UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO CAMILA ALESSANDRA MINI

Estabelecimento de um modelo de epiderme em 3D proveniente de células imortalizadas a ser utilizado como plataforma de avaliação da toxicidade dérmica induzida por corantes de tinturas capilares

> Ribeirão Preto 2020

CAMILA ALESSANDRA MINI

Estabelecimento de um modelo de epiderme em 3D proveniente de células imortalizadas a ser utilizado como plataforma de avaliação da toxicidade dérmica induzida por corantes de tinturas capilares

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Danielle Palma de Oliveira **Co-orientadora:** Silvya Stuchi Maria-Engler

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 12/08/2020. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto 2020 Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Mini, Camila Alessandra

Estabelecimento de um modelo de epiderme 3D proveniente de células imortalizadas a ser utilizado como plataforma de avaliação da toxicidade dérmica induzida por corantes de tinturas capilares. Ribeirão Preto, 2020.

103 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Oliveira, Danielle Palma de. Co-orientador: Maria Engler, Silvya Stuchi

1-Epiderme Humana Equivalente. 2-Células HaCaT. 3-Exposição dérmica. 4-Genotoxicidade. 5-Citotoxicidade. 6- Irritação. 7-Corrosão

FOLHA DE APROVAÇÃO

Camila Alessandra Mini

Estabelecimento de um modelo de epiderme em 3D proveniente de células imortalizadas a ser utilizado como plataforma de avaliação da toxicidade dérmica induzida por corantes de tinturas capilares

> Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:

Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:

Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:

Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:

Dedico este trabalho a minha família que sempre esteve ao meu lado, em especial ao meu pai José Alberto e meu avô José Carlos, para os quais a vida foi mais breve que a conclusão do meu trabalho. Mas, encerro com a certeza de que ambos estariam felizes por mim!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pela vida, pelas oportunidades a mim apresentadas e por estar sempre ao meu lado fornecendo aquela força interior que foi essencial para que eu pudesse concluir este trabalho.

Agradeço a minha querida orientadora Danielle por ter me dado um voto de confiança, por ter acreditado no meu potencial para o desenvolvimento deste trabalho. Foi incrível nosso trabalho em conjunto por esses anos, serei eternamente grata não apenas por todos os ensinamentos científicos, mas também pelos ensinamentos da vida. Obrigada por todo o carinho e preocupação, pois além de "chefe" é minha madrinha.

Agradeço a minha querida co-orientadora Silvya pelo acolhimento em seu Laboratório e no grupo de Biologia da Pele e Melanoma, no período que estive em São Paulo. Obrigada por todos os ensinamentos, por toda a sua paciência e dedicação! Obrigada por ter aceitado fazer parte do desenvolvimento deste trabalho e por todo o apoio que nos forneceu neste período.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto pelo acolhimento nesses 5 anos e meio.

Agradeço às nossas queridas salvadoras Rose e Rosana, pela ajuda com todos os problemas burocráticos relacionados a faculdade nesse período.

Agradeço as agências de fomento pelo financiamento durante todo o período. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço também a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo –FAPESP pelo financiamento do meu projeto com o processo 2016/15660-4.

Agradeço a minha mãe Rosana e meu "paidrasto" Elson que desde que eu ingressei na Universidade, sempre foram meu porto seguro e incentivadores dos meus sonhos, obrigada por todas as vezes que me deram colo, carinho e afeto. Ao meu pai José Alberto que não está entre nós, mas que o seu sonho para mim sempre foi uma carreira bem-sucedida e isso me deu força para prosseguir e honrá-lo. Aos meus irmãos Gabriel e Alberto pela amizade e

companheirismo durante todo esse percurso. Aos meus avós Maria, Adair e Ana que se orgulham da pessoa que me tornei, também ao meu avô José Carlos que também se foi cedo, mas que a ternura e orgulho em dizer que eu era a sua "doutora", enchem meu coração de alegria, saudade e gratidão. À minha querida amiga e "mãedrasta" Jú, meus tios Clebison, Everson, Renato e tias Renata, Rosimeire, Helaine e Simone por sempre torcerem por mim! Agradeço ao meu marido André por entrar comigo nesta aventura desde o princípio, por nunca me deixar desistir, por aguentar comigo todas as adversidades, por enxugar todas as minhas lágrimas e por me dar todos os abraços que precisei, mas também por sorrir e comemorar comigo cada conquista. Para mim foi a maior forma de demonstração do amor. Agradeço aos meus amigos do Laboratório de Ecotoxicologia e Toxicologia Humana

Gabriela, Cibele, Otávio, Flávia, Maíra, Tamires e Andréia pela amizade que nasceu do trabalho. Obrigada por todo apoio, por toda a ajuda, por tornar as viagens aos congressos mais divertidas, por tantos almoços e cafés com boa conversa. Aos técnicos Klaus e Sônia por todo o apoio técnico nesse período, por todas as conversas, obrigada pela amizade que os tornou meus padrinhos. À Mara que está tão próxima que a adotei, obrigada pela amizade e apoio sempre que precisei, obrigada por me socorrer sempre que os equipamentos me deixavam na mão.

Agradeço a querida Silvinha, que me acolheu e me ajudou em todo o período que estive em São Paulo. Obrigada por tantos ensinamentos, por tanta doçura em me auxiliar. Agradeço à minha florzinha madrinha Ana Rita, pelo qual conheci por causa deste trabalho e quem diria que uma carona se tornaria uma grande amiga-irmã. Obrigada por todo companheirismo durante todo este período, pela amizade, pelos cafés em minha casa, por tantos momentos que passamos juntas.

Agradeço à Evelyn minha querida amiga, obrigada pelas orações e apoio sempre! Agradeço ao Laboratório de Toxicologia Experimental e Mitocondrial e ao professor Daniel por todo apoio quando precisei de ajuda. Ao Raul, Majú, Alana, Mariana, Lilian e Carol pelo auxílio e amizade.

Agradeço ao Laboratório Multiusuário de Citometria de Fluxo e à responsável Fabiana por todo o apoio na realização das análises.

Agradeço ao Laboratório Multiusuário de Histotécnica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e à responsável Vani por todo o apoio na confecção das lâminas de histologia.

Agradeço ao Laboratório de Microscopia Confocal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e à responsável Elizabete por todo o apoio na leitura das lâminas. Agradeço ao Laboratório de Microscopia Confocal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas

de Ribeirão Preto e ao responsável Eduardo pelo apoio na leitura das lâminas de imunohistoquímica.

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis".

José de Alencar

RESUMO

MINI, C. A. Estabelecimento de um modelo de epiderme em 3D proveniente de células imortalizadas a ser utilizado como plataforma de avaliação da toxicidade dérmica induzida por corantes de tinturas capilares. 2020 103f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Com a adocão de métodos alternativos ao uso de animais na comunidade científica, diversos grupos trabalharam para o desenvolvimento de novos modelos capazes de ser aplicados na avaliação da toxicidade de substâncias/produtos. Tratando-se de exposição dérmica, os modelos de pele/epiderme reconstruída foram desenvolvidos no mundo todo, porém a aquisição desses modelos no Brasil é bastante dificultosa. Devido a isso, o objetivo aqui proposto foi o desenvolvimento de um modelo tridimensional de epiderme, utilizando queratinócitos imortalizados (HaCaT-EHE) para aplicação na avaliação de toxicidade de corantes presentes em tinturas capilares, além da comparação dos efeitos com a cultura celular em monocamada. Após a construção do modelo tridimensional, foi avaliada a diferenciação celular por métodos histológicos/imunohistoquímicos, validação do método analítico de determinação do sal de formazan utilizado nos testes de corrosão e irritação. Foi verificada a permeabilidade da membrana e proficiência do modelo em diferenciar substâncias irritantes, não irritantes, corrosivas e não corrosivas. Para avaliação de endpoints de toxicidade foram realizados ensaio de genotoxicidade (ensaio do Cometa), viabilidade/citotoxicidade (MTT, teste de viabilidade celular por anexina V/PI e teste de Tunel) e irritação e corrosão. O modelo apresentou diferenciação celular e expressão dos biomarcadores de desenvolvimento das camadas, além disso apresentou permeabilidade de membrana semelhante aos modelos já validados. O método para a determinação do sal de formazan mostrou ser seletivo, exato, preciso e robusto. Além disso, apresentou um índice de recuperação superior a 85% e variação inferior a 15%, e não foi observada a presença resíduos do sal após uma injeção com concentração elevada. Adicionalmente, o modelo demonstrou boa predição para irritação (seletividade 100%, especificidade 75% e exatidão 90%) e também para corrosão (seletividade 100%, especificidade 100% e exatidão 100%) para as substâncias testadas. Quanto aos corantes, o Basic Blue 99 (BB99) não demonstrou efeitos genotóxicos em ambos modelos, porém, demonstrou queda na viabilidade celular, além de intensa marcação com PI e dupla marcação (anexina e PI) indicando morte celular por necrose no modelo 2D. No modelo 3D, observou-se intensa marcação com fluoresceína em todas as concentrações testadas, indicando ocorrência apoptose. Como esperado, o BB99 se mostrou irritante após a exposição por 30 minutos, embora não tenha induzido a efeito corrosivo. Já o corante Basic Red 51 (BR51) induziu a efeitos genotóxicos em ambos os modelos, além disso provocou queda na viabilidade celular no modelo 2D e no modelo 3D induziu a marcação com a fluoresceína. O corante não apresentou efeitos irritantes e corrosivos. Frente ao exposto, podemos concluir que o modelo apresentou boa predição e pode ser utilizado como plataforma de estudos de avaliação da segurança/toxicidade de produtos após a exposição dérmica. Os corantes testados demonstraram efeitos tóxicos em concentrações inferiores ao limite recomendado pelo Comitê Científico Europeu e, desta forma, a utilização em produtos comerciais de tinturas capilares deveria ser revista.

Palavras-chave: Epiderme Humana Equivalente. Células HaCaT. Exposição dérmica. Genotoxicidade. Citotoxicidade. Irritação. Corrosão.

ABSTRACT

MINI, C. A. Establishment of a tested 3D epidermis model of an immortalized cells as a platform for assessing dermal toxicity induced by hair dyes. 2020. 103f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2020.

