

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CARLOS AUGUSTO MATUELLA NICKEL

**VALIDAÇÃO DA OECD 442D, 2015 - ARE - NRF2 LUCIFERASE,
KERATINOSENS**

CURITIBA

2016

CARLOS AUGUSTO MATUELLA NICKEL

**VALIDAÇÃO DA OECD 442D, 2015 - ARE - NRF2 LUCIFERASE,
KERATINOSENS**

Monografia apresentada à disciplina BIO-028 Estágio Supervisionado em Biologia, como pré-requisito à conclusão do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná

Orientadora: Prof^a. Dra. Lupe Furtado Alle
Co-orientadora: Dra. Desirée Cigaran Schuck

CURITIBA

2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu avô que, apesar de não estar mais fisicamente ao meu lado, nunca esquecerei todos seus ensinamentos e orgulho demonstrado por toda conquista realizada por mim.

Aos meus pais, pela educação, amor, proteção e apoio que forneceram e continuam fornecendo ao longo de toda minha vida.

À minha irmã, a qual encontrei a minha melhor amiga e companheira para todas as etapas de minha vida.

À minha avó, tios e primos por sempre torcerem para meu sucesso.

À equipe de pesquisa de Segurança e Eficácia do Grupo Boticário, em especial para Carla A. Brohem, Desirée C. Shuck, Bruna B. Swinka, Ana C. Weihermann, Caroline Radoski e Eloisa F. Canziani, as quais me auxiliaram e ensinaram muito tanto na minha vida profissional quanto na pessoal.

À minha orientadora, Lupe F. Alle, pela disponibilidade e empolgação demonstrada, desde o início, para me auxiliar nessa etapa de minha formação.

Aos meus amigos presentes nessa fase de minha graduação, em especial para o Bruno, Leonardo, Elisangela, Talitha, Tabata e Paula, que estiveram ao meu lado tanto nos momentos bons quanto nos ruins.

À Phoebe, Fryda, Lara e Kika por alegrarem todos meus dias.

À Deus pelas oportunidades oferecidas.

*"Open your mind to what I shall
disclose, and hold it fast within you; he
who hears, but does not hold what he has
heard, learns nothing"*

(Dante Alighieri, Par. V, 40-42)

RESUMO

Em 2014, foi decretada uma normativa que reconhece 17 métodos alternativos ao uso de animais em testes laboratoriais e que estipula às indústrias cosméticas a substituição obrigatória do método *in vivo* pelo *in vitro* em até 5 anos após a validação do mesmo. O uso de metodologias *in vitro* para a avaliação de sensibilidade cutânea se tornou de extrema importância e interesse para a indústria cosmética. O teste KeratinoSens, abordado neste trabalho, consiste na avaliação da sensibilização a partir do contato direto do químico com células HaCat, as quais possuem o gene da luciferase (enzimas que catalisam reações biológicas transformando energia química em luminosa) que é expresso, ou não, junto com o elemento Nrf2-Keap1-ARE, principal regulador de respostas para stress oxidativo. O objetivo deste trabalho foi validar o método KeratinoSens dentro do Núcleo de Avaliação de Segurança e Eficácia (NASE) do Grupo Boticário. Foram realizados três testes distintos com sete químicos diferentes, sendo eles: isopropanol, ácido salicílico, ácido láctico, glicerol, álcool cinâmico, etilenoglicol e 2-mercaptobenzothiazole. Os três testes realizados passaram no controle de qualidade da técnica, e tiveram resultados conflitantes com o encontrado no protocolo de validação da OECD (442D, 2015) e na literatura, em relação aos químicos. O teste "KeratinoSens" foi reproduzível dentro do NASE.

Palavras-chave: Sensibilização. KeratinoSens. *in vitro*.

ABSTRACT

In 2014, a regulation was enacted which recognizes 17 alternative methods to the use of animals in laboratory tests and stipulates that the cosmetic industries must replace the *in vivo* method by *in vitro* in up to 5 years after the validation of the same. The use of *in vitro* methodologies for the evaluation of cutaneous sensitivity has become of extreme importance and interest for the cosmetic industry. The KeratinoSens test, discussed in this work, is the evaluation of sensitization from the direct contact of the chemical with HaCat cells, which have the luciferase gene (enzymes that catalyze biological reactions transforming chemical energy into luminous) that is expressed, or not, together with the element Nrf2-Keap1-ARE, the main regulator of responses for oxidative stress. The objective of this study was to validate the KeratinoSens method on the Núcleo de Avaliação de Segurança e Eficácia (NASE) of the Boticário Group. Three different tests were performed with seven different chemicals: isopropanol, salicylic acid, lactic acid, glycerol, cinnamic alcohol, ethylene glycol and 2-mercaptobenzothiazole. The three tests were passed in the quality control of the technique, and had conflicting results with the one found in the OECD validation protocol (442D, 2015) and in the literature, regarding the chemicals. The "KeratinoSens" test was reproducible on the NASE.

Key-words: Sensitization. KeratinoSens. *in vitro*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - PROCESSO DE SENSIBILIZAÇÃO DA PELE..	15
Figura 2. DESENHO EXPERIMENTAL DA PRIMEIRA PLACA DE DILUIÇÃO.	20
Figura 3. ESQUEMA DAS TRÊS DILUIÇÕES REALIZADAS ATÉ A ADIÇÃO DO QUÍMICO NA PLACA COM CÉLULAS	21
Figura 4. CURVA DOSE-RESPOSTA E VIABILIDADE DO CONTROLE POSITIVO DO TESTE 2	26
Figura 5. CRITÉRIOS PARA UMA SUBSTÂNCIA SER CONSIDERADA SENSIBILIZANTE	27
Figura 6. GRÁFICOS DA INDUÇÃO DA ATIVIDADE DA LUCIFERASE DOS SETE QUÍMICOS TESTADOS EM RELAÇÃO A CONCENTRAÇÃO DOS MESMOS	27
Figura 7. CURVA DOSE - RESPOSTA DO COMPOSTO 2-MERCAPTOBENZOTHAZOLE	31
Figura 8. CURVAS DOSE-RESPOSTA DOS QUÍMICOS NÃO - SENSIBILIZANTES	38
Figura 9. CURVAS DOSE-RESPOSTA DOS QUÍMICOS SENSIBILIZANTES.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. INFORMAÇÕES SOBRE OS QUÍMICOS UTILIZADOS NA REALIZAÇÃO DO TESTE	19
Tabela 2 - SOLUÇÕES E REAGENTES USADOS NA VALIDAÇÃO DO MÉTODO..	24
Tabela 3 - EQUIPAMENTOS USADOS NA VALIDAÇÃO DO MÉTODO	24
Tabela 4. RESULTADOS OBTIDOS NOS CONTROLES POSITIVOS E NEGATIVOS NOS TRÊS TESTES REALIZADOS	25
Tabela 5. VALORES DO EC1.5 RESULTANTES DOS TRÊS TESTES REALIZADOS EM COMPARAÇÃO COM O VALOR DE REFERÊNCIA APRESENTADO PELA OECD	28
Tabela 6. VALORES DE IMAX ENCONTRADOS NAS QUATRO SUBSTÂNCIAS NÃO SENSIBILIZANTES DO TESTE	29
Tabela 7. VALORES DE IMAX ENCONTRADOS NAS QUATRO SUBSTÂNCIAS SENSIBILIZANTES DO TESTE	29
Tabela 8. VALOR DO IC70 DOS COMPOSTOS NOS TRÊS TESTES.	30
Tabela 9. VIABILIDADE CELULAR SUPERIOR A 70% DOS QUÍMICOS QUANDO <i>FOLD INDUCTION</i> MAIOR QUE 1.5	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOP - *Adverse Outcome Pathway*

ARE - *Antioxidant Response Element*

Concea - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DMSO - Dimethyl sulfoxide

DPRA - *Direct Peptide Reactivity Assay*

EC1.5 - Concentração em que o químico induz a luciferase 50% a mais que o controle do teste

h-CLAT - *Human Cell Line Activation Test*

IATA - *Integrated Approches to Testing and Assessment*

IC70 - Concentração em que 70% das células se encontram viáveis

IL1 - Interleucina 1

IL2 - Interleucina 2

Imax - Máxima indução da atividade da luciferase em relação ao controle negativo

Keap-1 - *Kelch-like ECH-associated protein 1*

LLNA - *Local lymph node assay*

MTT - *Thiazolyl Blue Tetrazolium bromide*

MUSST - *Myeloid U937 skin sensitisation test*

Nrf2 - *Nuclear Factor (erythroid-derived 2)-like 2*

OECD - *Organisation for Economic Cooperation and Development*

PBS - *Phosphate buffered saline*

RENAMA - Rede Nacional de Métodos Alternativos

SCCS - *Scientific Committee on Consumer Safety*

SOP - *Standard operating procedure*

TNF - *Tumor necrosis factor*

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

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	MÉTODOS ALTERNATIVOS NA INDÚSTRIA COSMÉTICA.....	13
1.2	SENSIBILIZAÇÃO DA PELE	14
1.3	TESTE DA ATIVIDADE DA LUCIFERASE NRF2 (KERATINOSENS)	16
1.4	OBJETIVO.....	17
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	18
2.1	LINHAGEM CELULAR	18
2.2	PROCEDIMENTO	18
2.3	ANÁLISE DOS DADOS	22
2.4	SOLUÇÕES E EQUIPAMENTOS.....	23
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
3.1	CONTROLE DE QUALIDADE	25
3.2	INDUÇÃO DA ATIVIDADE DA LUCIFERASE.....	26
3.3	VIABILIDADE CELULAR.....	29
4	CONCLUSÃO.....	32
5	REFERÊNCIAS.....	33
6	APÊNDICES.....	37
6.1	APÊNDICE 1 – CURVAS DOSE-RESPOSTA DOS QUÍMICOS NÃO - SENSIBILIZANTES	38
6.2	APÊNDICE 2 – CURVAS DOSE-RESPOSTA DOS QUÍMICOS SENSIBILIZANTES.....	39

