de pH (um indicador básico e um indicador ácido). A membrana de barreira consiste em uma membrana de celulose coberta por um gel de colágeno (STOBBE, *et al.*, 2003).

O tempo para se observar uma mudança na cor ou na consistência no SDQ é determinado. Uma alteração no SDQ indica que a substância teste, ou foi difundida através da membrana ou degradou o gel, e alterou o pH da SDQ, resultando na mudança de cor observada. O tempo que leva para que isso ocorra é conhecido como "tempo de ruptura." Tempos de ruptura são inversamente proporcionais à gravidade da corrosão, e a classificação da substância em corrosiva ou não corrosiva é baseada nessa variável. Uma limitação para esse modelo consiste no fato de que os componentes do ensaio podem ser quimicamente incompatíveis com certas classes de produtos químicos e, conseqüentemente, o teste é inviabilizado (STOBBE, *et al.*, 2003).

OECD TG 439 - Irritação dérmica *in vitro*: ensaio com epiderme humana reconstituída (RHE)

O *guideline* OECD 439, adotado em 2013, prevê um procedimento *in vitro* para determinar a irritação cutânea causada por produtos químicos. O procedimento baseia-se no sistema de teste *in vitro* com epiderme humana reconstituída (RHE), já descrita no item que trata sobre a OECD 431.

Segundo o guia, o modelo RHE reproduz muito bem a fase inicial da cascata inflamatória que ocorre durante a irritação *in vivo*. Na irritação em pele humana, as células danificadas pela penetração de produtos químicos pelo estrato córneo induzem uma cascata inflamatória que também atua sobre as células da derme. Notavelmente, os métodos de ensaio baseados em epiderme reconstituída, na ausência da derme no sistema *in vitro* não detectam os efeitos causados nessa, mas a avaliação para determinar se a cascata foi ou não iniciada é possível, e é feita através da análise da viabilidade celular através da técnica com MTT, também descrita no item que trata sobre a OECD 431.

Os valores de corte para a predição de irritação são descritos na tabela a seguir:

TABELA 5. MODELO PREDITIVO PARA IRRITAÇÃO DÉRMICA

Viabilidade*	Predição a ser considerada
≤ 50%	Irritante
> 50%	Não irritante

FONTE: OECD TG 439.

*O guia usa a definição de irritação definida pelo Sistema Harmonizado Globalmente para a Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS) da ONU, que caracteriza a irritação dérmica como produção de danos reversíveis na pele após a aplicação de uma substância de ensaio para até 4 horas, logo a viabilidade deve ser avaliada após esse período de tempo.

Assim como para a avaliação da corrosão dérmica, para a irritação cutânea também há mais de um modelo de epiderme humana reconstituída aprovado para uso no método, sendo eles: EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE e LabCyte EPI-MODEL 24. Os três primeiros foram descritos no tópico referente à TG OECD 431.

O LabCyte EPI-MODEL 24 é um modelo japonês produzido pela *Japan Tissue Engineering (J-TEC)*, constituído de queratinócitos epidérmicos humanos normais cuja origem biológica é prepúcio neonatal. Essas células são cultivadas por 13 dias até formarem um modelo de múltiplas camadas que consiste em um epitélio totalmente diferenciado com características muito próximas às da epiderme humana. A validação do LabCyte EPI-MODEL 24 realizada em 3 laboratórios, segundo padrões de desempenho da OCDE, demonstrou precisão aceitável (80-85% de precisão em geral, 90-100% sensibilidade geral e 70% de especificidade global) para avaliação de irritação dérmica (KOJIMA, *et al.*, 2013).

O bem-estar animal é a justificativa para o surgimento de todos esses métodos *in vitro*. A intenção é de que todos os testes *in vivo* com animais sejam substituídos, atendendo ao principal “R” (*Replace*) destacado por Russel e Burch. Além de estar se tornando parte da legislação, essas metodologias são muitas vezes menos dispendiosas às empresas, como é o caso do ensaio com o modelo Corrositex®, que custa aproximadamente U\$ 1100,00 por substância em estudo, em comparação com um teste realizado com animais que normalmente custa U\$ 2.000,00 por substância para ensaio. O tempo de teste com o modelo Corrositex®

também é mais curto, realizado em algumas horas, já os estudos tradicionais com animais requerem um mínimo de 3 dias (STOBBE, *et al.*, 2003).