With the adoption of alternative methods to the use of animals in the scientific community, several groups worked towards the development of new models capable of being applied in the evaluation of the toxicity of substances / products. In the case of dermal exposure, the reconstructed skin / epidermis models were developed worldwide, but the acquisition of these models in Brazil is quite difficult. Because of this, the objective proposed here was the development of a three-dimensional model of epidermis, using immortalized keratinocytes (HaCaT-EHE) for application in the evaluation of toxicity of dyes present in hair dyes, in addition to comparing the effects with cell culture in monolayer. After building the threedimensional model, cell differentiation was evaluated by histological / immunohistochemical methods, validation of the analytical method for determining formazan salt used in corrosion and irritation tests. The permeability of the membrane and the proficiency of the model in differentiating irritating, non-irritating, corrosive and non-corrosive substances were verified. For evaluation of toxicity endpoints, genotoxicity assay (Comet assay), viability / cytotoxicity (MTT, cell viability test by annexin V / PI and Tunel test) and irritation and corrosion were performed. The model showed cell differentiation and expression of the biomarkers of development of the layers, in addition it presented membrane permeability similar to the models already validated. The method for determining formazan salt has proven to be selective, accurate, precise and robust. In addition, it had a recovery rate greater than 85% and variation less than 15%, and the presence of salt residues was not observed after an injection with high concentration. In addition, the model demonstrated good prediction for irritation (100% selectivity, 75% specificity and 90% accuracy) and also for corrosion (100% selectivity, 100% specificity and 100% accuracy) for the tested substances. As for the dyes, Basic Blue 99 (BB99) did not demonstrate genotoxic effects in both models, however, it showed a decrease in cell viability, in addition to intense staining with PI and double staining (annexin and PI) indicating cell death by necrosis in the 2D model. In the 3D model, intense fluorescein staining was observed at all concentrations tested, indicating apoptosis. As expected, BB99 was irritating after exposure for 30 minutes, although it did not induce a corrosive effect. The Basic Red 51 (BR51) dye induced genotoxic effects in both models, in addition it caused a drop in cell viability in the 2D model and in the 3D model it induced fluorescein staining. The dye had no irritating or corrosive effects. In view of the above, we can conclude that the model presented a good prediction and can be used as a platform for evaluating the safety / toxicity of products after dermal exposure. The dyes tested demonstrated toxic effects at concentrations below the limit recommended by the European Scientific Committee and, therefore, the use in commercial hair dye products should be reviewed.

Keywords: Equivalent Human Epidermis. HaCaT cells. Dermal exposure. Genotoxicity. Cytotoxicity. Irritation. Corrosion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da penetração dos corantes presentes nas tinturas no fio capilar 6
Figura 2- Representação da estrutura do fio de cabelo
Figura 3- Estrutura química dos corantes Basic Red 51 (A) e Basic Blue 99 (B)8
Figura 4- Representação anatômica das camadas mais superficiais da pele, derme e epiderme.
Figura 5- Diferenciação das camadas da epiderme11
Figura 6 - Ilustração do cultivo celular em modelo tridimensional e comparação entre a pele de roedores, pele humana e pele artificial15
Figura 7- Transwell sob cell strainer em placa deep well
Figura 8- Representação do tecido coletado do transwell sob superfície porosa no cassete histológico
Figura 9- Representação da coloração formada pela clivagem do sal tetrazólio após homogeneização com Dimetilsulfóxido (DMSO)
Figura 10- Esquema de detecção de quebras no DNA identificadas pelo teste de TUNEL 38
Figura 11- Modelo de epiderme equivalente após a incubação com o reagente de MTT42
Figura 12 - Sal de Formazan diluído em isopropanol logo após o processo de extração do modelo de epiderme
Figura 13 - Modelos de Epiderme Humana Equivalente utilizando queratinócitos (HaCaT- EHE) obtidos com diferentes condições de cultivo
Figura 14 - Padronização do tempo de fixação dos modelos de Epiderme Humana Equivalente utilizando queratinócitos (HaCaT-EHE)
Figura 15 – Ilustração dos ensaios de imunohistoquímica para detecção dos marcadores de diferenciação celular
Figura 16- Cromatograma obtido após a injeção de 200 µg/mL do sal de formazan nas condições cromatográficas
Figura 17- Cromatograma obtido na avaliação da seletividade do método analítico51
Figura 18- Gráfico referente a curva de calibração e equação da reta

Figura 21- Viabilidade do modelo EHE (Epiderme Humana Equivalente) desenvolvido neste trabalho empregando queratinócitos (HaCaT-EHE) após a exposição de diversas substâncias, conforme a recomendação do protocolo 431 da OECD (OECD, 2015d; OECD, 2019b).57

Figura 26- Ensaio de Viabilidade celular, utilizando Anexina V e Iodeto de Propídeo (PI) após 4 horas de exposição de queratinócitos (HaCaT) ao corante Basic Blue 99.......63

LISTA DE TABELAS

Tabela 3- Avaliação da sensibilidade empregando a curva de calibração e equação da reta obtida
Tabela 4- Determinação dos coeficientes de variação obtidos nos ensaios de Exatidão/Robusteze Precisão intradia e interdia
Tabela 5- Apresentação dos dados sobre o efeito matriz 53
Tabela 6- Avaliação do efeito irritante induzido na EHE (Epiderme Humana Equivalente)desenvolvido neste trabalho empregando queratinócitos (HaCaT-EHE), em comparação àclassificação do Globally Harmonized System (GHS)
Tabela 7- Avaliação do efeito corrosivo induzido no EHE (Epiderme Humana Equivalente)desenvolvido neste trabalho empregando queratinócitos (HaCaT-EHE), em comparação àclassificação do Globally Harmonized System (GHS).57
Tabela 8 - Comparação do valor do IC ₅₀ obtido pela exposição do modelo de epiderme humana equivalente desenvolvido neste trabalho empregando queratinócitos humanos (HaCaT-EHE) à diferentes concentrações de Dodecil sulfato de sódio (SDS) com outros modelos já validados.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3R's	Reduction, Replacement, Refinement, Reduzir Reutilizar, Refinar		
ABIHPEC	Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos		
ANOVA	Análise de Variância		
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária		
BB99	Basic Blue 99		
BR51	Basic Red 51		
BRACVAM	Brazilian Center for Validation of Alternative Methods- Centro Brasileiro para Validação de Métodos Alternativos		
BSA	Bovine Serum Albumin- Albumina de Soro Bovino		
CAS	Chemical Abstracts Service, Serviço de Resumos Químicos		
СССР	Carbonilcianeto-m-clorofenil-hidrazona		
CK 10	Citoqueratina 10		
CK 14	Citoqueratina 14		
CO ₂	Dióxido de Carbono		
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal		
DICOL	Diretoria Colegiada		
DMEM	Dubelcco's Modified Eagles Medium		
DMSO	Dimetil sulfóxido		
DP	Desvio Padrão		

EC European Comission, Comissão Européia Ácido etilenodiamino tetra-acético EDTA European Economic Comunity, Comunidade Econômica da Europa EEC EgF Epidermal Growth Factor, Fator de Crescimento Epidérmico EHE Equivalent Human Epidermis, Epiderme Humana Equivalente ELISA Enzyme-linked Immunosorbent Assay- Ensaio de Imunoabsorção Enzimática European Partnership for Alternatives Approaches to Animal testing-EPAA Grupo Europeu para abordagens em Métodos Alternativos ao uso de Animais **EURL-ECVAM** European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing, Laboratório de Referência da União Européia para Testes Alternativos ao uso de Animais FDA Food and Drug Administration- Administração de alimentos e medicamentos IARC International Agency for Research on Cancer- Agência Internacional de Pesquisa em Câncer MCTI Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação MMS Metilmetanosulfonato 3-(4,5-dimetiltiaxolona-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio bromo MTT Cloreto de Sódio NaCl OECD Organisation for Economic Co-operation and Development-Organização para Co-operação Econômica e Desenvolvimento PBS Solução Salina Fosfato

PI	Iodeto de Propídeo
RENAMA	Rede Nacional de Métodos Alternativos
SBF	Soro Bovino Fetal
SCCS	<i>Scientific Committee on Consumer Safety-</i> Comitê Científico em Segurança do Consumidor
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
ТА	Temperatura ambiente
TgF	Transforming Growth Factor- Fator Transformador de Crescimento
TUNEL	<i>Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Dutp Nick end Labeling</i> - Marcação desoxinucleotidil transferase Dutp nos sítios terminais com quebra

LISTA DE SÍMBOLOS

μ	Micro
α	Alfa
®	Registrado
2	Maior ou igual
±	Mais ou menos
<	Menor
°C	Graus Celsius
%	Por cento

SUMÁRIO

1. IN	TRO	DUÇÃO	2
1.1.	Tin	turas de cabelo	3
1.2.	An	atomia da pele	8
1.3. aplic	Cul cando	ltura de células da pele em 3D como método alternativo à experimentação ani o conceito dos 3 R's	imal: 12
1.4.	Tes	stes alternativos de toxicidade dérmica	16
1.5.	Mo	rte celular e genotoxicidade	19
2. O	BJET	TVOS	22
3. M	ATE	RIAIS E MÉTODOS	24
3.1.	Ma	teriais	24
3.2.	Mé	todos	24
3.	2.1.	Cultivo celular	24
3.1	2.2.	Cultivo do modelo de Epiderme Humana Equivalente	25
3.	2.3.	Controle de qualidade dos modelos de epiderme equivalente	26
3.	2.3.1.	Histologia dos modelos de epiderme equivalente	26
3.	2.3.2.	Avaliação da expressão de marcadores de diferenciação celular	28
3.: Lí	2.3.3. quida	Validação da determinação do sal de Formazan utilizando Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE)	29
3.	2.3.	Ensaios realizados em células cultivadas em monocamadas	32
3.	2.4.	Ensaios realizados com cultura celular 3D	37
3.	2.4.3.	Ensaio de irritação (TG OECD 439)	39
4. R	ESUL	TADOS	47
4.1.	Pac	lronização do modelo de epiderme equivalente	47
4.	1.1.	Avaliação da expressão de marcadores de diferenciação celular	48
4. Lí	1.2. quida	Validação da determinação do Sal de Formazan utilizando Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE)	49
4.2.	Av	aliação da proficiência do modelo utilizando o protocolo 439 da OECD	54
4.3.	Av	aliação da proficiência do modelo utilizando o protocolo 431 da OECD	56
4.4.	Fur	ıção de barreira	57
4.5.	Ens	saios realizados com corantes	59
4.	5.1.	Corante Basic Blue 99	59
4.:	5.2.	Corante Basic Red 51	66

5.	DISCUS	55ÃO	72
	5.1. Pad	ronização do modelo de epiderme equivalente	72
	5.2. Ens	aios realizados com os corantes	76
	5.2.1.	Basic Blue 99	76
	5.2.2.	Basic Red 51	80
6.	CONCI	LUSÕES	85
RI	EFERÊNC	CIAS	87
Aľ	NEXO		103

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A frase do filósofo e dramaturgo romano *Plautus* (254-184 a.C.) embora muito antiga, revela a necessidade da população em geral de fazer uso de cosméticos para melhorar a autoestima: "Uma mulher sem tinta é como comida sem sal" (COSMETICS INFO, 2016). De acordo com o *Food Drug Administration* (FDA/E.U.A.), os cosméticos são substâncias que podem ser passadas, derramadas, polvilhadas, pulverizadas e aplicadas ao corpo humano para a limpeza, embelezamento e alteração da aparência (FDA, 2018a), sendo estes dois últimos, os principais motivos que fizeram o sucesso da indústria mundial de cosméticos.