1 INTRODUÇÃO

1.1 MÉTODOS ALTERNATIVOS NA INDÚSTRIA COSMÉTICA

Produtos cosméticos, em geral, são raramente relacionados com sérios problemas de saúde. Entretanto, não há como garantir a ausência completa de riscos de sensibilização e reação adversa em toda a população. Neste contexto, as indústrias cosméticas precisam dar uma atenção especial aos aspectos de segurança dos produtos, principalmente no que se refere a uso em longo prazo. Atualmente no Brasil quem regulamenta esta questão é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), mas muitas informações e até mesmo legislações tomadas como base em grandes indústrias cosméticas brasileiras são européias. Na Europa, por exemplo, existe um Comitê Científico sobre Segurança dos Consumidores, o SCCS (*Scientific Committee on Consumer Safety*), que é responsável por emitir pareceres sobre riscos de matérias-primas e/ou produtos à segurança da população (Vinardell, 2014).

No Brasil foi decretada uma normativa (Resolução N°18/2014) reconhecendo 17 métodos alternativos ao uso de animais em testes laboratoriais provenientes da indústria cosmética (sugeridos pela Conceia - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). Segundo o site da RENAMA (Rede Nacional de Métodos Alternativos), essa resolução prevê que os testes *in vivo* devem ser substituídos obrigatoriamente em 5 anos pelos seus respectivos métodos alternativos. Esse tema remete ao princípio dos 3 R's para experimentação animal, sendo eles: redução/*reduction* (redução da quantidade de animais usadas por teste), substituição/*replacement* (determina que um determinado objetivo seja alcançado sem o uso de animais vertebrados vivos) e refinamento/*refinement* (visa o alívio ou minimização da dor, sofrimento ou *stress* do animal testado).

Métodos *in vitro* para avaliar reações de sensibilização na pele tem sido considerados cientificamente válidos, no entanto, combinações com demais testes, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, ainda são necessárias para se obter um resultado confiável dentro de "Abordagens integradas de teste e avaliações" (IATA)(Reisinger *et al.*, 2014). Na Europa, a legislação das indústrias cosméticas impôs o banimento de animais para a avaliação da sensibilização da pele a partir do ano de 2013 (Andres *et al.*, 2013). Sendo assim, um dos objetivos principais da *Cosmetics*

Europe Skin Tolerance Task Force tem sido identificar e avaliar métodos de ensaio que permitam a previsão do potencial sensibilizante de um determinado químico, sem a necessidade de novos testes em animais, sendo isso de extrema importância para a indústria cosmética (Maxwell *et al.*, 2011). Visando a otimização das análises *in vitro* e da IATA, testes tem sido desenvolvidos, os quais mimetizam separadamente etapas diferentes de uma AOP (*Adverse Outcome Pathway*) como por exemplo, para a fase de haptenação/modificação de proteínas da epiderme, o teste *Direct Peptide Reactivity Assay* (DPRA) é usado. Para a fase de ativação dos queratinócitos e células dendríticas, testes como *Human Cell Line Activation Test* (h-CLAT), *Myeloid U937 skin sensitisation test* (MUSST) e *KeratinoSens* foram desenvolvidos (Reisinger *et al.*, 2014). Anteriormente à abolição do uso de animais em testes, para a avaliação da sensibilização, era realizado o teste de LLNA (*Local lymph node assay*).

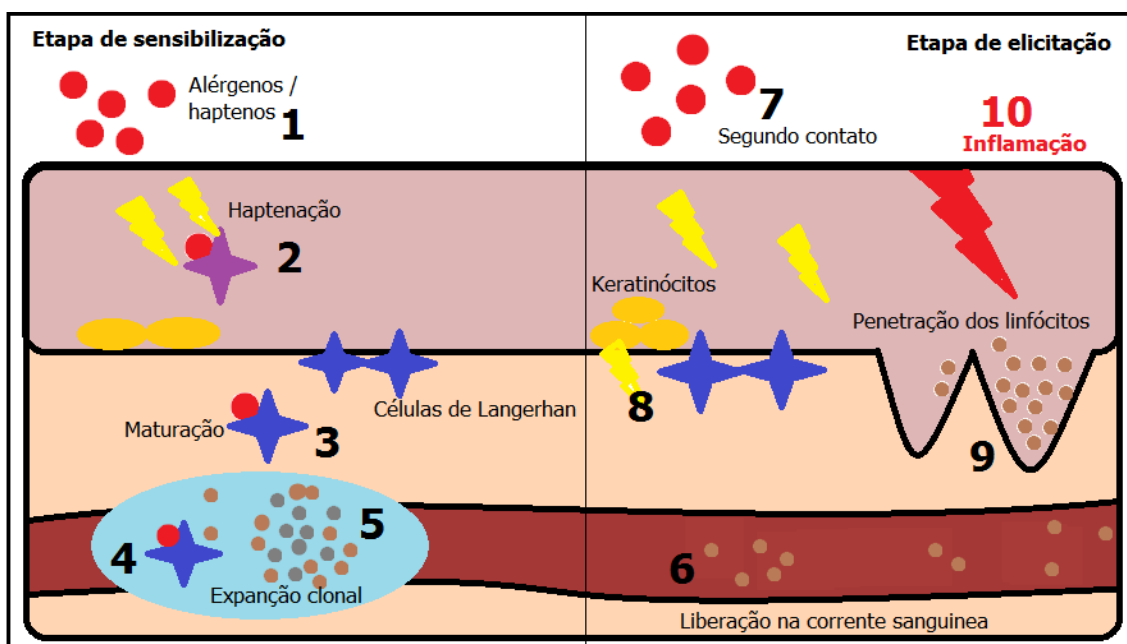
1.2 SENSIBILIZAÇÃO DA PELE

Um químico pode ser classificado como sensibilizante quando, segundo a *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* (UN GHS), causa uma resposta alérgica posterior ao seu contato com a pele (OECD 442D, 2015). Uma vez sensibilizado, um indivíduo permanece assim para o resto da vida e, por isso, é importante o conhecimento se um determinado químico possui, ou não, potencial de sensibilização cutânea (Benigni *et al.*, 2016).

Um dos tipos mais comuns de dermatite é a do tipo IV, também chamada de hipersensibilização cutânea ou dermatite de contato, que ocorre, pelo menos uma vez, em cerca de 15-20% da população (Thyssen *et al.*, 2007; Bruckner *et al.*, 2000). A dermatite de contato acontece com a reação mediada por linfócitos T após a exposição de um alérgeno na pele (Kimber *et al.*, 2004). A dermatite de contato é dividida em duas etapas, a etapa de sensibilização e a de elicitação (Goebel *et al.*, 2012). Durante a fase de sensibilização, haptenos (alérgenos/ substâncias não proteicas que sozinhas, não conseguem induzir resposta imunológica) entram em contato com a pele e se ligam a proteínas MHC Classe II de células da pele. Células de *Langerhan* (células móveis e dendríticas responsáveis pela imunovigilância cutânea), que correspondem a cerca de 4% das células epidérmicas (Filho *et al.*, 2004), se ligam ao complexo hapteno-proteína e se diferenciam em células

dendríticas maduras, assim, possibilitando a apresentação da proteína haptenada a células T naïve (células provenientes de órgãos linfóides, que nunca foram expostas a um antígeno). Assim que apresentadas, inicia-se a expansão clonal das células T específicas e de memória, as quais são distribuídas pela corrente sanguínea, iniciando, assim, o primeiro processo de sensibilização do indivíduo (Wong *et al.*, 2015). Com a reexposição do alérgeno, inicia-se a etapa de elicitação. Células de *Langerhan* apresentam o antígeno as células T específicas que o reconhecem e liberam diversas citocinas inflamatórias (IL1, IL2, TNF) e ativam os queratinócitos, primeiras células da epiderme a entrar em contato com o alérgeno, que liberam citocinas inflamatórias (Natsch and Emter, 2008). As células T de memória se infiltram no sítio de contato do hapteno e desencadeia-se uma nova resposta alérgica (Figura 1) (Wong *et al.*, 2015).

Figura 1 - PROCESSO DE SENSIBILIZAÇÃO DA PELE.



1- Contato do alérgeno com a pele. 2- Haptenação. 3- Maturação/diferenciação das células de *Langerhan* ligadas ao complexo hapteno-proteína. 4/5- Expansão clonal das células. 6- Liberação das células na corrente sanguínea. 7- Reexposição do alérgeno. 8- Ativação dos queratinócitos/liberação de citocinas inflamatórias. 9- Penetração dos linfócitos na pele. 10- Inflamação. ADAPTADO DE: Wong *et al.*, 2015.