Apesar da intenção de cessar os testes com animais, ainda existem algumas limitações com os métodos alternativos como, por exemplo, a limitação de substâncias que podem ser avaliadas por essas metodologias. É o caso de formulações que não foram testadas no estudo de validação como, por exemplo, misturas, gases e aerossóis. Produtos químicos coloridos também fazem parte dessa restrição, uma vez que podem interferir nas medições de viabilidade celular (ECVAM, 2009). No caso de irritação dérmica há uma limitação específica. As técnicas *in vitro* não permitem a subcategorização das substâncias em irritantes leves, tal como é definido no Sistema Harmonizado Globalmente para a Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS) da ONU (COMMISSION REGULATION (EC) No 761/2009).

OECD TG 430 - Método de resistência elétrica transcutânea (TER)

A orientação OECD 430 baseia-se no método da resistência elétrica transcutânea (TER), que faz uso de pele de rato para identificar substâncias corrosivas. Segundo o *guideline*, os ratos devem ser utilizados nesse experimento, porque a sensibilidade da pele a substâncias no presente método foi anteriormente demonstrada e a pele de rato é a única fonte que foi formalmente validada (ECVAM, 1998).

Resistência elétrica transcutânea é a medida da impedância elétrica da pele, representada em kilohm e consiste em um método simples e eficiente para avaliar a função de barreira através da gravação da passagem de íons através da pele utilizando um aparelho de ponte de *Wheatstone*. Produtos químicos corrosivos são identificados pela sua capacidade em produzir uma perda da função normal e na integridade da barreira do estrato córneo, que é medida como uma redução no TER abaixo de um nível de limiar (OECD 430).

O estudo de validação relatou que o método de ensaio TER em pele de rato é capaz de determinar se a substância em teste é ou não corrosiva com uma sensibilidade de 94% (51/54) e especificidade de 71% (48/68) para uma base de dados com 122 substâncias (FENTEM, 1998).

O modelo de predição para resistência elétrica transcutânea em pele de rato associado com o sistema de classificação do Sistema Harmonizado Globalmente para a Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS) da ONU está resumidamente descrito na tabela a seguir:

TABELA 6. MODELO PREDITIVO PARA CORROSÃO CUTÂNEA

Valor médio de TER (Resistência elétrica transcutânea)	Predição a ser considerada
> 5 k Ω	Corrosivo
\leq 5 k Ω	Não corrosivo

Fonte: OECD TG 430.

O método de resistência elétrica transcutânea por mais que seja *in vitro*, diferente das outras metodologias citadas, ainda utiliza animais para sua realização. Nesse caso o “R”, de Russel e Burch, ressaltado é apenas o de *Reduce*, uma vez que o ensaio diminui o número de animais necessários para avaliação, pois a pele utilizada no ensaio possui 20 mm de diâmetro, e conseqüentemente um animal sacrificado será usado em mais de um teste. Mas o objetivo dos métodos alternativos que é outro “R”, *Replace*, não é atendido por essa metodologia.

5.4.2. Avaliação da absorção cutânea

A absorção de uma substância pela pele ocorre por difusão passiva através da epiderme ou de forma direta por glândulas sudoríparas e folículos pilosos. Os produtos químicos que penetram na epiderme são eliminados por descamação e, portanto, não atingem a circulação sistêmica, porém alguns produtos químicos tem capacidade de atingir a derme subjacente à epiderme, e dessa forma entram em contato com a circulação sistêmica. Portanto, a determinação da absorção de uma substância é crucial para avaliar a exposição sistêmica (SELZER, *et al.*, 2015). Geralmente, a absorção cutânea de uma substância teste é obtida experimentalmente *in vitro* e/ ou *in vivo* a partir de diferentes espécies, incluindo porcos, macacos e seres humanos (SHEN, J. *et al.* 2014). Para determinar a taxa de absorção cutânea, são determinados os seguintes métodos:

OECD TG 427 – Absorção cutânea: método *in vivo*

A orientação dada pela OECD 427, para avaliação da absorção cutânea *in vivo*, é que essa avaliação pode ser realizada com vários animais. Segundo o *guideline*, ratos e coelhos tem geralmente a pele mais permeável que a pele humana, enquanto que o “porquinho-da-Índia”, porco doméstico e o macaco tem a pele mais similar à humana. Tanto estudos qualitativos (SIMON e MAIBACH, 2000), isso é, caracterizando semelhanças fisiológicas, quanto quantitativos (BARBERO e FRASCH, 2009), através da medição da absorção cutânea, demonstraram que o “porquinho-da-Índia” e o porco doméstico são os animais mais adequados para a avaliação da absorção cutânea, entretanto o *guideline* 427 destaca que os ratos são os animais mais utilizados nesse experimento.