Além dos cosméticos convencionais, há uma subclassificação denominada "cosmecêuticos" que são bastante utilizados. Esses produtos além da função principal, possuem ingredientes na formulação que podem trazer outros benefícios para o indivíduo que os usa, como por exemplo cremes hidratantes anti-idade, xampu anti-caspa, cremes anti-acne entre outros (MILAM; RIEDER, 2016).

Assim, a intensa busca por uma aparência que atenda aos padrões sociais promove uma grande procura de procedimentos estéticos diversos, acarretando o uso exacerbado de cosméticos. A Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC) mostrou em seu relatório mais recente que os maiores consumidores dos produtos do setor no mundo são os Estados Unidos, China, Japão e o Brasil (ABIHPEC, 2019).

Dentro desse contexto, o uso excessivo desses produtos, associado à intensa evolução das indústrias cosméticas, que lançam constantemente novos produtos, claramente demonstra a necessidade da avaliação da segurança, tanto das matérias primas como dos produtos finais. Soma-se a estes fatos, o uso rotineiro de uma grande variedade de cosméticos por uma significativa parcela da população, reforçando assim, a necessidade de uma completa avaliação dos efeitos que os componentes das fórmulas e o produto finalizado podem provocar quando entram em contato com a pele, olhos, couro cabeludo, unhas etc.

Por muito tempo, a avaliação da toxicidade de produtos de higiene e beleza foi realizada basicamente utilizando testes em animais. No entanto, a partir do início dos anos 2000, a União Europeia iniciou um movimento para substituição dos ensaios em animais, para a avaliação da segurança de cosméticos e outros componentes presentes nas fórmulas, culminando na completa proibição em 2009, com a publicação da Diretiva 1223/2009 (EC, 2009;

SCCS/1564/15). Desta forma, os laboratórios europeus foram pioneiros no desenvolvimento e validação de métodos alternativos à experimentação animal, permitindo o uso na avaliação da segurança de cosméticos. Esta tendência foi difundida para a avaliação de diversos outros produtos com aplicações variadas, com o objetivo de reduzir o número de animais na avaliação inicial da toxicidade, atendendo ao conceito dos 3R de acordo com Russel e Burch o qual será discutido adiante, diminuindo assim o número de compostos que são encaminhados para a avaliação completa da toxicidade, como nos ensaios pré-clínicos.

Assim, o desenvolvimento de métodos alternativos tem sido considerado uma grande tendência mundial na área da Toxicologia, demonstrado pelo grande interesse na discussão deste tema nos eventos científicos da área.

Atualmente, diversos trabalhos demonstram que métodos *in vitro* podem ser preditivos e a substituição e/ou redução no uso de animais pode ser realizada sem colocar em risco a confiança dos resultados. A importância na substituição não é apenas por resultados confiáveis, mas pelo fator econômico envolvido, considerando que a manutenção de animais em biotério é de custo elevado além do tempo envolvido na pesquisa, afinal muitos testes *in vitro* garantem respostas em um período mais curto (HIRSCH; SCHILDKNECHT, 2019).

Dentro deste contexto, a evolução na ciência não apenas garante a utilização de novos modelos e métodos, mas possibilita segurança nos produtos utilizados e atende a política dos 3R's que desde a década de 50, revolucionou o conceito da utilização dos animais na indústria e pesquisa.

1.1. Tinturas de cabelo

O Brasil é o 4º maior consumidor de produtos de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos, perdendo apenas para os Estados Unidos, China e Japão. Embora, o consumo de produtos tenha enfrentado uma queda nos últimos anos devido à crise financeira, o setor vinha apresentando sinais de recuperação em 2019 (ABIHPEC, 2019). No entanto, devido a atual pandemia devido ao SARS-COV-2, alguns especialistas apontam para uma crise no comércio global, tendo já sido constatada uma queda de aproximadamente 15% nas vendas de produtos de beleza no mês de março de 2020, provavelmente devido ao fato das pessoas estarem em isolamento social e, portanto, se preocupando menos com a aparência. Soma-se a isso o fechamento de salões de beleza devido aos decretos governamentais que impedem o

funcionamento de alguns estabelecimentos (ABIHPEC, 2020a; ABIHPEC, 2020b; AGÊNCIA BRASIL, 2020).

Ainda assim, o setor de cosméticos é um ramo muito forte da economia brasileira. Segundo o relatório da Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC), a necessidade de autorrealização é o principal motivo para que os indivíduos utilizem produtos de higiene, perfumes e cosméticos, demonstrando que os brasileiros estão cada vez mais visando o bem-estar pelo uso desses produtos (ABIHPEC, 2019).

Dentre esses produtos, as tinturas capilares representam grande destaque no ramo industrial, ocupando a 4^a colocação entre os cosméticos mais utilizados pelos brasileiros (ABIHPEC, 2019). Essa intensa utilização provavelmente é devida ao fato de que as tinturas capilares estão entre os produtos cosméticos de maior potencial de modificação da autoimagem. No Brasil, um quarto da população já realizou algum tipo de procedimento de coloração pelo menos uma vez na vida (INMETRO, 2006).

A indústria produtora de tinturas começou quando Hoffman descobriu, em 1863, a coloração marrom produzida pela parafenilenodiamina (PPD) após uma reação de oxidação. Em 1907, Eugene Schueller, fundador da L'Oreal lançou a primeira marca de tinturas de cabelo que era de uso restrito aos salões de beleza até a década de 50. Porém, com os avanços na tecnologia, várias tinturas de uso doméstico foram lançadas posteriormente e, rapidamente seu uso foi disseminado na população (DRAELOS, 2004).

As tinturas de cabelos são classificadas de acordo com o modo de fixação na fibra capilar, podendo ser fixadas na cutícula ou no córtex por mecanismos oxidativos ou não oxidativos. Nas reações oxidativas, a cutícula do fio é aberta com a ação dos agentes alcalinizantes (amônia), permitindo a penetração do precursor e do peróxido de hidrogênio no fio. Com a penetração dos compostos, ocorre a reação de oxidação, promovendo assim a alteração permanente da cor do fio (SANÍA; CARREÑO, 2007; MADNANI; KHAN, 2013).

Já os mecanismos não oxidativos compreendem os corantes de cabelos diretos, que independem de reações oxidativas e se fixam diretamente no fio por ligações químicas fracas. Esses corantes compõem geralmente as fórmulas de colorações semi-permanentes e temporárias (SANÍA; CARREÑO, 2007).

Outra classificação comum das tinturas leva em consideração o tempo de permanência da cor no fio como se segue:

a) Temporárias: representam apenas 3% dos tipos de coloração. São facilmente removidas pela lavagem, pois são compostas por moléculas mais pesadas, tornando-as incapazes de penetrar no córtex. Desta forma, o corante fica apenas depositado na cutícula por meio de ligação a um polímero catiônico que aumenta a afinidade do corante pelo fio (Figura 1A) (DRAELOS, 2004; GUERRA-TAPIA; GONZALEZ-GUERRA, 2014; ACS, 2019).

b) Demi-permanente: representam cerca de 10% dos produtos, mas não são encontrados em fórmulas profissionais, devido a ineficácia em cobrir fios grisalhos. São produtos que contém corantes do grupo azo e nitroanilina principalmente e são capazes de aumentar o brilho e fornecer uma mudança leve na tonalidade da cor. Neste caso, o corante adere ao fio de cabelo por ligações polares fracas e por força de Van der Waals, e duram cerca de 6 a 8 lavagens. (Figura 1 B) (DRAELOS, 2004; GUERRA-TAPIA; GONZALEZ-GUERRA, 2014; ACS, 2019):

c) Permanente: é o tipo de coloração mais comum e mais utilizado, representando cerca de 85% das tinturas comercializadas. As substâncias químicas tais como parafenilenodiamina, paratoluenodiamina e resorinol são precursores e/ou acopladores e revelam a cor após uma reação de oxidação provocada pelo peróxido de hidrogênio. São 100% eficientes na cobertura de cabelos grisalhos e, devido ao baixo peso molecular, são capazes de penetrar completamente no córtex do fio promovendo a alteração definitiva da cor natural. Desta forma, a lavagem não consegue remover as substâncias e a manutenção da cor é feita pelo retoque na raiz quando ocorre o crescimento do fio (Figura 1C) (DRAELOS, 2004; GUERRA-TAPIA; GONZALEZ-GUERRA, 2014; ACS, 2019).

 d) Descolorante: substâncias capazes de promover descoloração permanente do fio por meio da utilização de amônia e peróxido de hidrogênio ocorrendo a oxidação da melanina do fio (DRAELOS, 2004; GUERRA-TAPIA; GONZALEZ-GUERRA, 2014).

No Brasil há apenas uma legislação que regulamenta a inserção de corantes nas formulações das tinturas, porém não há legislação para os corantes abordados neste trabalho (BRASIL, 2012).



Figura 1 - Representação da penetração dos corantes presentes nas tinturas no fio capilar.

A) Tinturas temporárias com ligação superficial e externa ao fio; B) Tinturas semipermanentes com ligação superficial e interna no fio; C) tinturas permanentes com ligação mais profunda e interna no fio.

Frente ao exposto, fica claro que o processo de tingimento depende da anatomia dos fios, que são compostos essencialmente por 3 camadas (Figura 2): a cutícula, o córtex e medula (BUFFOLI et al., 2014).





Fonte: Adaptação Buffoli et al. (2014)

Fonte: Adaptação Madnani; Khan (2013).

Apesar do uso rotineiro desses produtos, de acordo com a *International Agency Research on Cancer* (IARC), alguns compostos presentes nesses produtos podem apresentar efeitos carcinogênicos em decorrência da exposição. Dentre esses compostos tóxicos, estão substâncias que contém o grupamento azo (N=N) e aminas aromáticas (IARC, 2010). Considerando que a anatomia do fio favorece a absorção de algumas substâncias através do folículo piloso (BUFOLLI et al., 2014), a manifestação de efeitos sistêmicos após a aplicação tópica durante o processo de tintura pode ocorrer. Já foi apontada uma possível correlação entre a exposição aos corantes e/ou outros componentes da formulação, como o-toluidina e anilina, com o desenvolvimento de alguns tipos de cânceres como bexiga, mama e linfoma (WARD et al., 1996; VINEIS; PIRASTU, 1997; NCI, 2016; GERA et al., 2018; ACS, 2019). Adicionalmente, a utilização de tinturas de cabelo também já foi relacionada a manifestação de irritação da pele, sensibilização e alergias (KIM; KABIR; JAHAN, 2016; ZANONI et al., 2017).