As reações moleculares de uma resposta alérgica se iniciam com a ligação covalente de soluções eletrofílicas no centro nucleofílico de proteínas da pele (OECD 442D, 2015). O segundo evento ocorre nos queratinócitos da epiderme e incluem respostas inflamatórias, assim como a expressão de genes associados a

vias de sinalização antioxidantes / elementos de respostas eletrofílicas (ARE - *Adenylate-uridylylate-rich*), os quais são a base do teste de KeratinoSens (Ainscough *et al.*, 2013). O terceiro evento da sensibilização é a ativação de células dendríticas associadas à expressão de marcadores específicos da superfície celular, quimiocinas e citocinas. Finalmente, o quarto evento é caracterizado pela ativação de células T (Reisinger *et al.*, 2015). Essas quatro etapas descritas formam um AOP (*Adverse Outcome Pathway*), de forma a descrever as principais etapas do processo de sensibilização, tanto alterações moleculares quanto celulares, e correlacionar com métodos que poderiam elucidar as respostas de cada uma dessas fases (Ankley *et al.*, 2010). O conjunto de testes nos fornecem uma resposta sobre o potencial de sensibilização de um químico (OECD 442D, 2015).

1.3 TESTE DA ATIVIDADE DA LUCIFERASE NRF2 (KERATINOLENS)

O teste de avaliação da atividade da luciferase Nrf2 (KeratinoleNS, OECD 442D, 2015) tem como material de estudo principal uma linhagem de células aderentes derivadas das células imortalizadas HaCat. Essa linhagem foi transformada com um plasmídeo contendo o gene da luciferase sob controle transcricional de um promotor fundido com o elemento Nrf2-Keap1-ARE, principal regulador de respostas citoprotetoras para stress oxidativo e eletrofílico, sendo esse, induzido pela maioria dos sensibilizantes (Ade *et al.*, 2009; Natsch, 2010; Natsch and Emter, 2008;). Luciferases são enzimas que catalisam reações biológicas transformando energia química em energia luminosa, o que permite a leitura quantitativa da expressão do gene (por luminescência). Ao ser adicionada a diluição dos químicos sobre as células HaCat, os genes do elemento ARE serão expressos e, devido ao compartilhamento do mesmo promotor, o gene da luciferase também será expresso (OECD 442D, 2015). Devido a esses fatores, quanto maior a atividade sensibilizante de um químico, maior será a luminescência produzida pela célula. Entretanto, apenas com os resultados obtidos na avaliação da atividade da luciferase Nrf2 não é possível inferir se um químico é ou não sensibilizante, apenas se possui potencial para o mesmo. Para uma conclusão concreta, devem ser realizados demais testes em paralelo (metodologias hCLAT e DPRA).

1.4 OBJETIVO

Validar a OECD 442D, 2015 (in vitro skin sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method) internamente no Núcleo de Avaliação de Segurança e Eficácia (NASE) do Grupo Boticário, São José dos Pinhais - PR;

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 LINHAGEM CELULAR

As células utilizadas para a realização do teste foram as HaCat. Células HaCat são linhagens imortalizadas e, derivadas de queratinócitos humanos transfectados por um plasmídeo estável. O plasmídeo em questão possui o gene da Luciferase que consta com o mesmo controle transcricional de um promotor fundido com o elemento ARE a partir do gene Nrf2 (*Nuclear factor (erythroid-derived2)-like 2*) o qual regula a expressão de anti-oxidantes que realizam proteção contra danos oxidativos causados por ferimentos e/ou inflamações (Ryan *et al.*, 2004). Para a realização do teste, as células devem estar em passagem inferior a 25 e com 80-90% de confluência. As células são cultivadas com o meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) 9,1% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de antibiótico (Geneticin).

2.2 PROCEDIMENTO

O método é organizado em dias da semana específicos, começando na sexta-feira. Duas placas de cultivo da linhagem HaCat são tripsinizadas e passadas na proporção de 1:6 e 1:12, onde as placas com maior densidade celular serão utilizadas na segunda-feira e as placas com menor densidade celular na terça-feira (nessa primeira etapa, as células ainda são cultivadas com DMEM 9,1%). Na segunda-feira, as células que foram passadas 1:6 são plaqueadas em placas de 96 poços. Cada réplica do teste consiste em 3 placas de 96 poços brancas, para a leitura de luminescência, e, 1 placa de 96 poços transparente para o teste de viabilidade celular. São adicionadas 10.000 células por poço em meio DMEM 9,1% sem antibiótico, exceto no poço H-12, o qual é utilizado como branco. As células são então incubadas por 24hrs em 37°C e 5-6% de CO₂. Na terça-feira é realizada a adição dos químicos (Tabela 1) em seus respectivos poços.

Tabela 1. INFORMAÇÕES SOBRE OS QUÍMICOS UTILIZADOS NA REALIZAÇÃO DO TESTE.

Químico	Fórmula estrutural	CAS	Solubilidade	Estado físico	Peso molecular	Densidade	Concentração estoque	Armazenamento
Isopropanol	C ₃ H ₈ O	67-63-0	DMSO	Líquido	60,1	0,78g/mol	99,50%	T. ambiente
Ácido salicílico	C ₇ H ₆ O ₃	69-72-7	DMSO	Sólido	138,2	N/A	99%	T. ambiente
Ácido láctico	C ₃ H ₆ O ₃	50-21-5	DMSO	Líquido	90,08	1,209g/mol	90%	T. ambiente
Glicerol	C ₃ H ₈ O ₃	56-81-5	DMSO	Líquido/vicoso	92,09	1,25 g/mol	99%	T. ambiente
Álcool cinâmico	C ₉ H ₁₀ O	104-54-1	DMSO	Sólido	134,18	N/A	98%	T. ambiente
Etilenoglicol	C ₂ H ₄ (OH) ₂	97-90-5	DMSO	Líquido	198,22	1,051 g/mol	98%	4°C
2-Mercaptoben-zothiazole	C ₇ H ₅ NS ₂	149-30-4	DMSO	Sólido	167,25	N/A	97%	T. ambiente
Cinamaldeído (controle positivo)	C ₉ H ₈ O	104-55-2	DMSO	Líquido	132,16	1,05g/mol	95%	T. ambiente

FONTE: O AUTOR.

Todos os químicos usados devem ser diluídos em DMSO numa concentração estoque inicial de 200mM. O controle positivo contudo tem sua concentração estoque de 6,4mM. A partir da solução 200mM, a primeira placa de diluição é preparada. Nas linhas A-G são adicionados os compostos químicos testados, na linha H contudo é utilizada para o controle negativo (DMSO), controle positivo (Cinamaldeído) e o poço branco. São adicionados 100µL de DMSO em todos os poços da placa, exceto na coluna 12 que são adicionados 200 µL das soluções 200mM, e no poço H-11 onde é adicionado 200 µL da solução 6,4mM de Cinamaldeído. Após todos os poços preenchidos (com exceção do poço branco H-12), é realizada a diluição seriada (fator de diluição = 2) dos ativos onde, 100µL das soluções 200mM da coluna 12 são transferidos para a coluna 11, homogeneizados 3x e então são passados 100µL da coluna 11 para a 10 e assim sucessivamente até a coluna 1, com atenção para a diluição do controle positivo pois a mesma acaba na coluna 7, conforme a figura 2.

FIGURA 2. DESENHO EXPERIMENTAL DA PRIMEIRA PLACA DE DILUIÇÃO

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A comp.1 0.098	comp.1 0.195	comp.1 0.39	comp.1 0.78	comp.1 1.56	comp.1 3.125	comp.1 6.25	comp.1 12.5	comp.1 25	comp.1 50	comp.1 100	comp.1 200
B comp.2 0.098	comp.2 0.195	comp.2 0.39	comp.2 0.78	comp.2 1.56	comp.2 3.125	comp.2 6.25	comp.2 12.5	comp.2 25	comp.2 50	comp.2 100	comp.2 200
C comp.3 0.098	comp.3 0.195	comp.3 0.39	comp.3 0.78	comp.3 1.56	comp.3 3.125	comp.3 6.25	comp.3 12.5	comp.3 25	comp.3 50	comp.3 100	comp.3 200
D comp.4 0.098	comp.4 0.195	comp.4 0.39	comp.4 0.78	comp.4 1.56	comp.4 3.125	comp.4 6.25	comp.4 12.5	comp.4 25	comp.4 50	comp.4 100	comp.4 200
E comp.5 0.098	comp.5 0.195	comp.5 0.39	comp.5 0.78	comp.5 1.56	comp.5 3.125	comp.5 6.25	comp.5 12.5	comp.5 25	comp.5 50	comp.5 100	comp.5 200
F comp.6 0.098	comp.6 0.195	comp.6 0.39	comp.6 0.78	comp.6 1.56	comp.6 3.125	comp.6 6.25	comp.6 12.5	comp.6 25	comp.6 50	comp.6 100	comp.6 200
G comp.7 0.098	comp.7 0.195	comp.7 0.39	comp.7 0.78	comp.7 1.56	comp.7 3.125	comp.7 6.25	comp.7 12.5	comp.7 25	comp.7 50	comp.7 100	comp.7 200
H blank solvent	blank solvent	blank solvent	blank solvent	blank solvent	blank solvent	0.4 mM cinn. ald.	0.8 mM cinn. ald.	1.6 mM cinn. ald.	3.2 mM cinn. ald.	6.4 mM cinn. ald.	no cells blank

FONTE: ECVAM DB-ALM *Protocol* n°155.