Para a avaliação a substância em teste é radioativamente marcada e deve ser aplicada na pele depilada do animal nas mesmas condições em que seria aplicada na pele humana. Ao menos um grupo de 4 animais deve ser utilizado para avaliar cada preparação. Após a aplicação da substância, os animais vão para uma “gaiola metabólica”, a qual permite o recolhimento de fezes e urina separadamente e também o dióxido de carbono expirado pelos animais. Cada animal é sacrificado após um intervalo de tempo diferente (6, 24, 48 e 72 horas) para análises subsequentes. Após o sacrifício, além da região onde foi aplicada a substância teste, o sangue do animal e sua carcaça são analisados. Se houver outros potenciais órgãos-alvo da substância, esses podem ser removidos e avaliados em separado.

Para uma análise adequada $100 \pm 10\%$ da radioatividade deve ser recuperada, se a reaquisição estiver fora deste intervalo ela deve ser justificada.

OECD 428 - Absorção cutânea: método *in vitro*

A OECD 428 traz as diretrizes para avaliação da absorção cutânea pelo método *in vitro*, que é realizado com pele excisada (humana ou de outros mamíferos) em células de difusão. A célula de difusão mais usada é a Célula de Franz, descrita por Thomas J. Franz em 1975 (FRANZ, 1975). Essa célula é constituída por duas câmaras: uma doadora e outra receptora, entre as quais a pele excisada é posicionada. Na câmara receptora, localizada abaixo da pele excisada,

há um fluido receptor que representa o fluxo sanguíneo periférico, que é amostrado em intervalos específicos ao longo do experimento e analisado para a substância em teste, a qual é geralmente marcada radioativamente.

Um período de 24 horas em média é necessário para caracterização adequada do perfil de absorção. Todos os componentes do sistema devem ser analisados e o objetivo é alcançar uma média de $100 \pm 10\%$ da radioatividade.

O método *in vivo* para avaliar a absorção cutânea tem algumas vantagens sobre o método *in vitro*, como a geração de cinética sistêmica e informação metabólica. As desvantagens são o uso de animais vivos, a necessidade de material radioativo e as diferenças na permeabilidade da pele de animais e humanos. A pele do rato que é animal mais utilizado para esse tipo de avaliação é, geralmente, mais permeável, logo pode superestimar absorção cutânea humana (US EPA, 1992).

As vantagens do método *in vitro* sobre o método *in vivo* é que aquele pode ser realizado com pele humana, podem ser feitas várias medições a partir de um único indivíduo ou indivíduos diferentes e substâncias sólidas e granuladas podem ser avaliadas. Além disso, o método *in vitro* pode ser usado para substâncias teste não marcadas radioativamente. Há, porém, desvantagens associadas ao ensaio *in vitro* destacadas em literatura, como o fato do método apresentar muitos resultados diferentes entre laboratórios, devido as diferenças de peles biológicas. Mesmo com as orientações detalhadas trazidas pela OECD para realização correta do teste, ainda há dificuldades como a orientação destacada pela OECD TG 428 que “a célula de difusão deve proporcionar uma boa vedação em torno da pele excisada”. Segundo DESMEDT, *et al.*, não é descrito como verificar se essa vedação é suficientemente adequada, e essa é uma etapa importantíssima para a verificação dos resultados. Quando o método foi testado concluiu-se que a vedação correta não se trata um processo simples (DESMEDT *et al.* 2015).

O *guideline* 428 ressalta que para uma avaliação mais refinada de absorção cutânea, são necessários os dados dos testes *in vitro* e *in vivo* considerados em conjunto. Para cessar o uso de animais para esse tipo de avaliação dependemos, então, de um aprimoramento da técnica *in vitro*.

5.4.3. Avaliação do potencial de sensibilização cutânea

A sensibilização cutânea corresponde a uma dermatite de contato alérgica (DCA), isto é, uma reação hipersensibilidade induzida por pequenos reativos químicos (haptenos). No homem, a sensibilização é caracterizada por prurido, eritema, edema, pápulas, vesículas, bolhas ou uma combinação desses. (PEASE, BASKETTER e PATLEWICZ, 2003). As técnicas utilizadas para determinar o potencial de sensibilização cutânea validadas no Brasil são as seguintes:

OECD TG 406 - Sensibilização cutânea: método *in vivo*

A avaliação da sensibilização cutânea *in vivo*, apresentada na OECD TG 406, é realizada em *guinea pig* (porquinho-da-índia). O *n* experimental de animais utilizado por esses métodos é de no mínimo 10 animais no grupo de tratamento e pelo menos 5 animais no grupo de controle. Os animais são expostos à substância teste por injeção intradérmica ou aplicação tópica, caracterizando a fase de indução à sensibilidade. Na sequência de um período de repouso de 10 a 14 dias, durante o qual espera-se uma resposta imune, os animais são expostos a mais uma dose da substância teste. A extensão e o grau da sensibilização cutânea à exposição da substância nos animais são comparados com a demonstrada nos animais controle, sujeitos a um produto inativo, e analisadas segundo a escala abaixo proposta por Magnusson e Kligman em 1969 (MAGNUSSON e KLIGMAN, 1969).