Por outro lado, outros trabalhos sugerem que tinturas mais modernas não provocam riscos ou efeitos genotóxicos e mutagênicos no organismo, e que o risco sistêmico é baixo (NOHYNEK et al., 2010; ZANONI et al, 2014; ZANONI et al., 2015; KIM; KABIR; JAHAN, 2016; JIANN, 2017). Assim, fica evidente que não existe consenso a respeito dos riscos associados à exposição aos corantes, demonstrando a necessidade de novos estudos.

Desde 1965, a IARC demonstrou preocupação com as substâncias potencialmente carcinogênicas em diversos produtos, ressaltando a importância dos estudos para avaliação toxicológica (IARC, 2010). A interação dos agentes químicos com o material genético pode acarretar lesões no DNA, ou seja, efeitos genotóxicos e quando essas lesões não são reparadas, ocorre uma mutação e essa informação será transmitida para as células filhas no momento da divisão. Alguns corantes de cabelo são capazes de induzir lesões no DNA, que podem ser detectadas pelo ensaio do cometa (TARFUT-CARDONA et al., 2015). Neste sentido, no presente trabalho estudamos dois corantes amplamente empregados em formulações de tinturas comerciais, o Basic Red 51 (BR51) e Basic Blue (BB99) (Figura 3). Ambos são geralmente encontrados em tinturas semi-permanentes, mas o BR51 também compõe algumas formulações de tinturas comerciaes.





Nosso grupo de pesquisa vem estudando o corante BR51, demonstrado a indução de espécies reativas do oxigênio (ZANONI et al., 2014) e alterações morfológicas nas células de pele (ZANONI et al., 2015). O BB99 foi estudado por Franco et al. (2015), que detectaram o corante na água de lavagem, mesmo após 5 procedimentos, demonstrando a permanência e, consequente exposição das células do couro cabeludo por longo período, após um processo rotineiro de tintura (FRANCO et al., 2015).

Os resultados já obtidos em cultura celular em monocamada reiteram à necessidade de avaliar os corantes em ambiente 3D de epiderme, para avaliação da resposta e comparação com os resultados dos ensaios realizados com cultura celular tradicional.

1.2. Anatomia da pele

O tecido tegumentar é o maior órgão do corpo humano, composto por três camadas principais denominadas epiderme, derme e hipoderme. A atuação como barreira física está dentre as principais funções da pele e a sua eficiência é devida a presença de lipídeos no espaço intercelular dos queratinócitos presentes na epiderme. Além disso, a pele é também responsável pela manutenção da homeostase térmica, ação sensorial e função imunológica (WHO, 2009; VENUS; WATERMAN; McNAB, 2011; YOUSEF; ALHAJJ;SHARMA, 2020). Além disso,

acredita-se que a epiderme além da função de barreira física contra substâncias tóxicas, apresenta também funções fisiológicas capazes de auxiliar nos mecanismos de defesa após a exposição a diversos estressores externos (SCCS, 2015).

A Figura 4 mostra as duas camadas mais superficiais da pele, derme e epiderme, assim como alguns dos anexos, como vasos sanguíneos e glândulas.

Figura 4- Representação anatômica das camadas mais superficiais da pele, derme e epiderme.



Fonte: LEHMAN-MCKEEMAN, L. D. 2012, p.63

A hipoderme é a camada mais profunda, localizada abaixo da derme e composta essencialmente de tecido adiposo. É o local onde há maior quantidade de capilares, que são responsáveis por carrear os nutrientes pelo sangue, além da presença de glândulas que são responsáveis pela saída de água e íons a fim de manter a temperatura do órgão (VENUS; WATERMAN; McNAB, 2011; JOSSET et al., 2014).

A derme é a camada intermediária entre a epiderme e a hipoderme, sendo o local onde estão vasos sanguíneos e anexos da pele. Esta camada é composta, essencialmente, por fibroblastos capazes de produzir colágeno e fibras de elastina, componentes que proporcionam a sustentação da pele (VENUS; WATERMAN; McNAB, 2011; JOSSET et al., 2014).

A epiderme é a camada mais externa da pele, composta, essencialmente, por queratinócitos, melanócitos e células imunes. Como os queratinócitos são o objeto de estudo do presente trabalho, será dada maior ênfase a esta camada. A Figura 5 ilustra as estratificações desta camada, descritas a seguir e visualizadas no corte histológico (WHO, 2009; VENUS; WATERMAN; McNAB, 2011; JOSSET et al., 2014; YOUSEF; ALHAJJ; SHARMA, 2020; DIEGEL, 2019):

- Estrato basal (germinativo) é a interface entre a derme e a epiderme, composta de células cubóides, onde são encontrados os queratinócitos e melanócitos;
- Estrato espinhoso, é considerado o local de transição, onde as células começam a migrar para o ápice da epiderme. É composto por células poliédricas com filamentos que se estendem para as células vizinhas;
- Estrato granuloso, apresenta células em formato de diamantes e as células contém grânulos de queratohialina;
- Estrato córneo, é composto por células que perderam o núcleo e formaram escamas compostas por filamentos de queratina.

O estrato córneo é considerado a primeira barreira da pele, sua composição é dada essencialmente por 3 classes principais de lipídeos (colesterol, ácido graxo livre, ceramidas) que ficam organizadas em uma estrutura tridimensional. Esta camada é formada na última etapa de diferenciação (SMEDEN; BOUWSTRA, 2016).

A principal função do estrato córneo é a atuação com barreira física, de barreira de permeabilidade química, atuante na resposta imunológica inata, além de estar em constante renovação e possui a capacidade de se adaptar de acordo com as condições ambientais (YOUSEF; ALHAJJ; SHARMA, 2020; ABDAYEM; HAFTEK, 2018). Brohem et al. (2010) considera que o uso de modelos tridimensionais de pele/epiderme, para os mais variados estudos, é possível devido a possibilidade de gerar o estrato córneo no modelo *in vitro*. Além disso, incidência de alterações no estrato córneo, está ligada a ocorrência de injúrias na pele como inflamação, irritação.





Fonte: Modificado de http://mol.icb.usp.br/index.php/2-23-tecido-epitelial-de-revestimento-2/. Acesso em: 25 Maio 2020.

O couro cabeludo embora seja parte do tecido tegumentar, apresenta algumas diferenças na anatomia como na fisiologia, ele apresenta 3 camadas principais denominadas: epiderme, derme e subcutis. As raízes dos fios assim como as glândulas se iniciam na derme, além disso há diversas inervações responsáveis por auxiliar na sensibilidade e termo regulação do couro cabeludo (RUKWIED, 2017)

A pele é um órgão multifuncional com capacidade sensorial, barreira física e imunológica. Embora, seja uma barreira muito eficiente por apresentar diversos mecanismos que impeçam a entrada de agentes patogênicos e/ou absorção de substâncias químicas, ainda existem agentes tóxicos que podem ser absorvidos por todas as camadas da pele e provocar efeitos sistêmicos (VENUS; WATERMAN; McNAB, 2011; LEHMAN-MCKEEMAN, 2013; JOSSET et al., 2014; YOUSEF; ALHAJJ; SHARMA, 2020). Desta maneira, é importante a aplicação de ensaios toxicológicos utilizando células de pele como modelo de estudo, para predizer a ocorrência de efeitos após exposição dérmica a diversas substâncias, capacidade em penetrar pela barreira natural ou provocar os efeitos no local de contato.

1.3. Cultura de células da pele em 3D como método alternativo à experimentação animal: aplicando o conceito dos 3 R's

A vivissecção para estudos de fisiologia e anatomia é uma prática antiga, e os primeiros relatos vieram do médico romano Galeno em meados do século 100, no entanto, a prática foi disseminada a partir do século XIX (CARVALHO; WAIZBORT, 2010). Desde então, o uso de animais passou a ser comum tanto na medicina, como em outras áreas do conhecimento, culminando em uma imensa quantidade de animais utilizados na pesquisa e ensino. Dentro deste contexto, desde a década de 1950, Hume e Lond já discutiam sobre esta quantidade exacerbada de animais utilizados no meio científico (HUME; LOND, 1957).

Em 1959, esses conceitos foram consolidados pela divulgação do princípio dos 3R's por Russell e Burch (1959). Originados do inglês "*Reduction, Replacement* e *Refinement*", os 3R's significam redução da quantidade, substituição de testes e refinamento dos testes visando a eliminação do sofrimento dos animais. Em 1986, foi lançada uma diretiva na União Europeia, visando à implantação da política dos 3R's na experimentação animal e outros propósitos científicos, sugerindo o desenvolvimento de novos métodos. Em 1991, foi criada *a European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testins* (EURL-ECVAM), que reiterava a diretiva de 1986 (EEC, 1986; EUROPEAN COMISSION, 2013), com o propósito de desenvolver, validar novos métodos e assim, a aplicação efetiva da política dos 3R's (LOUHIMIES, 2002).

No ano de 1998, o conselho europeu expôs em uma conferência, a necessidade de proteger os animais vertebrados utilizados na pesquisa, culminando na criação de outras diretivas (EEC, 2010). Em 2005, foi criada a *European Partnership for Alternatives Approaches to Animal testing* (EPAA), a primeira organização que unia colaboradores do setor público e privado com o propósito de trabalhar juntos para o desenvolvimento de novos métodos mais preditivos, sem a necessidade de utilização de animais (COZIGOU et al., 2015). Ainda em 1998, foi publicada no Brasil a Lei n. 9.605, conhecida como Lei de Crimes ambientais, que em seu Capítulo V, seção I, artigo 32 diz que é crime o abuso, maus tratos, mutilação e ferimentos em animais utilizados para fins didáticos ou científicos (BRASIL, 2008).

A partir da promulgação da Lei, a comunidade científica brasileira iniciou as discussões sobre o tema e seguindo a tendência mundial neste mesmo ano, foi promulgada a Lei 11.794/2008, mais conhecida como Lei Arouca, que regulamenta o uso de animais em pesquisa e criou o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) para a fiscalização do cumprimento das normas relacionadas ao uso de animais na pesquisa e ensino, podendo aplicar multas quando não há cumprimento dos requisitos estabelecidos na Lei (BRASIL, 2008; PRESGRAVE, 2008).