Após a finalização da primeira placa de diluição, uma segunda placa é então preparada onde são adicionados 240 μ L de DMEM 1% sem antibiótico em todos os poços, e então, 10 μ L dos químicos previamente diluídos são adicionados em seus respectivos poços, assim, diluindo mais 25x os mesmos. As placas com células são então retiradas da incubadora e tem o seu meio descartado e substituído por 150 μ L de DMEM 1% sem antibiótico e então, 50 μ L dos ativos 25x diluídos são colocados nas 4 placas (3 brancas e 1 transparente)(Figura 3). As placas são cobertas com adesivo selador para evitar a contaminação cruzada de químicos voláteis e são incubadas por 48 horas em 37°C e 5-6% de CO₂.

FIGURA 3. ESQUEMA DAS TRÊS DILUIÇÕES REALIZADAS ATÉ A ADIÇÃO DO QUÍMICO NA PLACA COM CÉLULAS.

Primeira placa de diluição (concentração em millimolar)												
Colunas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Conc mM (Linhas A-G)	0,097	0,195	0,39	0,781	1,562	3,125	6,25	12,5	25	50	100	200
Linha H- controles	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	0,4 mM Cinam.	0,8 mM Cinam.	1,6 mM Cinam.	3,2 mM Cinam.	6,4 mM Cinam.	Branco - sem células

Segunda placa de diluição (concentração em μmolar)												
Diluição de 25x da primeira placa (10μl + 240μl DMEM 1% sem antibiótico)												
conç μM (Linhas A-G)	3,906	7,812	15,625	31,25	62,5	125	250	500	1000	2000	4000	8000
Linha H- controles	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	16 μM Cinam.	32 μM Cinam.	64 μM Cinam.	128 μM Cinam.	256 μM Cinam.	Branco - sem células

Placa final: Com células (concentração em μmolar)												
Diluição de 4x da segunda placa (50μl da placa 2 + 150μl DMEM 1% s/ antibiótico) - 3 placas brancas e 1 transparente												
conç μM	0,976	1,953	3,906	7,812	15,625	31,25	62,5	125	250	500	1000	2000
A	Químico 1	Químico 1	Químico 1	Químico 1	Químico 1	Químico 1	Químico 1	Químico 1	Químico 1	Químico 1	Químico 1	Químico 1
B	Químico 2	Químico 2	Químico 2	Químico 2	Químico 2	Químico 2	Químico 2	Químico 2	Químico 2	Químico 2	Químico 2	Químico 2
C	Químico 3	Químico 3	Químico 3	Químico 3	Químico 3	Químico 3	Químico 3	Químico 3	Químico 3	Químico 3	Químico 3	Químico 3
D	Químico 4	Químico 4	Químico 4	Químico 4	Químico 4	Químico 4	Químico 4	Químico 4	Químico 4	Químico 4	Químico 4	Químico 4
E	Químico 5	Químico 5	Químico 5	Químico 5	Químico 5	Químico 5	Químico 5	Químico 5	Químico 5	Químico 5	Químico 5	Químico 5
F	Químico 6	Químico 6	Químico 6	Químico 6	Químico 6	Químico 6	Químico 6	Químico 6	Químico 6	Químico 6	Químico 6	Químico 6
G	Químico 7	Químico 7	Químico 7	Químico 7	Químico 7	Químico 7	Químico 7	Químico 7	Químico 7	Químico 7	Químico 7	Químico 7
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	4 μM Cinam.	8 μM Cinam.	16 μM Cinam.	32 μM Cinam.	64 μM Cinam.	Branco - sem células

Cinam.: Cinamaldeído/controle negativo. FONTE: *KeratinSens Evaluation Sheet* - ECVAM, 2013.

Quinta-feira (após 48hrs de incubação) é realizada a leitura das placas brancas e a adição do MTT na placa transparente. Para a realização da leitura das placas brancas deve-se tomar o cuidado de que todas fiquem a mesma quantidade de tempo com o buffer de lise, então, é feita a lavagem/adição de uma em uma. Primeiramente uma placa tem seu meio de cultura com os químicos removido e a mesma é lavada com 150μL de PBS [1x], posteriormente, 20μL do buffer de lise [1x] são adicionados cuidadosamente para evitar a formação de bolhas nos poços e então a placa fica 20min em temperatura ambiente. Esse mesmo processo é realizado a cada 10 minutos em cada placa, assim, todas são submetidas ao buffer de lise pelo mesmo tempo. Após os 20 minutos em temperatura ambiente, 50μL do

substrato de luciferase são adicionados em todos os poços da placa e, rapidamente, é feita a leitura da mesma no espectrofotômetro de placas. No programa de leitura, "SoftMax Pro", deve-se fazer o desenho da placa e programado para realizara leitura de luminescência com integração da atividade da luciferase em 1500 milissegundos.

Para o teste de viabilidade celular, o meio da placa transparente é descartado e substituído por 200µL de DMEM 1%. 27µL de uma solução de MTT (5mg/mL em PBS[1x]) são adicionados diretamente em cada poço. A placa é então coberta por adesivo selante e incubada novamente em 37°C e 5-6% de CO₂ por 4 horas. Após as 4 horas o meio é removido e são adicionados 200µL de uma solução SDS 10% (diluído em PBS [1x]) e a placa é novamente coberta por adesivo selante e incubada sobre as mesmas condições anteriores *overnighte*, no dia seguinte, a placa é homogeneizada por 10min e lida no espectrofotômetro de placas, também no programa "SoftMax Pro" na absorção de 600nm. Caso o experimento tenha sido plaqueado na terça feira e a adição do MTT/SDS 10% tenha sido na sexta feira, a placa pode fica incubada durante o final de semana e lida na segunda feira.

2.3 ANÁLISE DOS DADOS

Para cada químico analisado, em cada concentração testada, foi feita a comparação da indução do gene em relação ao controle negativo (DMSO). Em cada poço, foi conferido se existe indução maior que 1,5x (50% a mais de atividade do gene). Esse valor de indução é chamado de "*fold induction*". Além desse dado, valores como I_{max}, EC_{1,5} e IC₇₀ são calculados. O valor "I_{max}" é a concentração em que ocorre a máxima indução da atividade da luciferase, EC_{1,5} é a concentração em que o químico atinge a indução de 50% a mais que o controle do teste e, IC₇₀ é a concentração em que 70% das células, por poço testado, se encontram viáveis (em contrapartida, 30% das células mortas). Para realizar o cálculo destes valores, devem-se seguir as seguintes fórmulas (fórmulas baseadas na OECD 442D, 2015):

- Equação para cálculo do *fold induction*:

"*Fold induction* = (V_{amostra} – V_{branco})/(V_{dms}o – V_{branco})", onde:

V_{amostra}: O valor de leitura do poço com o tratamento químico;

V_{branco}: A leitura dos poços brancos (sem célula e sem tratamento);

V_{dms}o: Leitura média da leitura dos poços contendo células e solvente (controle negativo);

- Equação para cálculo do EC_{1,5}:

" $EC_{1,5} = (C_b - C_a) \times ([1,5 - fl_a] / [Fl_b - Fl_a]) + C_a$ ", onde:

C_a: A menor concentração (em uM) com >1,5 "Foldinduction";

C_b: A maior concentração (em uM) com <1,5 "Foldinduction";

Fl_a: É o "fold induction" medido pela menor concentração >1,5 fold induction;

Fl_b: É o "fold induction" medido pela maior concentração <1,5 fold induction;

l_a e l_b são as médias das 3 repetições dos poços.

- Equação para cálculo da viabilidade celular:

"Viabilidade = (V_{amostra} - V_{branco}) / (V_{dms} - V_{branco}) x 100", onde:

V_{amostra}: A leitura de absorbância do MTT lida no nos poços;

V_{branco}: A leitura de absorbância do MTT lida nos poços brancos;

V_{dms}: A leitura média da absorbância do MTT lida nos poços de controle negativo;

- Equação para cálculo do IC₅₀:

" $IC_{50} = (C_b - C_a) \times ([100 - x] - V_a / V_b - V_a) + C_a$ ", onde:

C_a: A menor concentração em uM com > % redução em viabilidade;

C_b: A maior concentração de uM com < % redução em viabilidade;

V_a: A % de viabilidade na menor concentração com > % redução em viabilidade;

V_b: A % de viabilidade na maior concentração com < % redução em viabilidade;

Para a análise estatística do trabalho, os dados brutos gerados no programa "SoftMax Pro" foram usados para preencher a tabela "KeratinoSens_Evaluation-Sheet" disponibilizada pelo site da ECVAM, junto com o SOP (*standard operating procedure*) do teste. A tabela gera automaticamente os dados estatísticos para a análise dos resultados.

2.4 SOLUÇÕES E EQUIPAMENTOS

Para a padronização do teste, segundo a OECD 442D, 2015, foram utilizadas as seguintes soluções e equipamentos (Tabela 2 e 3).

TABELA 2 - SOLUÇÕES E REAGENTES USADOS NA VALIDAÇÃO DO MÉTODO.