TABELA 7. ESCALA PARA AVALIAÇÃO DE SENSIBILIZAÇÃO

Escala para avaliação das reações
0 = nenhuma mudança visível
1 = eritema discreto ou irregular
2 = moderado e confluyente eritema
3 = eritema intenso e inchaço

FONTE: OECD TG 406.

Nessa revisão da OECD TG 406, de 1991, é destacada uma preocupação com possíveis melhorias em relação ao bem-estar animal. Foi ressaltado que os modelos *in vitro* ainda não estavam bem desenvolvidos e por isso ainda era necessário o uso de animais no experimento.

OECD TG 429 – Ensaio do linfonodo local

O método de avaliação da sensibilização cutânea apresentado na OECD TG 429, adotado em 2002 e revisado em 2010, utiliza ratos como cobaias para o experimento, com um mínimo de quatro animais por substância testada. O método parte do princípio de que sensibilizadores induzem à proliferação de linfócitos nos linfonodos de drenagem no local da aplicação da substância teste. Essa proliferação é proporcional à dose e à potência do alérgeno (nesse caso, a substância teste) e proporciona um meio para obtenção de uma medida quantitativa do processo de sensibilização, através da marcação radioativa com timidina 3H-metil β . Essa medida é obtida a partir da comparação entre a proliferação média de linfócitos do grupo em que a substância foi aplicada com a proliferação média no grupo controle. A razão entre essas medições fornece a informação sobre o potencial da substância para a sensibilização. Se a razão for ≥ 3 a substância é classificada como sensibilizante.

O método de avaliação da sensibilização cutânea descrito na OECD TG 429, é um método alternativo, pois diminui o sofrimento dos animais em teste em relação à avaliação descrita na OECD TG 406, uma vez que se baseia em acontecimentos imunológicos estimulados por produtos químicos durante a fase de indução de sensibilização, ao contrário do ensaio preconizado pela OECD TG 406 que exige que as reações de hipersensibilidade dérmica induzida sejam atingidas.

O método não é substitutivo, mas tem a possibilidade de reduzir o número de animais necessários para esse fim, quando se faz uso da abordagem reduzida do ensaio com linfonodo local, que pode utilizar 40% menos animais. Essa metodologia pode ser utilizada quando há necessidade de confirmar uma previsão negativa de potencial de sensibilização cutânea. Apesar das vantagens desse procedimento, existem algumas limitações que podem exigir o uso de TG 406 como, por exemplo, quando há resultados falsos negativos no ensaio com linfonodo local, nesse caso a metodologia antiga deve ser utilizada.

OECD TG 442a e 442b – Ensaio do linfonodo local: DA e BrdU-ELISA

O método para avaliação cutânea preconizado pela OECD TG 442, adotado em 2010, segue o mesmo princípio da metodologia estabelecida na OECD TG 429, isso é, também estuda a fase de indução de sensibilização da pele e fornece dados quantitativos para avaliar se a substância em teste é sensibilizante ou não. Além disso, essa metodologia tem como vantagem sobre a TG 429, a capacidade de detectar sensibilizadores cutâneos sem a necessidade de usar um marcador radioativo, eliminando o potencial de exposição à radioatividade e de eliminação de resíduos radioativos.

A OECD TG 442a trata sobre o método de ensaio com linfonodo local DA, desenvolvido pela empresa *Daicel Chemical Industries Ltd* (TAKASHI, 2008), e é baseado na medição do teor de ATP por bioluminescência para indicar um aumento do número de células nos linfonodos de drenagem. O método bioluminescente utiliza a enzima luciferase para catalisar a formação da luz a partir de ATP e luciferina de acordo com a seguinte reação:



A intensidade da luz emitida está linearmente relacionada com a concentração de ATP e é medida utilizando um luminômetro (CROUCH, *et al.*, 1993).

Assim como para a quantificação da sensibilização com marcação radioativa, a quantificação por bioluminescência corresponde a razão da proliferação média entre o grupo tratado e o grupo controle, e deve ser ≥ 1.8 para a substância em teste ser validada como sensibilizante.