No ano seguinte, a União Europeia estabeleceu que cosméticos não poderiam ser comercializados caso houvesse algum componente na fórmula que tivesse sido testado em animais, já que a ECVAM juntamente com a *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD) desde a década de 90 trabalhava continuamente para o desenvolvimento, validação, aprovação e publicação de métodos alternativos ao uso de animais (EC, 2009). A Diretiva do conselho europeu publicada em 2010, além de citar diversas considerações sobre como deve ser o manejo desses animais, propõe formas de proteção animal (EEC, 2010).

Em 2012, o Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) instituiu a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA) para a implantação, validação e certificação de ensaios alternativos ao uso de animais, promoção da qualidade dos ensaios, avaliação da qualidade dos ensaios. Nesta mesma portaria ficou estabelecido que o processo de validação dos métodos propostos ocorreria no Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM) e o monitoramento e a introdução de novas técnicas seriam de responsabilidade do CONCEA (BRASIL, 2012).

Em 2014, a Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa - Dicol), deliberou a aceitação dos métodos alternativos incentivada pelo CONCEA após a publicação da resolução normativa nº 18 em setembro, reconhecendo a validação de 17 métodos alternativos ao uso de animais (BRASIL, 2014). No ano de 2016 o CONCEA por meio de outra resolução normativa reconheceu mais 7 métodos alternativos (BRASIL, 2016).

Os métodos alternativos aceitos pelo CONCEA são classificados em: avaliação do potencial de irritação e corrosão da pele; avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular; avaliação do potencial de fototoxicidade; avaliação de absorção cutânea; avaliação do potencial de sensibilização cutânea; avaliação de toxicidade aguda; avaliação de genotoxicidade, avaliação de toxicidade reprodutiva, avaliação da contaminação pirogênica em produtos injetáveis. Concomitante ao reconhecimento desses métodos, foi estabelecido um prazo de cinco anos para a substituição obrigatória de testes utilizando animais por métodos alternativos

na pesquisa científica para o lançamento de novos cosméticos que já tenham um alternativo entre os aceitos contando o prazo desde a publicação de 2014 (BRASIL, 2014) e tal normativa entrou em vigor em setembro de 2019 (BRASIL, 2016).

Essencialmente, a avaliação dos efeitos na pele compõe a maioria dos métodos reconhecidos pelo CONCEA, pois visam, principalmente, a substituição dos ensaios de irritação e corrosão utilizando coelhos, também conhecido como teste de Draize (DRAIZE; WOODARD; HERBERT, 1944; PEDROSA et al., 2017). Esses métodos já foram validados pela OECD e descritos nos guias TG 431 e TG 439 (OECD, 2019a,b), substituindo completamente o teste de Draize.

Dentre esses métodos, as culturas celulares utilizando células de pele se destacam. A utilização de cultura celular em monocamada é um método convencional muito utilizado na pesquisa, especialmente na Toxicologia, para avaliação de efeitos induzidos após a exposição a substâncias tóxicas. No entanto, a disposição das células em uma única camada não reproduz o ambiente tecidual, tanto devido à conformação das células, quanto pela ausência da comunicação intercelular que é promovida pela coesão entre elas. Essa falha estrutural interfere nas respostas celulares e, como consequência, há a modificação do efeito quando comparado ao ambiente *in vivo* (POUMAY; COQUETTE, 2007).

Dentre as desvantagens dos modelos convencionais, pode-se citar também a ausência dos componentes extracelulares encontrados no tecido, como a matriz extracelular por exemplo, prejudicando não só a comunicação intercelular, mas também a diferenciação morfológica das células. Por esse motivo, o desenvolvimento de uma ferramenta de estudo com fisiologia mais complexa e que se aproxima do microambiente tecidual *in vivo*, melhora a capacidade de resposta dos métodos *in vitro* (MAZZOLENI; LORENZO; STEIMBERG, 2009; MATHES; RUFFINER; GRAF-HAUSNER, 2014).

Diversos modelos de cultura 3D foram desenvolvidos com o objetivo de mimetizar o tecido *in vivo*. Existem por exemplo, diversos tipos de modelos como esferoides, cultivo celular utilizando biorreatores ou cultivo com utilização de *scaffolds* e a matriz extracelular é escolhida de acordo com o tipo celular, características da célula escolhida e tecido a ser reproduzido (MAZZOLENI; LORENZO; STEIMBERG, 2009).

Os modelos de pele são confeccionados sob *scafollds* (insertos), para o crescimento e conformação adequada das camadas celulares da derme e epiderme. Neste caso, são utilizados

fibroblastos associados a colágeno que compõem a derme e, sobre esta, são adicionados queratinócitos para a formação da camada da epiderme (Figura 6A) (POUMAY; COQUETTE, 2007; BROHEM et al, 2010; CATARINO et al., 2018).

Devido à necessidade de diferenciação celular ao longo da epiderme, é necessário que o cultivo ocorra em interface ar-líquido, uma vez que no ambiente *in vivo* a pele também não está submersa em fluidos. Além disso, é necessária a adição de diversos substratos, que favorecem a migração e diferenciação das células (BROHEM et al., 2010; CATARINO et al., 2018).

Figura 6- Ilustração do cultivo celular em modelo tridimensional e comparação entre a pele de roedores, pele humana e pele artificial.





A) Representação do cultivo celular do modelo tridimensional de pele, demonstrando o modo de inserção das células e cultivo em interface ar-líquido. B) Comparação entre a pele de roedor, pele humana e pele artificial.

A construção da epiderme permite a formação das camadas celulares presentes no tecido *in vivo*, melhorando a qualidade das respostas, além de permitir a aplicação na indústria e na pesquisa. Embora esses modelos tenham limitações, Brohem et al. (2010) demonstraram que a pele artificial apresenta maior semelhança com a pele humana, quando comparada à pele de

roedor (Figura 3B) (POUMAY; COQUETTE, 2007; BROHEM et al., 2010; PEDROSA et al., 2017).

Diversos estudos já demonstraram a eficiência dos modelos de epiderme em 3D em estudos de avalição de segurança dérmica. Jong et al. (2018) por exemplo, confirmaram que o modelo Skin Ethic® produzido e comercializado pela L'Oreal é robusto para a detecção de atividade irritante causada por diversas substâncias químicas, listadas no protocolo da OECD TG439, após uma avaliação interlaboratorial.

No entanto, devido à dificuldade de tramitação na importação dos modelos comercialmente disponíveis, o desenvolvimento de modelos *in house* acabou se tornando uma necessidade (PEDROSA et al., 2017; CATARINO et al., 2018). Mesmo que recentemente a Episkin, empresa do grupo L'Oreal que comercializa modelos tridimensionais se instalou no Brasil, a tendência mundial de utilização de métodos alternativos está cada vez maior e a demanda dos modelos na América Latina provavelmente será maior do que a empresa poderá atender. Desta forma, o presente trabalho teve como um dos principais objetivos o desenvolvimento de um modelo tridimensional de epiderme, utilizando células imortalizadas, que foi utilizado para a avaliação de toxicidade dérmica induzida por corantes de cabelo.

1.4. Testes alternativos de toxicidade dérmica

A exposição aos cosméticos ocorre essencialmente na pele e alguns produtos podem ser absorvidos por todas as camadas desta, atingindo a circulação sanguínea, podendo induzir a efeitos sistêmicos, além dos efeitos locais. Com isso, pode-se considerar o estrato córneo presente na camada mais superficial da epiderme, a barreira física mais importante de proteção da pele (SCCS/1564/15) e o rompimento de sua integridade está relacionado a injúrias na pele.

Os efeitos tóxicos na pele podem ser classificados como agudos, subcrônicos e crônicos. Dentre os efeitos agudos, normalmente decorrentes de exposições de curto prazo, podemos destacar corrosão, irritação e sensibilização (DRAIZE; WOODARD; CALVERY, 1944; UN, 2018; DIEGEL, 2019).

Os primeiros ensaios utilizados para avaliação de efeitos locais na pele, como corrosão e irritação utilizavam pele de animais de mais de uma espécie. Dentre os animais mais utilizados, estavam os roedores, coelhos e cachorros. O ensaio de Draize ficou muito conhecido pela dor e sofrimento causado nos animais em teste, mas em meados da década de 40, era muito
utilizado para avaliação de efeitos na pele e nos olhos e era capaz de diferenciar entre efeito agudo, subcrônico e crônico (DRAIZE; WOODARD; CALVERY, 1944).

Desde a época, a comunidade científica buscava uma classificação adequada para os efeitos que as substâncias testadas provocavam na pele, de acordo com a intensidade do efeito. Primeiramente, a classificação era definida entre substâncias que não causavam efeitos, as corrosivas que provocavam efeitos graves de necrose e descamação desde a epiderme até a derme e, as substâncias irritantes que eram capazes de provocar edema, escaras e vermelhidão na pele e a intensidade de tais efeitos era medida por meio de *scores* em características prédeterminadas (DRAIZE; WOODARD; CALVERY, 1944). Atualmente, segundo *o Globally Harmonised System* (GHS) as substâncias corrosivas se diferem das irritantes pela gravidade do efeito que provocam após a exposição. As substâncias corrosivas são capazes de provocar um dano irreversível, diferente das substâncias irritantes, que induzem a danos que podem ser revertidos. Assim, o GHS estabeleceu 3 classificações de efeito: 1 (corrosivo), 2 (irritante) e 3 (médio irritante) sendo esta última aplicada apenas para substâncias específicas. Tais classificações foram baseadas em respostas obtidas com o uso de animais (UN, 2018).

De acordo com Diegel (2019), os principais efeitos provocados após injúrias na pele devido a ação de agentes irritantes são: reações inflamatórias na derme, espessamento do estrato córneo e, em casos mais graves, o espessamento da epiderme toda. Já a corrosão, provoca necrose superficial, podendo se espalhar para a epiderme toda, dependendo da gravidade.

Os protocolos da OECD para essas avaliações começaram a ser desenvolvidos na década de 80. Os guias n.404 e n.406 tratam de testes *in vivo* para avaliação de efeitos em decorrência de exposição dérmica em animais, como corrosão e sensibilização, respectivamente (OECD, 1992; OECD, 2015a). Entretanto, após o fortalecimento do princípio dos 3R's, novas formas de avaliação de risco e segurança de substâncias começaram a ser exploradas, visando a substituição do uso de animais e, quando não fosse possível, ao menos a redução no uso. Com isso o guia n. 406 foi substituído pelo 429 por melhor atender ao princípio dos 3R's, promovendo menos sofrimento aos animais utilizados nos testes de avaliação de sensibilização (OECD, 2010).