Solução / Reagente	Marca	Referência	Lote	Validade
DMSO	Sigma	D8418	SHBB7881V	11/2016
Isopropanol	Merck	K45746934 431	K45446934	06/2019
Ác. Salicílico	Sigma	247588	MKBN3092V	N/A
Ác. Láctico	Sigma	69775	MKKBK1806V	02/2017
Glicerol	Sigma	G2025	SHBC7169V	05/2018
Álcool Cinâmínico	Sigma	108197	STBD3735V	05/2019
Etilenoglicol	Sigma	335681	SHBF7061V	11/2020
2-Mercaptobenzothiazole	Sigma	3302	MKBR2057V	02/2020
Cinamaldeído	Sigma	C80687	MKBR6550V	05/2020
SDS	Sigma	17-1313-01	12B240018	01/2017
MTT	Sigma	M5655	MKBR4419V	06/2019
Buffer de lise	Prômege	E1941	146266	12/2018
Substrato de luciferase	Prômege	E1501	146938	N/A

FONTE: O AUTOR

TABELA 3 - EQUIPAMENTOS USADOS NA VALIDAÇÃO DO MÉTODO.

Equipamento	TAG
Fluxo laminar	FL002 / FL003
Incubadora	IC003
Centrífuga	Pat: 059877
Espectrofotômetro	LP001
Balança	BL002

FONTE: O AUTOR

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CONTROLE DE QUALIDADE

Para se obter confiabilidade nos resultados obtidos, três critérios devem ser seguidos para que os experimentos realizados sejam aceitos. Com base nas informações da OECD 442D, os três parâmetros são: o controle positivo (cinamaldeído) deve ter seu valor de EC1.5 acima do limiar em pelo menos uma das concentrações testadas e, ainda, ter seu valor dentro dos dois desvios padrões da média (baseada no conjunto de dados de validação do método), entre 7 e 30 μM . Ainda sobre o controle positivo, a indução média do cinamaldeído deve estar entre 2 e 8. No caso do não cumprimento desse último critério, deve ser feita a análise criteriosa da curva dose-resposta, ver se existe uma relação direta entre o aumento da dose com o aumento da atividade da luciferase. Por fim, a variação dos resultados dos seis poços contendo apenas DMSO (controle negativo), diluído no meio de cultivo específico, não deve ser superior a 20%, se a variabilidade for maior, os resultados devem ser descartados. Os resultados obtidos para cada uma das réplicas foram estão na tabela 4.

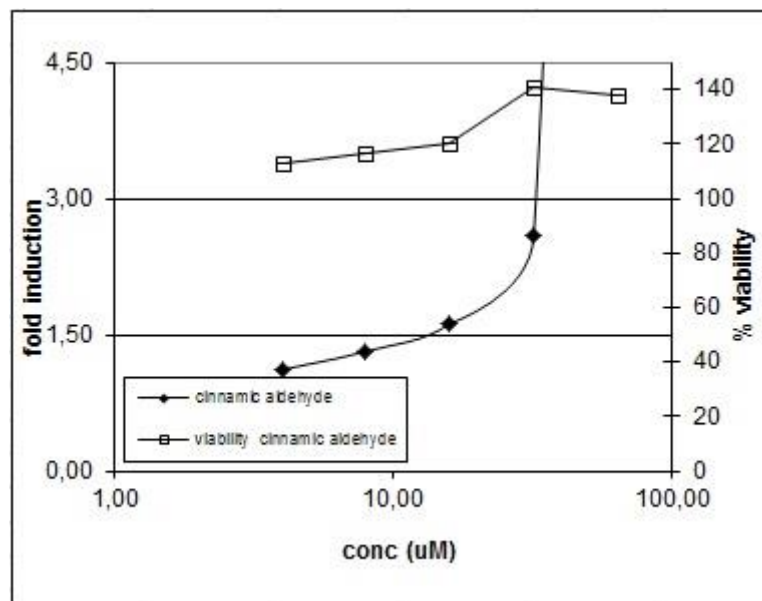
TABELA 4. RESULTADOS OBTIDOS NOS CONTROLES POSITIVOS E NEGATIVOS NOS TRÊS TESTES REALIZADOS.

	EC 1.5	Indução em 64 μM	% Variação do controle negativo
Teste 1	13,33	2,95	10,90876
Teste 2	14,00	30,30	17,58358
Teste 3	22,21	2,39	17,91746

Em verde são os resultados aprovados no teste e em vermelho o resultado acima do recomendado. FONTE: O AUTOR

A variação do controle negativo, nos três testes, foi inferior a 20%, com os resultados mostrando-se reprodutíveis nas diferentes réplicas. Como são observados, todos os testes passaram em relação ao critério do valor do EC 1.5, que deve ficar entre 7 μM e 30 μM . Para a indução do gene na concentração de 64 μM , onde o valor esperado deve variar entre 2 e 8, o teste 2 teve o resultado 3,78x maior que o máximo aceito, devido a isso, a curva dose-resposta foi analisada separadamente (Figura 4).

FIGURA 4. CURVA DOSE-RESPOSTA E VIABILIDADE DO CONTROLE POSITIVO DO TESTE 2.



A linha com quadrados abertos aponta a viabilidade celular e a linha com losangos fechados indica a indução da atividade da luciferase. FONTE: O AUTOR

É observado que conforme aumenta a concentração do cinamaldeído, maior é a indução do gene. Em paralelo, a viabilidade das células aumenta conforme a concentração, mostrando que o químico não é citotóxico. O valor de 30,30 obtido pode ser resultante do aumento da quantidade de células nos poços com maiores concentrações (32 μ M e 64 μ M), como visto no gráfico.

3.2 INDUÇÃO DA ATIVIDADE DA LUCIFERASE

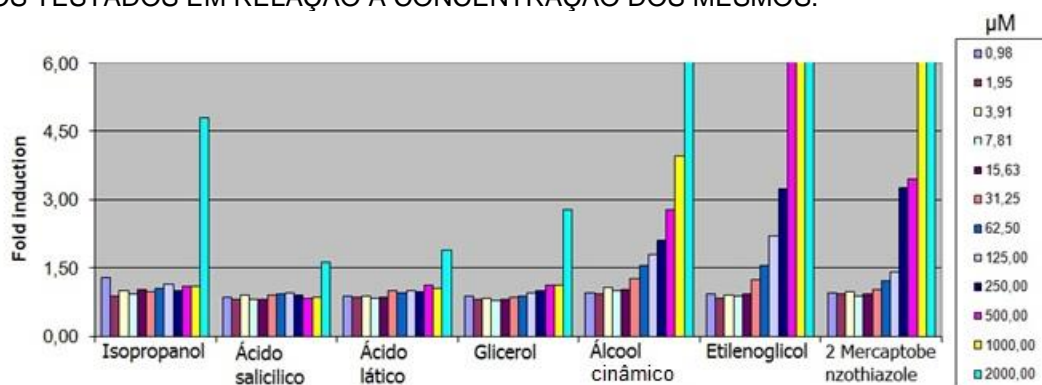
Para a validação interna do método, os sete compostos testados já possuem histórico de resultados. Isopropanol, ácido salicílico, ácido láctico e glicerol são químicos sem potencial sensibilizante enquanto o álcool cinâmico, etilenoglicol e o 2-Mercaptobenzothiazole (MBT) possuem potencial sensibilizante (Emteret al., 2010). Os resultados obtidos nos testes internos tiveram seus resultados reproduzidos de acordo com a literatura. Para o composto ser considerado sensibilizante, o mesmo deve passar por critérios de aceitação (Figura 5), sendo eles: apresentar indução da luciferase maior que 1,5x em relação ao controle negativo, apresentar viabilidade, da menor concentração sensibilizante, maior que 70%, apresentar perfil de indução, de atividade do gene da luciferase, acima do *fold induction* de 1.5 em concentrações igual ou menores que 1000 μ M (Figura 6) e, por último, apresentar uma curva dose-resposta clara.

FIGURA 5. CRITÉRIOS PARA UMA SUBSTÂNCIA SER CONSIDERADA SENSIBILIZANTE.



ADAPTADO DE: OECD 442D, 2015.

FIGURA 6. GRÁFICOS DA INDUÇÃO DA ATIVIDADE DA LUCIFERASE DOS SETE QUÍMICOS TESTADOS EM RELAÇÃO A CONCENTRAÇÃO DOS MESMOS.



Compostos, com indução maior que o limiar de 1.5 em concentrações igual ou menores que 1000 µM, são considerados com potencial sensibilizante. FONTE: O AUTOR.

Para a proficiência das substâncias testadas, a OECD 442D apresenta valores de referência para o EC1.5 encontrado em cada químico (tabela 5).

TABELA 5. VALORES DO EC1.5 RESULTANTES DOS TRÊS TESTES REALIZADOS EM COMPARAÇÃO COM O VALOR DE REFERÊNCIA APRESENTADO PELA OECD.

	Teste 1 µM	Teste 2 µM	Teste 3 µM	Média µM	Valor de referência da OECD em µM
Isopropanol	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
Ácido salicílico	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
Ácido láctico	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
Glicerol	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
Álcool cinâmico	27,21	147,29	92,09	71,73	25 - 175
Etilenoglicol	34,33	55,24	111,15	59,51	5 - 125
2- Mercaptobenzothiazole	71,65	124,75	347,96	145,97	25 - 250

Em laranja se encontram todos os valores acima de 1000 µM, ou seja, não apresentam perfil sensibilizante. Em verde se encontram todos os valores das substâncias com potencial sensibilizante, dentro do limiar, e em vermelho o valor que fugiu do limite. FONTE: O AUTOR.