A OECD TG 442b também descreve um ensaio com o linfonodo local para avaliação da sensibilização cutânea sem marcação radioativa, com o diferencial de que esse método utiliza 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) num sistema de ensaio à base de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) para medir a proliferação dos linfócitos no linfonodo de drenagem.

O método é baseado na medição do teor de BrdU para indicar um aumento do número de linfócitos. BrdU é um análogo à timidina e é igualmente incorporado ao DNA das células em proliferação. A incorporação de BrdU é medida por ELISA, técnica descrita na década de 60, que utiliza antígenos e anticorpos marcados com

enzima para detecção de moléculas biológicas. O antígeno se liga a um anticorpo, que é detectado na sequência por um outro anticorpo, o secundário que, por sua vez, possui uma enzima acoplada. Um substrato cromogênico para essa enzima muda de cor na presença do antígeno, e esse é então identificado (GAN e PATEL, 2013).

O método descrito no *guideline* OECD 442b utiliza um anticorpo específico para BrdU que também é marcado com peroxidase. Quando o substrato é adicionado, a peroxidase reage com o substrato e produz um produto corado que é quantificado por absorvância. Apesar de metodologias diferentes, a medição da proliferação dos linfócitos no linfonodo de drenagem ocorre da mesma forma que em TG 442a, a razão da proliferação média entre o grupo tratado e o grupo controle é determinada, e nesse caso deve ser ≥ 1.6 .

Da mesma forma que a diretriz apresentada na OECD TG 429, as metodologias descritas em OECD TG 442a e 442b também tem como vantagem a redução e refinamento do uso de animais em relação à primeira metodologia descrita para avaliar a sensibilização cutânea (OECD 406). Além disso, essas duas metodologias não envolvem o uso de material radioativo, o que elimina a chance de exposição do condutor do teste a tal material, e não se tem a preocupação de como acabar com os resíduos deixados.

Não só as vantagens, mas também as limitações do ensaio com linfonodo local marcado radioativamente são estendidas aos ensaios 442a e 442b, como é o caso de resultados falsos negativos detectados no experimento.

Uma outra restrição no caso do ensaio com linfonodo local medido por bioluminescência (442a), em específico, a metodologia não é apropriada para as substâncias que afetem os níveis de ATP (por exemplo, substâncias de teste que funcionam como inibidores de ATP), uma vez que a quantificação dos resultados está diretamente ligada à essa molécula.

5.4.4. Avaliação do potencial de fototoxicidade

A fototoxicidade é definida como uma resposta a partir de uma substância tóxica aplicada na pele, que é provocada ou aumentada após a exposição à luz (SPIELMANN, *et al.*, 1994).

Várias substâncias que induzem efeitos fototóxicos foram relatadas, a característica comum entre elas é a capacidade de absorver a energia da luz dentro da faixa de luz solar. De acordo com a primeira lei da fotoquímica (Lei *Grotthaus-Draper*), a fotorreação requer uma absorção suficiente de quanta de luz (SANTAMARIA e PRINO, 1972).

Apenas uma diretriz está validada no Brasil para avaliar o potencial fototóxico de substâncias, e essa é a seguinte:

OECD TG 432 – Teste de Fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU

O teste descrito pela OECD TG 432, adotado em 2004, avalia a fototoxicidade pela redução na viabilidade das células expostas à substância em teste na presença e na ausência de luz. Essas células correspondem à 3T3, uma linhagem de fibroblastos de rato imortalizada, células Balb/c 3T3, o clone 31, da Coleção Americana de Culturas Tipo (ATCC), ou da Coleção Europeia de Culturas de Células (ECACC), no Reino Unido, que foram utilizadas no estudo de validação do método.

O ensaio *in vitro* de fototoxicidade 3T3 NRU baseia-se numa comparação da citotoxicidade de um produto químico, quando testado com ou sem uma exposição solar simulada em uma dose não citotóxica de luz. A citotoxicidade nesse teste é expressa como uma redução da retenção do corante vital *Neutral Red* quando medida 24 horas após o tratamento com a substância teste e com irradiação. *Neutral Red* é um corante catiônico fraco que penetra rapidamente nas membranas celulares e acumula-se nos lisossomos das células. Alterações na membrana lisossomal levam à fragilidade do lisossomo e outras mudanças que gradualmente se tornam irreversíveis (BORENFREUND e PUERNER, 1985). Tais mudanças resultam em uma diminuição da absorção e retenção do corante vital, dessa forma é possível diferenciar as células viáveis das danificadas ou mortas.