Em março de 2002, ocorreu um encontro promovido pela OECD na comunidade científica, quando foram discutidos diversos pontos importantes a respeito do desenvolvimento e validação de métodos alternativos ao uso de animais. Esse encontro originou um documento importante sobre a avaliação de risco e segurança de substâncias, descrevendo os principais requisitos que devem constar em novas metodologias para essas avaliações. A partir da

publicação deste documento, diversos protocolos passaram a ser desenvolvidos e aplicados, sempre considerando os 3R's (OECD, 2005).

Mesmo com a ascensão dos testes *in vitro*, alguns testes *in vivo* tais como os guias 402 (toxicidade dérmica aguda), 404 (Irritação/Corrosão dérmica aguda) e 429 (Sensibilização cutânea) ainda são usados em situações que essas avaliações ainda se façam necessárias. Mas vale ressaltar que todos os testes foram modificados para atender os requisitos exigidos pela OECD para o refino, minimizando ao máximo o sofrimento físico e psicológico dos animais (OECD, 2010; OECD,2015a; OECD, 2017).

Dentre os testes *in vitro* atualmente recomendados para avaliação da toxicidade dérmica aguda, estão os guias da OECD 430 (corrosão da pele *in vitro*: método de resistência elétrica transcutânea), 435 (avaliação de barreira *in vitro*), 431 (avaliação de corrosão utilizando *Reconstructed Human Epidermis* - RHE) e 439 (avaliação de irritação utilizando RHE) (OECD, 2010; OECD, 2015b,c; OECD, 2017; OECD, 2019a,b). Além dos testes propriamente ditos, os protocolos 431 e 439 também indicam a necessidade de avaliar a proficiência de modelos desenvolvidos visando a validação empregando testes histológicos e avaliação da função como barreira, para que possam ser utilizados na avaliação da toxicidade aguda dérmica (OECD, 2019a; OECD, 2019b).

Em 2015, a OECD publicou um documento para estabelecer requisitos importantes e específicos para a validação e utilização dos protocolos 431 e 439 (OECD, 2015d; OECD, 2015e). Dentre os requisitos indispensáveis estão os métodos permitidos para a realização da determinação do sal de formazan na avaliação da viabilidade celular, o tempo de exposição necessário, princípios para a classificação da substância quanto a sua toxicidade de acordo com o efeito provocado no tecido. Além disso, cada documento apresenta uma lista de substâncias padronizadas que devem ser utilizadas na avaliação da proficiência do modelo de forma a produzir resultados fidedignos.

O teste de irritação, segundo ao protocolo 439 considera que para uma substância teste ser considerada irritante no teste *in vitro*, é necessário que a viabilidade seja inferior a 50% quando comparado ao controle negativo. Já o protocolo 431, considera que uma substância teste é corrosiva quando a viabilidade for inferior a 35% em comparação ao controle negativo. Como são avaliados alguns tempos de exposição pré-determinados, a gravidade do efeito é determinada de acordo com o período em que ocorre a queda na viabilidade (OECD, 2015d; OECD, 2019a,b). A padronização determinada pelos protocolos, são essenciais para os resultados obtidos serem confiáveis e comparáveis aos outros modelos (KANDÁROVÁ et al., 2018).

Neste trabalho, além dos ensaios de irritação e corrosão citados no item 1.3, estudamos também a capacidade dos corantes estudados de induzir a morte celular e genotoxicidade.

1.5. Morte celular e genotoxicidade

As células possuem um maquinário complexo e responsável por manter as funções celulares e, quando são expostas a estressores extremos sejam eles mecânicos ou físicoquímicos, a célula pode entrar em processo de morte (GALUZZI et al., 2015). Muitas vezes a morte celular não é considerada um mecanismo prejudicial, pois alguns eventos ocorrem para manter a homeostasia do organismo (GALUZZI et al., 2015).

As células ao entrarem em processo de morte, liberam alguns marcadores. Dependendo do tipo de sinalização ou injúria que ocorre na célula o processo de morte celular percorre um caminho diferente (GALUZZI et al., 2015). Atualmente, são conhecidos diferentes processos de morte celular:

- Apoptose: ocorre por ativações bioquímicas promovidas por caspases que são responsáveis por ativar uma cascata de reações que induz a alterações morfológicas na célula como a fragmentação do DNA e destruição de organelas. Geralmente a célula que entra neste processo de morte não danifica as células vizinhas (KABAKOV; GABAI, 2018; D'ARCY, 2019);
- Piroptose: o processo de morte por essa via é bastante comparável a apoptose, no entanto nesta ocorre a ativação de interleucinas, que são mediadores relacionados às respostas inflamatórias. Além disso, essas citocinas são liberadas no meio extracelular, tornando a resposta maior, atingindo células vizinhas (D'ARCY, 2019);
- Autofagia: processo de morte que ocorre quando a célula detecta a restrição energética, que pode estar relacionada a fatores extrínsecos ou não. A partir disso, a própria célula começa a promover uma degradação interna para a obtenção de energia, através da reciclagem das organelas em excesso, sendo um evento que promove diminuição da capacidade metabólica da célula. Porém, quando a privação enérgica é intensa, o processo pode evoluir para morte (D'ARCY, 2019);

 Necrose: processo de morte celular que ocorre devido a uma injúria grave que faz com que a célula não consiga se recuperar. Geralmente, o efeito atinge células vizinhas e o processo de morte acontece em mais de uma célula (KABAKOV; GABAI, 2018; D'ARCY, 2019).

A avaliação do mecanismo de morte celular por métodos variados é importante para a avaliação da ocorrência da ativação de um ou mais processos celulares. Neste trabalho, forma utilizados três diferentes métodos de avaliação de viabilidade celular, como será apresentado no item 3 deste documento.

A molécula de DNA como é conhecida hoje, foi descrita pela primeira vez por Watson e Crick na década de 50. O DNA está presente nas células e carrega as informações essenciais de um indivíduo, garantindo a estabilidade e integridade genômica, para que as informações sejam passadas corretamente para as novas gerações celulares após a divisão. Quando ocorre um dano à molécula de DNA, ou genotoxicidade, que o sistema de reparo celular não é capaz de corrigir, esse dano pode ser passado para gerações posteriores, evento conhecido como mutação (RADHIKA; JYOTHI, 2019; WATSON; CRICK, 1953; CLANCY, 2008; PRAY, 2008).

Os testes de avaliação de genotoxicidade e mutagenicidade são utilizados para a identificação do potencial das substâncias em provocar danos no DNA, além disso possuem um papel na regulamentação de produtos. Pelo fato de existirem diversos tipos de dano que podem ocorrer, existem diversos testes disponíveis para a determinação dos mecanismos de dano (DOMINGUEZ; SALES, 2007; RADHIKA; JYOTHI, 2019). Neste trabalho, foi utilizado o ensaio do Cometa *in vitro*. O princípio do teste consiste na avaliação de quebras de DNA de cadeias duplas ou simples e sítios álcali-labeis em núcleos de células após a aplicação de uma corrente eletroforética capaz de separar por tamanho e peso os fragmentos de DNA (TICE et al., 2000; OECD, 2016).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal desenvolver e validar um modelo tridimensional de epiderme para utilização como plataforma de avaliação de toxicidade dérmica induzida por corantes capilares e outros produtos cosméticos. Para tanto, propusemos os seguintes objetivos específicos:

- Construção do modelo de epiderme equivalente e avaliação dos marcadores de diferenciação celular;
- Validação da determinação do sal de Formazan utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Avaliação da proficiência do modelo para detecção de efeitos irritantes e corrosivos após a exposição do modelo desenvolvido a substâncias selecionadas;
- Avaliação da função barreira do modelo 3D.
- Avaliação dos efeitos citotóxicos e genotóxicos provocados pelos corantes BB99 e BR51 em queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) cultivados em monocamada em comparação com o modelo 3D (epiderme humana equivalente);
- Avaliação de corrosão (TG 431) e irritação (TG 439) induzidos pelos corantes BR51 e BB99 utilizando cultura celular 3D.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Foram utilizados os corantes Basic Red 51 (BR51; CAS n°77061-58-6) e Basic Blue 99 (BB99; CAS n° 68123-13-7, pureza >63%) adquiridos da Sensient Technology Corporation. Foram utilizados ainda *EnvisionTM FLEX, High pH* (K8000-DAKO) para avaliação dos marcadores celulares por imunohistoquímica, *DeadEndTM Fluorometric TUNEL System* (G3250-Promega) para detecção de fragmentação no DNA, *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit* (I-55647-BD) para detecção de mecanismo de morte celular induzido por necrose e apoptose.

Os materiais biológicos utilizados para o cultivo celular em monocamada e 3D foram os queratinócitos imortalizados de pele humana (HaCaT- BCRJ-0341) e os fibroblastos de pele de prepúcio humano (HFF-1- BCRJ-0275), adquiridos do banco de células do Rio de Janeiro.

3.2. Métodos

3.2.1. Cultivo celular

A suspensão celular (HaCaT) previamente armazenada em nitrogênio, foi transferida para uma garrafa de cultura T75 (BD) contendo o meio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium- high glucose* (DMEM 12800017- Gibco) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco) e 1% de mistura de antibióticos: penicilina e estreptomicina (Sigma). As células foram cultivadas em atmosfera úmida a 37°C e contendo 5% CO₂ em incubadora (Thermo Electron Corporation- Forma series II *water jacketes* CO₂ *incubator*, HEPA *class* 100). Ao atingir, aproximadamente, 80% de confluência, as células foram lavadas com PBS e depois submetidas à ação da enzima (T*rypLE- express* 12604013-Gibco) 1:1 (enzima: PBS) por 10 minutos, seguida da inativação com meio suplementado, centrifugação e transferência do pellet celular ressuspendido em meio de cultura para outra garrafa. As células foram utilizadas nos ensaios a partir da 3ª passagem pós-descongelamento.

A suspensão celular de fibroblastos HFF-1, previamente armazenados em nitrogênio, foi transferida para uma garrafa de cultura celular contendo meio DMEM suplementado com 15% de soro bovino fetal e e 1% de mistura de antibióticos: penicilina e estreptomicina (Sigma).

As células foram cultivadas em atmosfera úmida a 37°C com 5% de CO₂. Ao atingir aproximadamente 80% de confluência, as células foram lavadas com PBS e depois submetidas a ação da *tryple express* 1:1 (PBS: *tryple express*) por 5 minutos, seguida da inativação com meio suplementado, centrifugação e transferência para outra garrafa, contendo 15 mL de DMEM, suplementado com 15% de soro bovino. As células foram então mantidas nas mesmas condições de incubação por 24 horas. Após o cultivo, o meio foi recolhido e utilizado na construção do modelo de epiderme, como descrito abaixo.