Todos os compostos não sensibilizantes tiveram resultados positivos em relação ao valor de referência apresentado pela OECD do teste. Valores acima de 1000 µM não são considerados como potencial de sensibilização. Assim como no teste *in vitro*, os químicos Isopropanol, ácido salicílico, glicerol (Basketter *et al.*, 1996) e o ácido láctico (Basketter *et al.*, 1999) também não apresentam potencial sensibilizante em testes *in vivo*, LLNA. Os gráficos obtidos resultante de cada químico sensibilizante podem ser encontrados no apêndice 1.

Para os químicos: álcool cinâmico e etilenoglicol, os valores também se encontraram dentro do que é requisitado (entre 25-175 e entre 5- 125, respectivamente). O álcool cinâmico, segundo Frank Gerberick *et al.*, 2006, é conhecido por ser um sensibilizante (de potencial fraco) e, o etilenoglicol, segundo Basketter *et al.*, 1999, também possui potencial de sensibilizar a pele, segundo testes de LLNA. Para o composto organossulfurado, MBT, o valor encontrado no terceiro teste foi 39,18% maior que o máximo do valor de referência. Uma possível causa desse resultado é a diluição do químico, pois, como será citado no tópico "viabilidade celular", no terceiro teste o MBT apresentou perfil citotóxico na concentração que passa o valor de 1.5 do *fold induction*, assim, podendo ter relação no desvio desse resultado esperado. Entretanto, é de conhecimento que o MBT é uma substância de potencial sensibilizante (Basketter *et al.*, 1999, Jong *et al.*, 2002). Os gráficos obtidos resultante de cada químico sensibilizante podem ser encontrados no apêndice 2.

O valor de I_{max}, que também é calculado, representa o valor máximo de indução do gene da luciferase que o químico realiza. Nas substâncias não

sensibilizantes, o valor normalmente se encontra na concentração de 2000 μ M (tabela 6). Nos testes 1 e 2, todos os valores de I_{max} se encontraram na maior concentração testada. No teste 3, o ácido salicílico, ácido láctico e glicerol tiveram seu I_{max} em concentrações menores, entretanto, todas permaneceram em valores menores que 1.5.

TABELA 6. VALORES DE I_{MAX} ENCONTRADOS NAS QUATRO SUBSTÂNCIAS NÃO SENSIBILIZANTES DO TESTE.

	Teste 1	[Teste 1]	Teste 2	[Teste 2]	Teste 3	[Teste 3]	Média
Isopropanol	2,08	2000 μ M	9,20	2000 μ M	3,15	2000 μ M	4,81
Ácido salicílico	2,20	2000 μ M	2,16	2000 μ M	0,83	3,91 μ M	1,73
Ácido láctico	2,76	2000 μ M	2,00	2000 μ M	1,27	500 μ M	2,01
Glicerol	5,07	2000 μ M	2,38	2000 μ M	1,11	500 μ M	2,85

Os valores referentes ao teste 1, 2 e 3 são da indução do gene da luciferase (quantas vezes ocorreu a indução a mais em relação ao controle negativo) e, os valores do teste [1], [2] e [3] são referentes a concentração em que foi encontrado o valor anterior. FONTE: O AUTOR.

Para os químicos sensibilizantes o princípio de, quanto maior a concentração maior a indução do gene, também foi encontrado (tabela 7). O álcool cinâmico e o etilenoglicol, segundo a OECD 442D, são sensibilizantes fracos e, ambos tiveram o valor de I_{max} na concentração de 2000 μ M nos dois primeiros testes. O MBT, por sua vez, é considerado um sensibilizante moderado, também segundo a OECD 442D, e teve seu valor máximo de indução do gene em concentrações menores. Esse resultado pode ser atribuído pelo fato de que o químico apresenta perfil citotóxico (Emter et al., 2015), assim, não tendo a expressão do gene devido a quantidade de morte celular, resultado num menor número de células.

TABELA 7. VALORES DE I_{MAX} ENCONTRADOS NAS QUATRO SUBSTÂNCIAS SENSIBILIZANTES DO TESTE.

	Teste 1	[Teste 1]	Teste 2	[Teste 2]	Teste 3	[Teste 3]	Média
Álcool cinâmico	5,32	2000 μ M	41,20	2000 μ M	8,06	2000 μ M	18,19
Etilenoglicol	237,14	2000 μ M	134,41	2000 μ M	14,98	3,91 μ M	128,84
MBT	25,28	1000 μ M	6,75	250 μ M	2,38	500 μ M	11,47

Os valores referentes ao teste 1, 2 e 3 são da indução do gene da luciferase e, os valores do teste [1], [2] e [3] são referentes a concentração em que foi encontrado o valor anterior. FONTE: O autor.

3.3 VIABILIDADE CELULAR

O teste de viabilidade celular tem função de garantir que as células dos experimentos não tenham morrido durante o ensaio, causando resultados errôneos.

Neste teste, o parâmetro calculado é o IC70 (tabela 8), o qual representa a concentração em que 70% das células se encontram viáveis nos poços testados.

TABELA 8. VALOR DO IC70 DOS COMPOSTOS NOS TRÊS TESTES.

	Teste 1 (μM)	Teste 2 (μM)	Teste 3 (μM)
Isopropanol	>2000	>2000	1627,41
Ácido salicílico	>2000	>2000	>2000
Ácido láctico	>2000	>2000	>2000
Glicerol	>2000	>2000	>2000
Álcool cinâmico	>2000	>2000	886,61
Etilenoglicol	>2000	1987,18	753,25
2- Mercaptobenzothiazole	517,01	233,25	356,62

É visível que o químico 2- Mercaptobenzothiazole possui potencial citotóxico devido aos baixos valores encontrados. FONTE: O AUTOR.

Para um composto ser considerado sensibilizante, a viabilidade celular do poço, em que o *foldinduction* é maior que 1.5, deve ser superior a 70%(OECD 442D). Os resultados obtidos foram (tabela 9):

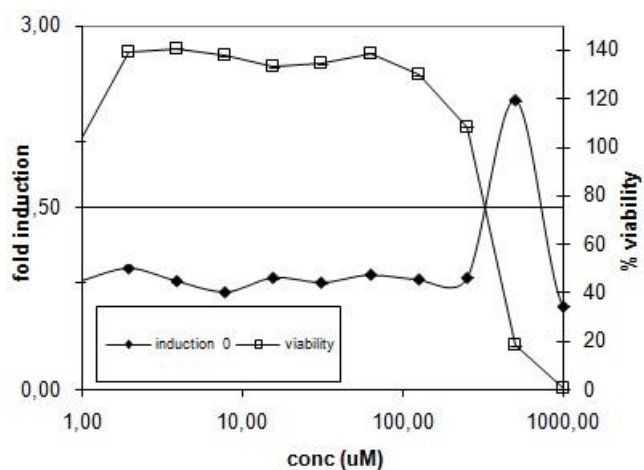
TABELA 9. VIABILIDADE CELULAR SUPERIOR A 70% DOS QUÍMICOS QUANDO *FOLD INDUCTION* MAIOR QUE 1.5.

	Teste 1	Teste 2	Teste 3
Isopropanol	OK	OK	OK
Ácido salicílico	OK	OK	OK
Ácido láctico	OK	OK	OK
Glicerol	OK	OK	OK
Álcool cinâmico	OK	OK	OK
Etilenoglicol	OK	OK	OK
2- Mercaptobenzothiazole	OK	OK	Citotóxico

Em verde se encontram os testes com resultado positivo e em vermelho representa o valor citotóxico do composto 2- Mercaptobenzothiazole. FONTE: O AUTOR.

Como evidenciado em verde, os compostos: isopropanol, ácido salicílico, ácido láctico, glicerol, álcool cinâmico e etilenoglicol, apresentaram, em todos os três testes, viabilidade acima de 70% quando o *foldinduction* foi maior que 1,5x (nos casos dos sensibilizantes). Para o último químico, 2- Mercaptobenzothiazole, o teste 3 apresentou perfil citotóxico para a concentração sensibilizante (Figura 7), entretanto, o terceiro teste foi realizado como um adicional, não impactando na assiduidade dos resultados para o químico em questão. O perfil citotóxico do composto 2- mercaptobenzothiazole já é conhecido e possui valores próximos de 745 μM (Emter et al., 2015) mostrando assim que os ensaios depararam o IC70 em concentrações menores que apresentado na literatura.

Figura 7. CURVA DOSE - RESPOSTA DO COMPOSTO 2- MERCAPTOBENZOTHAIOLE.



Os losangos fechados representam a indução da atividade da luciferase e, os quadrados abertos, a viabilidade celular. Na concentração de 500 μ M o *foldinduction* atinge 2,38 e a viabilidade das células atinge 18,32%, apontando que o químico foi citotóxico. FONTE: O AUTOR.

4 CONCLUSÃO

Os três testes se apresentaram conflitantes nos resultados. Os pontos divergentes foram analisados separadamente e visto que não houve interferências para a validação interna do método. Tanto os químicos não-sensibilizantes quanto os sensibilizante tiveram seus resultados de acordo com o encontrado na literatura, tanto para testes *in vivo* quanto *in vitro*. A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que o método de avaliação da sensibilização da pele, KeratinoSens, é reproduzível dentro do Núcleo de Avaliação de Segurança e Eficácia do Grupo Boticário, assim, otimizando as análises de sensibilização dérmica de futuros químicos que possam ser implementados em produtos da empresa.