Para prever o potencial fototóxico, as respostas de concentração obtidos na presença e na ausência de irradiação são comparados ao nível da IC50, isso é, a

concentração da substância em teste na qual a viabilidade das células é reduzida em 50% em comparação com os controles não tratados com a substância.

Uma limitação à essa metodologia está no fato dela não detectar outros efeitos adversos que podem surgir da combinação entre um produto químico e a luz, por exemplo, fotogenotoxicidade, fotoalergia ou fotocarcinogenicidade.

O ensaio *in vitro* de fototoxicidade 3T3 NRU mostrou ser preditivo para efeito de fototoxicidade em animais e em seres humanos em sua validação (ANON, 1998).

Para essa metodologia, diferente das outras citadas no trabalho, sobre testes para produtos cosméticos no âmbito da exposição dérmica a avaliação de fototoxicidade não tem uma metodologia *in vivo* descrita pela Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD).

5.4.5. Avaliação de genotoxicidade

Os efeitos tóxicos das substâncias ao material genético, isso é, genotóxicos e mutagênicos devem ser devidamente avaliados, pois essa avaliação pode se estender à carcinogenicidade. Sabe-se que a maioria dos agentes cancerígenos humanos conhecidos também são genotóxicos (ENNEVER, NOONAN e ROSENKRANZ, 1987).

Substâncias genotóxicas podem causar aberrações cromossômicas, e essas se manifestam de diferentes formas. Fragmentos de cromossomos estão associados a atividades clastogênicas (quebra de cromossomos) de uma substância, já a presença de perdas de cromossomos inteiros na célula é um indicativo de um efeito adverso de uma substância sobre as fibras do fuso durante a mitose (efeitos aneugênicos) (WAHNSCHAFFE, U. *et al.*, 2005).

No momento, apenas uma diretriz está validade a fim de determinar a genotoxicidade de compostos, sendo essa descrita a seguir:

OECD TG 487 – Teste do micronúcleo em célula de mamífero

Segundo a OECD TG 487, adotada em 2014, o teste *in vitro* de micronúcleos é um teste de genotoxicidade para a detecção de micronúcleos no

citoplasma de células em intérfase. As células utilizadas nessa metodologia são linfócitos de origem humana ou de roedores.

Micronúcleos são originados a partir de cromossomos que não são capazes de migrar para os polos da célula durante a fase anáfase da divisão celular, fase responsável pela separação das cromátides irmãs. Esse método proporciona uma base abrangente para detectar cromossomos danificados, uma vez que tanto os efeitos decorrentes de ações aneugênicas como clastogênicas podem ser identificadas em células que são expostas à substância teste por pelo menos 1 ciclo de divisão celular (KIRSCH-VOLDERS, 1997).

Uma orientação destacada no *guideline* é que para a realização do teste de micronúcleo é importante garantir que as células tenham completado a mitose durante o tratamento com a substância teste, o mesmo é válido para o controle, pois dessa forma, os cromossomos que não migraram durante a anáfase serão identificados.

Para isso é utilizado um inibidor de citocinese, a citocalasina B (Cito B), que inibe a montagem dos filamentos de actina, principais responsáveis pela separação das células após a mitose. Dessa forma, não há separação das células-filhas e se tem a formação de células binucleadas, que permitem a identificação e análise de micronúcleos apenas naquelas células que tenham concluído a mitose (FENECH, 1993).

Dados publicados indicam que a avaliação das lâminas contendo as células em teste podem ser analisadas após um período curto de tratamento, cerca de 3 a 6 horas, pois nesse tempo de experimento já é possível detectar a maioria das aneugenas e clastogenas (LORGE, *et al.*, 2006).

Uma limitação referente à avaliação com micronúcleos é que essa não permite a diferenciação de substâncias que induzem à aneugenia ou à clastogenicidade, pois o resultado da avaliação é o mesmo.

Assim como para a avaliação da fototoxicidade, a avaliação da genotoxicidade não possui uma metodologia *in vivo* descrita pela Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD).

6. CONCLUSÃO

A partir do levantamento realizado foi observado que houve um grande avanço desde a publicação dos 3 R's de Russel e Burch em 1959. Vários métodos alternativos foram desenvolvidos com o intuito de refinar, reduzir e substituir o uso de animais na experimentação nesses últimos anos. Mesmo nas metodologias *in vivo*, o refinamento dos testes para reduzir o uso de animais e/ou seu sofrimento é fortemente destacado.