3.2.2. Cultivo do modelo de Epiderme Humana Equivalente

O modelo de Epiderme Humana Equivalente (EHE) foi desenvolvido empregando queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT), por isso, neste documento o modelo será designado como HaCaT-EHE. O processo de descongelamento, cultivo e ação da tripsina foi realizado conforme citado anteriormente. Para a construção da epiderme, o pellet obtido foi submetido à contagem em câmara de Neubauer e o volume necessário da suspensão celular foi verificado, visando obter 2,5 x 10⁵ células HaCaT para cada modelo. A suspensão celular foi transferida para um tubo cônico e o volume foi completado com meio Raft. Raft é o nome do meio utilizado exclusivamente no cultivo da epiderme, ele é composto por uma mistura de meios e suplementos em proporção definida e seu modo de preparo será demonstrado adiante. Desta suspensão, 1 ml foi transferido para o suporte transwell, com poro de 0,4 µm (3460-Corning), previamente preparado com 80 µL de solução de *coating* de colágeno IV (Sigma- 0,3 mg/mL). A placa foi incubada em atmosfera úmida a 37°C e 5% CO₂ por 48 horas. Decorrido o tempo, os suportes transwell foram transferidos para uma placa deep- well (355467-I- Falcon) sob os suportes cell-strainer (352360- BD) com poro de 100 µm (Figura 7). Na placa deepwell, foi adicionado em média 9 mL por poço do meio Raft para epiderme, preparado segundo Pedrosa et al. (2017), como se segue: DMEM (Gibco) e HAM-F12 (Gibco) -3:1, insulina (Sigma) 5µg/mL, toxina colérica (Sigma) 2ng/mL, TgF (Invitrogen) 2ng/mL, EgF (Sigma) 1ng/mL, apotransferrina (Sigma) 5µg/mL, hidrocortisona (Sigma-Aldrich) 0,4µg/mL e 5% de meio proveniente do cultivo de fibroblastos. Devido a presença de cálcio na fórmula do DMEM utilizado, este não foi adicionado no meio suplementado para epiderme. As placas foram mantidas em atmosfera úmida a 37°C e contendo 5% CO2 (Thermo Electron Corporation-Forma series II water jacketes CO₂ incubator, HEPA class 100).

O meio foi trocado a cada 3 dias e a cultura mantida em interface ar-líquido. No 13º dia a tensão de umidade foi diminuída para promover a diferenciação em estrato córneo, completando o processo de crescimento do modelo em interface ar-líquido até 16 dias.

O procedimento de montagem do modelo foi realizado em colaboração com a Profa. Dra. Silvya Stuchi Maria-Engler da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, onde foi realizado o treinamento da técnica durante o período de abril de 2016 a junho de 2016.

Figura 7- Transwell sob cell strainer em placa deep well



Fonte: Autoria própria

Representação do modo de cultivo da epiderme no período da interface ar-líquido. O modelo recebe a nutrição pelo meio de cultura por meio da camada basal, o *cell-strainer* serve de apoio para o *transwell* para que este esteja em contato com o meio de forma adequada.

3.2.3. Controle de qualidade dos modelos de epiderme equivalente

3.2.3.1.Histologia dos modelos de epiderme equivalente

Um modelo de epiderme foi separado em cada lote produzido visando a avaliação do crescimento tecidual e diferenciação celular. Quando os parâmetros mencionados não se apresentavam de acordo, todo o experimento era repetido. Os tecidos foram retirados do *transwell* com o auxílio de uma lâmina tipo bisturi, colocados em um cassete histológico sob uma superfície porosa (Figura 8) e fixados com formaldeído tamponado (Sinth) 4% por 24 horas a 8°C (100 mL de solução para cada cassete). Passado o tempo, os cassetes foram lavados com etanol 50% e armazenados em álcool 70% a 8°C por até uma semana.

Os tecidos foram desidratados com 6 banhos de 20 minutos de etanol (80% a 99%), diafanizados com 4 banhos de 15 minutos de xilol e submetidos a parafina a 60°C por 4 horas. Após esse período, os tecidos foram submetidos a um banho de parafina a vácuo, cortados ao meio e inseridos no suporte para complementação do volume com parafina. Após a solidificação, os blocos foram retirados do suporte e cortados em Micrótono (Leica RM 2065) com espessura de 8 micras. Os cortes histológicos foram colocados em lâminas pré-preparadas com solução de albumina, permanecendo em repouso até a secagem completa.

Após a confecção das lâminas, foi realizado o processo de coloração com hematoxilina/eosina. Para tanto, as lâminas foram submetidas à desparafinização a 60°C por 40 minutos, seguida de uma sequência de banhos para a hidratação do tecido: 2 de banhos 15 minutos em xilol seguidos de banhos de 2 minutos em etanol 100%, 90%, 70%, 50%. Posteriormente, as lâminas foram lavadas e coradas com hematoxilina por 1 minuto. Decorrido o tempo, foram lavadas em água corrente para a retirada do excesso e coradas com eosina pelo mesmo período. Os cortes histológicos passaram por outro processo de desidratação com banhos consecutivos de etanol e xilol.

Após a desidratação do tecido já corado, foi adicionado sob a lâmina o meio de montagem (Sakura), seguido da adição de uma lamínula sob o tecido. Esta etapa do trabalho foi realizada em colaboração com o Laboratório de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Figura 8- Representação do tecido coletado do *transwell* sob superfície porosa no cassete histológico.



Fonte: Autoria Própria Representação do tecido coletado do *transwell* sob superfície porosa no cassete histológico.

3.2.3.2. Avaliação da expressão de marcadores de diferenciação celular

Os tecidos anteriormente incluídos na parafina, foram submetidos novamente ao corte em micrótono (Leica RM 2065) com espessura de 8 micras. Os cortes histológicos foram colocados em lâminas pré-preparadas com solução de silano e permaneceram em repouso até a secagem completa.

Após a secagem, as lâminas foram submetidas à desparafinização a 60°C por 40 minutos. Em seguida foi realizada uma sequência de banhos para a hidratação do tecido: 2 de banhos 15 minutos em Xilol seguidos de banhos de 2 minutos em etanol 100%, 90%, 70%, 50% e água destilada.

Para a determinação dos marcadores de diferenciação celular, foi utilizado o kit *Envision*TM *FLEX*, *High pH* (K8000-DAKO). Após o procedimento de desparafinização, as lâminas foram lavadas com PBS e transferidas para uma cuba para lâminas de porcelana contendo solução de tampão de recuperação antigênica de Tris: EDTA pH 9,0 (EnVisionTM *FLEX targed retrieval high pH*), em quantidade suficiente para recobrir o tecido fixado na lâmina. A cuba foi mantida em banho-maria no micro-ondas por 2 minutos. Logo em seguida, as lâminas foram resfriadas em temperatura ambiente por, aproximadamente, 25 minutos.

As lâminas foram lavadas 3 vezes com o tampão composto por solução salina, tris e Tween 20, pH 7,6 diluída em 1x (*EnVision™ FLEX Wash Buffer* 20x). Na sequência, foram lavadas 3 vezes com tampão glicina 0,1M (Sigma) e novamente lavadas 3 vezes com tampão tris. Foram, então, transferidas para um recipiente e colocadas sob esponja úmida, para evitar a secagem das soluções sob o tecido. Posteriormente, foram mantidas em solução de peróxido de oxigênio 3% por 10 minutos. Após o período, as lâminas foram cuidadosamente lavadas por duas vezes com tampão tris.

Realizou-se o bloqueio com solução de PBS-BSA 0,2% por 30 minutos para impedir as ligações inespecíficas. As lâminas foram lavadas 2x com tampão tris. O excesso de líquido foi cuidadosamente retirado com auxílio de papel absorvente fino e os cortes foram demarcados com caneta hidrofóbica. Os anticorpos primários foram diluídos em solução de PBS-BSA 2%,

adicionados aos cortes (1 marcador por corte) e incubados por 1 hora em câmara úmida e protegidos da luz. Os anticorpos utilizados foram:

- Anti-citoqueratina 10 (CK10- mouse monoclonal-abcam 9026, Abcam- Cambridge-USA) -1/150;
- Anti-citoqueratina 14 (CK14- mouse monoclonal- abcam 7800, Abcam- Cambridge-USA)
 -1/500;
- Anti-filagrina (Filagrin mouse monoclonal- ab218397, Abcam- Cambridge-USA) 1:100;
- Anti- involucrina (Involucrin mouse monoclonal- ab68, Abcam- Cambridge-USA) 1:500.

Como controle negativo utilizou-se apenas o tampão tris. Após a incubação, procedeuse a lavagem com PBS-BSA 2% e tampão tris por 3 vezes. Foram adicionados aos cortes, 200 μ L da solução amplificadora do sinal do anticorpo primário (*EnVisionTM FLEX* + *Mouse linker*). Incubou-se por 1 hora em câmara úmida e protegida da luz.

As lâminas foram cuidadosamente lavadas por 3 vezes com tampão tris e, após a retirada do excesso de líquido com auxílio de papel absorvente fino, adicionou-se a solução de diaminobenzidina (1 gota da solução do kit diluída em 1mL de água destilada) sobre os cortes. Quando a coloração castanha ficou visível a olho nu, a reação foi interrompida adicionando o tampão tris ao corte. As lâminas foram cuidadosamente lavadas por 2 vezes com tampão tris, e em seguida coradas com hematoxilina por 15 segundos.

As lâminas foram submetidas a bateria de banhos de, aproximadamente, 3 minutos para desidratação dos cortes seguindo a ordem: água destilada, álcool 50%, álcool 70%, álcool 90%, xilol. Após a secagem, as lâminas foram montadas com DPX (6522 Sigma-Aldrich), foi adicionada uma lamínula (24x60mm, Deckgläser) e permaneceu *overnight* em repouso para a secagem.

3.2.3.3.Validação da determinação do sal de Formazan utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para a realização do ensaio de irritação e corrosão que serão descritos ao longo do texto, é necessária a avaliação da viabilidade celular por meio da medição da atividade da enzima succinato desidrogenase, classicamente avaliada pelo ensaio colorimétrico que utiliza o reagente brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT) (Mosman, 1983). Este teste consiste na clivagem do anel de tetrazólio do MTT, transformando-o em cristais insolúveis na água e de coloração roxo, chamado de formazan [E,Z- 1-(4,5dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazan]. Assim sendo, a produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória, ou seja, a redução MTT só é possível em células metabolicamente viáveis.