5 REFERÊNCIAS

Ade, N., Leon, F., Pallardy, M., Peiffer, J., Kerdine-Romer, S., Tissier, M., Bonnet, P., Fabre, I. and Ourlin, J. (2008) 'HMOX1 and NQO1 genes are Upregulated in response to contact Sensitizers in Dendritic cells and THP-1 cell line: Role of the Keap1/Nrf2 pathway', *Toxicological Sciences*, 107(2), pp. 451–460.

Andreas, N., Caroline, B., Leslie, F., Frank, G., Kimberly, N., Allison, H., Heather, I., Robert, L., Stefan, O., Hendrik, R., Andreas, S. and Roger, E. (2011) 'The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers in vitro: Results of a ring-study in five laboratories', *Toxicology in Vitro*, 25(3), pp. 733–744.

Andres, E., Sá-Rocha, V.M., Barrichello, C., Haupt, T., Ellis, G. and Natsch, A. (2013) 'The sensitivity of the KeratinoSens™ assay to evaluate plant extracts: A pilot study', *Toxicology in Vitro*, 27(4), pp. 1220–1225.

Ankley, G.T., Bennett, R.S., Erickson, R.J., Hoff, D.J., Hornung, M.W., Johnson, R.D., Mount, D.R., Nichols, J.W., Russom, C.L., Schmieder, P.K., Serrano, J.A., Tietge, J.E. and Villeneuve, D.L. (2011) 'Adverse outcome pathways: A conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment', *Environmental Toxicology and Chemistry*, p. n/a–n/a.

Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996) 'The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitization tests', *Food and Chemical Toxicology*, 34(10), pp. 985–997.

Basketter, D.A., Lea, L.J., Cooper, K., Stocks, J., Dickens, A., Pate, I., Dearman, R.J. and Kimber, I. (1999) 'Threshold for classification as a skin sensitizer in the local lymph node assay: A statistical evaluation', *Food and Chemical Toxicology*, 37(12), pp. 1167–1174.

Basketter, D., Ashikaga, T., Casati, S., Hubesch, B., Jaworska, J., de Knecht, J., Landsiedel, R., Manou, I., Mehling, A., Petersohn, D., Rorije, E., Rossi, L.H., Steiling, W., Teissier, S. and Worth, A. (2015) 'Alternatives for skin sensitisation: Hazard identification and potency categorisation: Report from an EPAA/CEFIC LRI/cosmetics Europe cross sector workshop, ECHA Helsinki, april 23rd and 24th 2015', *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(2), pp. 660–666

Bauch, C., Kolle, S.N., Fabian, E., Pachel, C., Ramirez, T., Wiench, B., Wruck, C.J., Ravenzwaay, B. van and Landsiedel, R. (2011) 'Intralaboratory validation of four in vitro assays for the prediction of the skin sensitizing potential of chemicals', *Toxicology in Vitro*, 25(6), pp. 1162–1168

Bauch, C., Kolle, S.N., Ramirez, T., Eltze, T., Fabian, E., Mehling, A., Teubner, W., van Ravenzwaay, B. and Landsiedel, R. (2012) 'Putting the parts together: Combining in vitro methods to test for skin sensitizing potentials', *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 63(3), pp. 489–504.

Benigni, R., Bossa, C. and Tcheremenskaia, O. (2016) 'A data-based exploration of the adverse outcome pathway for skin sensitization points to the

necessary requirements for its prediction with alternative methods', **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 78, pp. 45–52.

Bruckner, A.L., Weston, W.L. and Morelli, J.G. (2000) 'Does Sensitization to contact Allergens begin in infancy?', **PEDIATRICS**, 105(1), pp. e3–e3.

COMM REACH - chemicals - environment - European commission. Disponível em <http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/reach_en.htm>. Acesso em: 12/10/2016.

De Jong, W.H., Tentij, M., Spiekstra, S.W., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2002) 'Determination of the sensitising activity of the rubber contact sensitizers TMTD, ZDMC, MBT and DEA in a modified local lymph node assay and the effect of sodium dodecyl sulfate pretreatment on local lymph node responses', **Toxicology**, 176(1-2), pp. 123–134.

Dumont, C., Barroso, J., Matys, I., Worth, A. and Casati, S. (2016) 'Analysis of the local lymph Node assay (LLNA) variability for assessing the prediction of skin sensitisation potential and potency of chemicals with non-animal approaches', **Toxicology in Vitro**, 34, pp. 220–228.

Emter, R., Ellis, G. and Natsch, A. (2010) 'Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro', **Toxicology and Applied Pharmacology**, 245(3), pp. 281–290.

Emter, R. and Natsch, A. (2015) 'A fast Resazurin-based live viability assay is equivalent to the MTT-test in the KeratinoSens assay', **Toxicology in Vitro**, 29(4), pp. 688–693.

Emter, R., van der Veen, J.W., Adamson, G., Ezendam, J., van Loveren, H. and Natsch, A. (2013) 'Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events', **Toxicology in Vitro**, 27(8), pp. 2225–2232.

Frank Gerberick, G., Ryan, C.A., Dearman, R.J. and Kimber, I. (2007) 'Local lymph node assay (LLNA) for detection of sensitization capacity of chemicals', **Methods**, 41(1), pp. 54–60.

Goebel, C., Aeby, P., Ade, N., Alépée, N., Aptula, A., Araki, D., Dufour, E., Gilmour, N., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Kirst, A., Marrec-Fairley, M., Maxwell, G., Rowland, J., Safford, B., Schellauf, F., Schepky, A., Seaman, C., Teichert, T., Tessier, N., Teissier, S., Weltzien, H.U., Winkler, P. and Scheel, J. (2012) 'Guiding principles for the implementation of non-animal safety assessment approaches for cosmetics: Skin sensitisation', **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 63(1), pp. 40–52.

Kimber, I., Basketter, D.A. and Dearman, R.J. (2010) 'Chemical allergens—What are the issues?', **Toxicology**, 268(3), pp. 139–142.

Kleinstreuer, N.C., Sullivan, K., Allen, D., Edwards, S., Mendrick, D.L., Embry, M., Matheson, J., Rowlands, J.C., Munn, S., Maull, E. and Casey, W. (2016)

'Adverse outcome pathways: From research to regulation scientific workshop report', *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 76, pp. 39–50.

Kolle, S., Urbisch, D., Mehling, A., Honarvar, N., Hernandez, T.R., van Ravenzwaay, B. and Landsiedel, R. (2015) 'Assessing skin sensitization in mice and men using non-animal test methods', *Toxicology Letters*, 238(2), p. S178.

Lee, S., Dong, D.X., Jindal, R., Maguire, T., Mitra, B., Schloss, R. and Yarmush, M. (2014) 'Predicting full thickness skin sensitization using a support vector machine', *Toxicology in Vitro*, 28(8), pp. 1413–1423.

Maxwell, G. (2011) 'Skin sensitisation: The Colipa strategy for developing and evaluating non-animal test methods for risk assessment', *ALTEX*, 28(1), pp. 50–55.

Nations, U. and United Nations: Economic Commission for Europe (2011) *Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS)*. 4th edn. New York: United Nations.

Natsch, A. (2009) '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*, 113(2), pp. 284–292.

Natsch, A. and Emter, R. (2007) 'Skin Sensitizers induce Antioxidant response element dependent genes: Application to the in vitro testing of the Sensitization potential of chemicals', *Toxicological Sciences*, 102(1), pp. 110–119.

OECD (2015). *In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method*. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 442D. OECD, Paris. Disponível em: <<http://www.oecd.org/env/testguidelines>>.

Ramirez, T., Mehling, A., Kolle, S.N., Wruck, C.J., Teubner, W., Eltze, T., Aumann, A., Urbisch, D., van Ravenzwaay, B. and Landsiedel, R. (2014) 'LuSens: A keratinocyte based ARE reporter gene assay for use in integrated testing strategies for skin sensitization hazard identification', *Toxicology in Vitro*, 28(8), pp. 1482–1497.

Ramirez, T., Stein, N., Aumann, A., Remus, T., Edwards, A., Norman, K.G., Ryan, C., Bader, J.E., Fehr, M., Burleson, F., Foertsch, L., Wang, X., Gerberick, F., Beilstein, P., Hoffmann, S., Mehling, A., van Ravenzwaay, B. and Landsiedel, R. (2016) 'Intra- and inter-laboratory reproducibility and accuracy of the LuSens assay: A reporter gene-cell line to detect keratinocyte activation by skin sensitizers', *Toxicology in Vitro*, 32, pp. 278–286.

Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehnl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E. and Maxwell, G. (2014) 'Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment', *Toxicology in Vitro*, 29(1), pp. 259–270.

RENAME. "Regulamentação Nacional". Disponível em <http://renama.org.br/?page_id=57>. Acesso em: 15/10/2016.

Ryan, C.A., Gildea, L.A., Hulette, B.C., Dearman, R.J., Kimber, I. and Gerberick, G.F. (2004) 'Gene expression changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen', *Toxicology Letters*, 150(3), pp. 301–316.

Settivari, R.S., Gehen, S.C., Amado, R.A., Visconti, N.R., Boverhof, D.R. and Carney, E.W. (2015) 'Application of the KeratinoSens™ assay for assessing the skin sensitization potential of agrochemical active ingredients and formulations', *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 72(2), pp. 350–360.

Thyssen, J.P., Linneberg, A., Menné, T. and Johansen, J.D. (2007) 'The epidemiology of contact allergy in the general population – prevalence and main findings', *Contact Dermatitis*, 57(5), pp. 287–299.

Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M. and Sakaguchi, H. (2015) 'Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods', *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 71(2), pp. 337–351.

Vinardell, M.P. (2015) 'The use of non-animal alternatives in the safety evaluations of cosmetics ingredients by the scientific committee on consumer safety (SCCS)', *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 71(2), pp. 198–204.

Vinken, M. (2013) 'The adverse outcome pathway concept: A pragmatic tool in toxicology', *Toxicology*, 312, pp. 158–165.

Wong, C.L., Ghassabian, S., Smith, M.T. and Lam, A.-L. (2015) 'In vitro methods for hazard assessment of industrial chemicals – opportunities and challenges', *Frontiers in Pharmacology*, 6.

6 APÊNDICES

APÊNDICE 1 - CURVAS DOSE-RESPOSTA DOS QUÍMICOS NÃO -
SENSIBILIZANTES.....37

APÊNDICE 2 - CURVAS DOSE-RESPOSTA DOS QUÍMICOS
SENSIBILIZANTES.....38

6.1 APÊNDICE 1 – CURVAS DOSE-RESPOSTA DOS QUÍMICOS NÃO - SENSIBILIZANTES

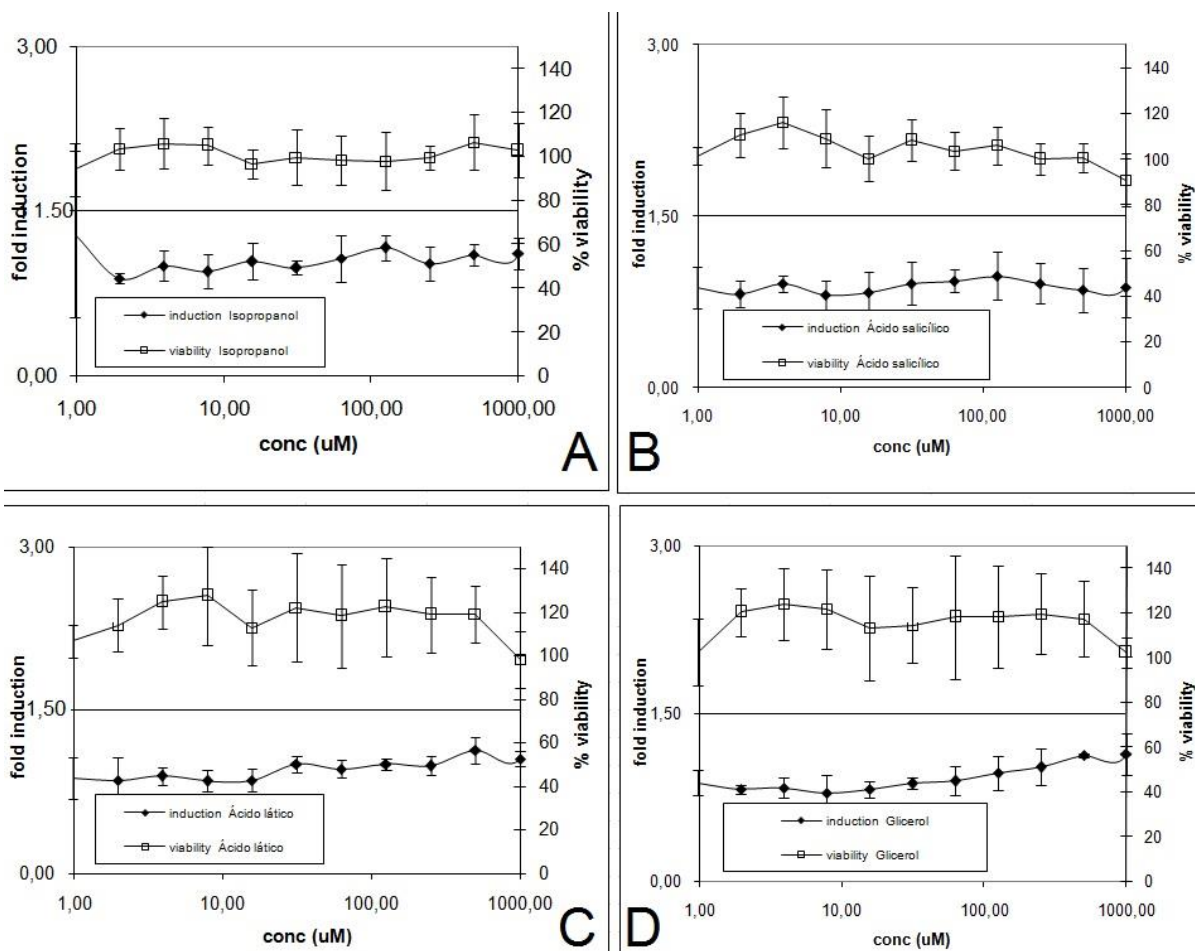


Figura 8. CURVAS DOSE-RESPOSTA DOS QUÍMICOS NÃO - SENSIBILIZANTES. A: Isopropanol, B: Ácido salicílico, C: Ácido láctico, D: Glicerol. A linha com quadrados abertos representa a viabilidade do químico e, a linha de círculos fechados a indução da luciferase.

6.2 APÊNDICE 2 – CURVAS DOSE-RESPOSTA DOS QUÍMICOS SENSIBILIZANTES

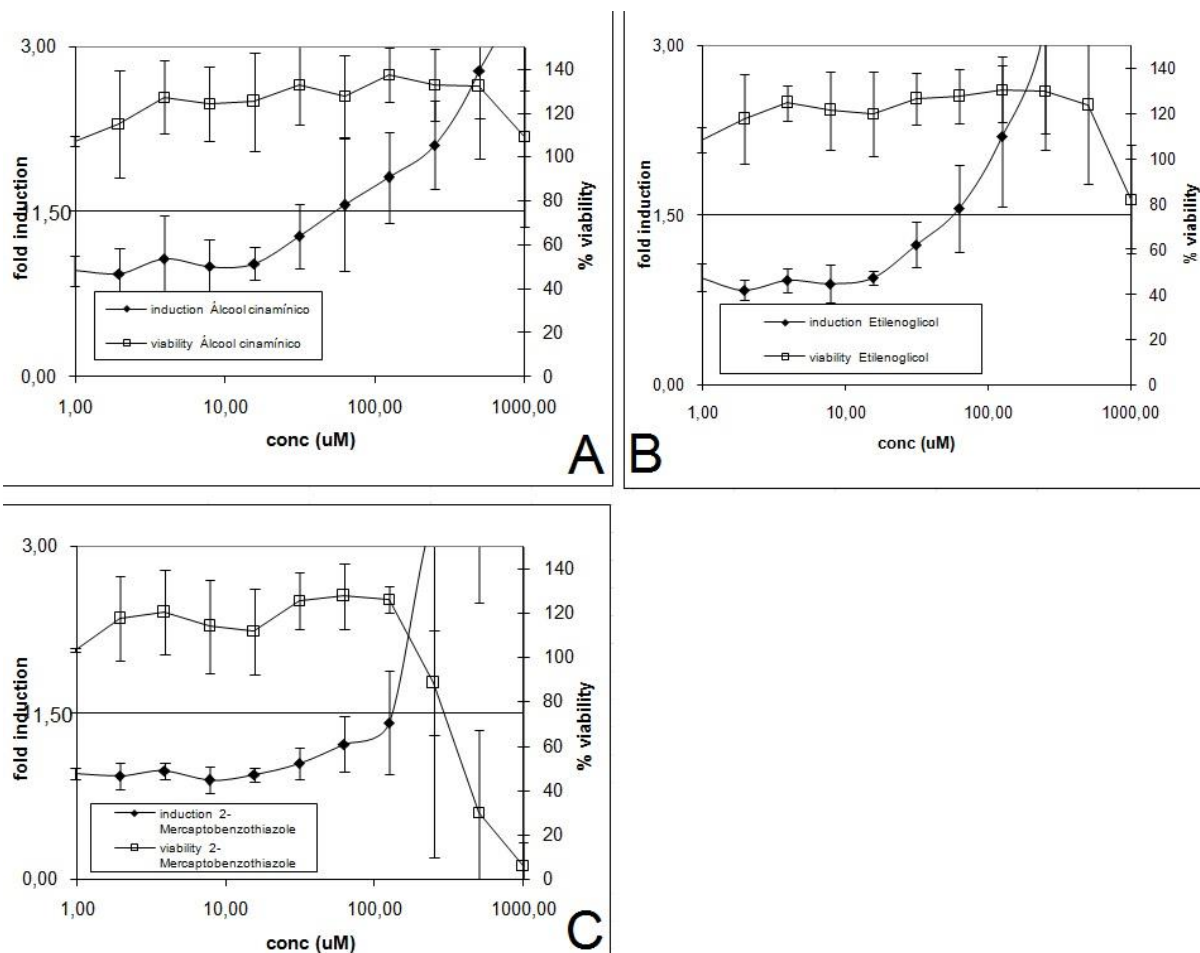


Figura 9. CURVAS DOSE-RESPOSTA DOS QUÍMICOS SENSIBILIZANTES. A: Álcool cinâmico, B: Etilenoglicol, C: 2-Mercaptobenzothiazole. A linha com quadrados abertos representa a viabilidade do químico e, a linha de círculos fechados a indução da luciferase.