Ainda existem testes sem alternativas para o uso de cobaias, além de aperfeiçoamentos a serem feitos nos existentes. Porém, uma parte da comunidade científica mundial está envolvida com objetivo de substituir totalmente o uso de cobaias em laboratório para diversos fins. A legislação contra o uso de testes em animais em diversos países também tem contribuído para reforçar essa necessidade. Nesse sentido, novas diretrizes deverão surgir a partir de esforços conjuntos, com o intuito de melhorar as técnicas alternativas à experimentação animal no desenvolvimento de produtos cosméticos.

7. REFERÊNCIAS

ALÉPÉÉ, N. *et al.* Sub-categorisation of skin corrosive chemicals by the EpiSkin reconstructed human epidermis skin corrosion test method according to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431. Elsevier, v.28, p. 131-146, 2014.

ANON. Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, ECVAM and DGXI/E/2. ATLA, v. 26, p. 7-8, 1998.

BARBERO, A.M. e FRASCH H.F. Pig and guinea pig skin as surrogates for human *in vitro* penetration studies: A quantitative review. Toxicology in Vitro. USA, v.23, p. 1-13, 2009.

BORENFREUND, E. e PUERNER, J.A. Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Lett. v. 24, p.119-124, 1985.

BOTHAM, P. A. Acute systemic toxicity. ILAR J., v. 43, p. S27-S30, 2002.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2003). Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos. Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm>. Acesso em: 14 mar. 2015.

CAZARIN, K. C.C., CORRÊA C. L., ZAMBRONE F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.40, p.290-296, 2004.

CHORILLI, M. *et al.* (2007). Toxicologia dos Cosméticos. Latin American Journal of Pharmacy, São Paulo, v.26, p. 144-154, 2007.

COMMISSION REGULATION (EC) Nº 761/2009. Official Journal of the European Union. Bruxelas, 23 jul. 2009.

CROUCH, S.P. *et al.* The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunology Methods*. v.160, p. 81-88, 1993.

DESHMUKH, G. R. *et al.* In vitro skin corrosion: Human skin model test – A validation study. Elsevier. Índia, v.26, p. 1072–1074, 2012.

DESMEDT, B. *et al.* *In vitro* Dermal Absorption: Sample Application and Seal Quality in a Franz Diffusion Cell System. *Skin Pharmacology and Physiology*. v. 28, p. 245-249, 2015.

ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods). Disponível em: < <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/>>. Acesso em: 12 abr. 2015.

ENNEVER, F.K., NOONAN, T.J. e ROSENKRANZ, H.S. The predictivity of animal bioassays and short-term genotoxicity tests for carcinogenicity and noncarcinogenicity to humans. *Mutagenesis*. v. 2, p. 73–78, 1987.

FENECH, M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research*. v. 285, p. 35-44, 1993.

FENTEM, J. H. *et al.* The ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Skin Corrosivity. *Toxicology in Vitro*. Berlim, v.12, p. 483-524, 1998.

FRANZ, T.J. Percutaneous absorption on the relevance of *in vitro* data. *J Invest Dermatol*. v. 64, p. 190-195, 1975.

GAN, S.D. e PATEL, K..R. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Investigative Dermatology* v.133, p. 1-3, 2013.

HUMANE, Society of United States (HSUS). Washington, 2003. Disponível em: <<http://www.hsus.org/ace/352>>. Acesso em: 11 abr. 2015.

ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). Disponível em: <<https://niehs.nih.gov/go/iccvam>>. Acesso em: 24 abr. 2015.

IN VITRO INTERNATIONAL. Disponível em: <<http://www.invitrointl.com>>. Acesso em: 08 mai. 2015.

KIRSCH-VOLDERS, M. Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research*. v. 392, p. 1-4, 1997.

KOJIMA, H. *et al.* A catch-up validation study of an in vitro skin irritation test method using reconstructed human epidermis LabCyte EPI-MODEL24. *Journal of Applied Toxicology*. Japão, v. 34, p. 766-744, 2014.

LANG, P. Métodos inovadores. *Revista de Manguinhos*. Instituto Oswaldo Cruz. p. 25-31, dez. 2014.

LORGE, E. *et al.* SFTG International collaborative Study on in vitro micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Research*. v. 607, p. 13-36, 2006.

LURATI, A.R. Occupational Risk Assessment and Irritant Contact Dermatitis. *Workplace Health & Safety*, Florida, v.63, p. 81-87, 2015.

MAGNUSSON, B. e KLIGMAN A.M. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J. Invest. Dermatology*. v.52, p. 268-276, 1969.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, Califórnia, v.65, p. 55-63, 1983.

NETZLAFF, F. *et al.* The human epidermis models EpiSkinw, SkinEthicw and EpiDermw: An evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. USA, v.60, p. 167–178, 2005.

OLIVEIRA, L.N., *et al.* A Lei Arouca e o uso de animais em ensino e pesquisa na visão de um grupo de docentes. *Revista Bioethikos*, São Camilo, v.7, p 139-149, 2013.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Disponível em: < <http://www.oecd.org/>>. Acesso em: 24 abr. 2015.

PEASE, S., BASKETTER C. K. e PATLEWICZ, G. Y. Contact allergy: the role of skin chemistry and metabolism. *Clin. Exp. Dermatol.* v.28, p.177-183, 2003.

Russell, W.M.S.; Burch, R.L. **The Principles of Humane Experimental Technique.** Methuen, London, 1959.

SAITO K. *et al.* Development of a new *in vitro* skin sensitization assay (Epidermal Sensitization Assay; EpiSensa) using reconstructed human epidermis. *Elsevier*. Japão, v.27, p. 2213–2225, 2013.

SANTAMARIA, L. e PRINO, G. List of the photodynamic substances: In “Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry”. North Holland Publishing Co. Amsterdam. v. 3 p. 11-35, 1972.

SCHECHTMAN, L. M. Implementation of the 3Rs (Refinement, reduction, and replacement): Validation and regulatory acceptance considerations for alternative toxicological test methods. *ILAR Journal*, v. 43, p. 85-94, 2002.

SELZER, D. A. *et al.* Strategy for in-silico prediction of skin absorption in man. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Alemanha, v. 11931, 2015.

SHEN, J. *et al.* An *in silico* skin absorption model for fragrance materials. *Food and Chemical Toxicology*. USA, v.74, p.164–176, 2014.

SIMON, G.A. e MAIBACH H.I. The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations - an overview. *Skin Pharmacology*. USA, v.13, p. 229–234, 2000.

SPIELMANN, H., *et al.* *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. *ATLA*, v. 22, p. 314-348, 1994.

STEPHENS, M. L. *et al.* The first forty years of the alternatives approach: refining, reducing, and repalcing the use of laboratory animals. Disponível em: <http://files.hsus.org/web-files/PDF/MARK_State_of_Animals_Ch_08.pdf>. Acesso em: 15 abr. 2015.

STOBBE, J.L. *et al.* Comparison of In Vivo (Draize Method) and In Vitro (Corrositex Assay) Dermal Corrosion Values for Selected Industrial Chemicals. *International Journal of Toxicology*. USA, v.22, p. 99-107, 2003.

Test No. 428: Skin Absorption: In Vitro Method. Disponível em: < http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-428-skin-absorption-in-vitro-method_9789264071087-en>. Acesso em: 04 mai. 2015.

Test No. 429: Skin Sensitisation. Local Lymph Node Assay. Disponível em: < http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-429-skin-sensitisation_9789264071100-en>. Acesso em: 04 mai. 2015.

Test No. 430: In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER). Disponível em: < <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-430-in>

vitro-skin-corrosion-transcutaneous-electrical-resistance-test-ter_9789264071124-en>. Acesso em: 20 abr. 2015.

Test No. 431: In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-431-in-vitro-skin-corrosion-human-skin-model-test_9789264071148-en>. Acesso em: 20 abr. 2015.

Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-432-in-vitro-3t3-nru-phototoxicity-test_9789264071162-en>. Acesso em: 03 mai. 2015.

Test No. 435: In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-435-in-vitro-membrane-barrier-test-method-for-skin-corrosion_9789264067318-en>. Acesso em: 23 abr. 2015.

Test No. 439: In Vitro Skin Irritation Reconstructed Human Epidermis Test Method. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-439-in-vitro-skin-irritation_9789264090958-en>. Acesso em: 23 abr. 2015.

Test No. 442A: Skin Sensitization. Local Lymph Node Assay: DA. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442a-skin-sensitization_9789264090972-en>. Acesso em: 07 mai. 2015.

Test No. 442B: Skin Sensitization. Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442b-skin-sensitization_9789264090996-en>. Acesso em: 12 mai. 2015.

Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-487-in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test_9789264224438-en>. Acesso em: 13 mai. 2015.

VINARDELL, M.P. The use of non-animal alternatives in the safety evaluations of cosmetics ingredients by the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS). Elsevier, Barcelona, v. 71, p. 198-420, 2015.

WAHNSCHAFFE, U. *et al.* Mutagenicity testing with transgenic mice. Part I: Comparison with the mouse bone marrow micronucleus test. Journal of Carcinogenesis. v.4, p. 1-14, 2005.

Washington, D.C. Environmental Protection Agency (EPA). Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. USA, 1992. 600v.