No entanto, por se tratar de um teste colorimétrico, a coloração dos corantes BR51 e BB99 interferem na leitura em espectrofotômetro, que é usualmente utilizado para a determinação do sal. Normalmente, a cultura celular em monocamada exposta aos corantes não sofre interferência, pois a lavagem com PBS consegue retirar boa parte do corante. Porém o modelo 3D após a exposição aos corantes, permanece colorido mesmo após a lavagem com PBS, devido a impregnação destes no tecido. Com isso a obtenção dos resultados fica prejudicada (dados não mostrados). Por este motivo, foi validado o método de determinação do sal de formazan, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que devido a seletividade do método, é capaz de eliminar os interferentes proveniente da coloração durante leitura. O ensaio foi validado seguindo os protocolos estabelecidos pela OECD e FDA (ALÉPÉE et al., 2015; EURL-ECVAM, 2017; FDA, 2018b; OECD, 2019a,b).

Para tanto, o cromatógrafo LC-10AT (Shimatzu) equipado com detector UV-vis SPD-10A (Shimatzu) foi utilizado. Como fase móvel utilizou-se uma mistura de acetonitrila e água (80:20), coluna RP_18 (5µm) LichroCART[®] 125_4 cartridge (Lichrospher 100[®]), fluxo de 1,2mL/min., comprimento de onda em 555nm com atenuação 4.

Foi preparada, primeiramente, uma solução estoque na concentração de 1.000 μ g/mL. Para tanto, o sal de formazan (Sigma) foi diluído em isopropanol e mantido sob agitação (120rpm) *overnight* para completa diluição. A partir desta solução, foi preparada a curva de calibração utilizando 7 concentrações (0,5 μ g/mL; 1 μ g/mL; 2 μ g/mL; 20 μ g/mL; 50 μ g/mL; 100 μ g/mL; 200 μ g/mL). De cada solução, 1mL foi transferido para um tubo cônico de vidro onde promoveu-se a secagem completa da solução sob fluxo de ar comprimido, seguida da ressuspensão com 400 μ L de fase móvel e homogeneização em vórtex por 1 minuto. Desta solução, 100 μ L, foram injetados manualmente no equipamento. Para a obtenção de tecidos mortos, os tecidos foram incubados por 24 horas em água destilada seguido de congelamento a -20°C. Para a validação do método, os seguintes parâmetros foram avaliados, seguindo as recomendações do guia publicado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e dos protocolos OECD 439 e 431 (FDA, 2018b; OECD, 2019a,b):

- Sensibilidade: considerada a variação da resposta em comparação com a concentração do analito. Dada a equação da reta obtida, foi determinado o valor de x para a visualização do valor real obtido, a partir do valor real obtido foi avaliado o coeficiente de variação.
- Seletividade: teste realizado para a avaliação da capacidade do método em detectar a substância de interesse, sem a presença de possíveis interferentes no pico resultante da análise. Este ensaio foi realizado por meio de análises apenas do tecido (matriz biológica), sem adição de qualquer tratamento ou sal de formazan. Para isso, foram utilizados 6 modelos de epiderme (3 viáveis e 3 não viáveis) com a adição apenas do solvente de extração, o isopropanol (ALÉPÉE et al., 2015; OECD, 2019a,b; FDA, 2018b).
- Precisão: teste realizado para avaliar a capacidade do método em fornecer resultados próximos, quando avaliada uma mesma concentração em diferentes condições de análise (ALÉPÉE et al., 2015; OECD, 2019a,b; FDA, 2018b). Para isso, foram preparadas 3 soluções estoque independentes e de cada uma preparou-se uma curva de calibração com 7 pontos. Uma análise em triplicata de cada curva foi avaliada em 3 dias diferentes e, então, avaliou-se o coeficiente de variação intradia e interdia. O cálculo do coeficiente de variação foi realizado com a seguinte fórmula:

Coeficiente de Variação (%)= (padrão / medida obtida) x 100

- Exatidão: teste definido pela avaliação da proximidade entre a concentração injetada (concentração verdadeira) no equipamento e a concentração encontrada (concentração medida). O ensaio foi realizado em 3 dias consecutivos e a análise em 3 concentrações diferentes (2 μg/mL; 20 μg/mL; 100 μg/mL) em quintuplicata. Foram realizadas medidas consecutivas intradia e interdia do analito (ALÉPÉE et al., 2015; EURL-ECVAM, 2017; FDA, 2018b). Calculado foi realizado conforme a fórmula abaixo onde CV corresponde à concentração verdadeira e CM à concentração medida. O valor adequado para aceitação deve e ser menor ou igual a 15%:

Exatidão (%)= [(CV-CM) / CV] x 100

Recuperação: consiste em verificar a presença de interferentes presentes na matriz biológica em questão, quando fortificada com o analito de interesse, podendo ser metabólitos ou enzimas. Para a realização do procedimento, foram adicionados a 5 modelos de epiderme 3 concentrações conhecidas do sal de formazan (2 μg/mL, 20 μg/mL, 100 μg/mL) que foi extraído com o isopropanol. Verificou-se a recuperação do analito determinando assim eficiência da extração do método, além da existência de algum interferente ao comparar o experimento à curva de calibração (ALÉPÉE et al., 2015; FDA, 2018b; OECD, 2019a,b). Dos 5 modelos utilizados, 2 modelos foram fortificados com a concentração de 2 μg/mL, 1 modelo com concentração de 20 μg/mL e 2 modelos na concentração de 100 μg/mL. O cálculo foi realizado conforme a fórmula abaixo e a recuperação aceitável deve ser superior a 85%.

Efeito Matriz (%) = (Concentração recuperada / Concentração do padrão) x 100

- Carry Over: esse teste consiste na detecção do analito residual após a injeção de uma concentração muito elevada (200 μg/mL) do sal de formazan, seguida de uma injeção contendo apenas a fase móvel, adicionalmente também foi realizado a injeção de fase móvel utilizando uma matriz. A detecção do sal de formazan, não pode ser superior a 20% da quantidade injetada (ALÉPÉE et al., 2015; FDA, 2018b; OECD, 2019a,b).
- Reprodutibilidade/ Robustez: consiste na avaliação da capacidade de detecção de quantidades conhecidas de analito. A robustez é dada pela capacidade do método em fornecer resultados similares quando avaliados intradia ou interdia (ALÉPÉE et al., 2015, FDA, 2018b; OECD, 2019a,b). O erro padrão relativo foi calculado conforme a fórmula abaixo, onde CM refere-se à concentração medida e CR à concentração real.

Erro Padrão Relativo (%) = [(CM-CR) / CR] x 100

3.2.3. Ensaios realizados em células cultivadas em monocamadas

3.2.3.1.Viabilidade celular (MTT)

O ensaio de MTT é um teste de viabilidade clássico, capaz de mensurar a função mitocondrial da célula (PARK et al., 2015). Embora seu uso seja mais comum para uma avaliação preliminar da citotoxicidade de algumas substâncias, o ensaio também pode ser realizado para avaliação de proliferação celular (ALERICO et al., 2015). Neste trabalho, esse ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar a citotoxicidade.

O ensaio foi realizado com células HaCaT cultivadas em monocamada em garrafa T75 (corning) e mantidas em meio DMEM. Após atingirem aproximadamente 80% de confluência, as células foram lavadas com PBS e, então submetidas à ação da tripsina-EDTA 0,1% por 5 minutos, seguida da inativação com meio suplementado, centrifugação e contagem do pellet celular obtido para a realização do experimento. As células foram utilizadas nos ensaios entre a 3ª e 7ª passagem pós descongelamento.

O protocolo de Mosmann (1983) foi seguido com algumas modificações. Para tanto, plaqueou- se 1×10^4 células/poço de HaCaT, em placas de 96 poços e incubou-se por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂ em atmosfera úmida.

Neste ensaio, as concentrações dos corantes foram escolhidas com base em ensaios preliminares (dados não mostrados) que demonstraram a faixa de concentração de interesse. Dentre as concentrações, para o BR51 utilizou-se de 5 μ g/mL a 25 μ g/mL, e para o BB99 de 10 μ g/mL a 50 μ g/mL. Como controle negativo, utilizou-se DMEM e para o controle positivo o carbonil cianeto-3- clorofenilhidrazona (2.000 μ g/mL, Sigma). Para cada concentração/controle, foram plaqueados 3 poços com suspensão celular.

As células foram incubadas por 24horas, lavadas 2 vezes com PBS e em cada poço foi adicionado 200 μ L de reagente de MTT (0,5 mg/mL-M2128, sigma) diluído em DMEM *low glucose* sem vermelho de fenol (D2902-Sigma). As placas foram incubadas por mais 3h, protegidas da luz, a 37°C e 5% CO₂ em atmosfera úmida. Decorrido este tempo, o conteúdo da placa foi cuidadosamente descartado, em cada poço foram adicionados 25 μ L de solução de glicina diluída em água ultrapura (219517, sigma) na concentração de 15 μ g/mL, juntamente com 200 μ L de DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich CAS 67-68-5) para a solubilização dos cristais de formazan. O ensaio de viabilidade com cultura celular em monocamada é considerado um teste preliminar, utilizado para avaliação da capacidade citostática, proliferativa e citotóxica de uma substância (MOSMANN, 1983). Diferente do procedimento realizado com a cultura em 3D, na cultura em monocamada a determinação da intensidade da

coloração roxa (Figura 9) foi realizada por leitura em leitor de ELISA -filtro de 570 nm, (Biotek EL800 -Winooski, USA). O ensaio foi realizado em triplicata independente.

Figura 9- Representação da coloração formada pela clivagem do sal tetrazólio após homogeneização com Dimetilsulfóxido (DMSO).



Fonte: Autoria própria

Poços indicando a presença de coloração roxa devido a clivagem do sal tetrazólio formando sal de formazan. A figura mostra que a intensidade de cor diminui da esquerda para direita, demonstrando que a viabilidade está diminuindo nesse sentido.

A viabilidade celular foi calculada de acordo com a seguinte equação:

Viabilidade (%) = (absorbância da amostra / absorbância do controle negativo) x 100

Com base nos resultados obtidos neste ensaio, foram definidas as concentrações para os outros ensaios.

3.2.3.2.Ensaio de Anexina V/PI

O ensaio de viabilidade celular (anexina V/PI) foi utilizado para avaliar o mecanismo de morte celular observada no ensaio do MTT induzida pelos corantes. O método consiste na detecção da fluorescência emitida pela FITC anexina V e iodeto de propídeo, após a ligação desses marcadores nas células empregando a citometria de fluxo (HINGORANI et al., 2011). A anexina V se liga a fosfatidilserina externalizada pela membrana celular e o PI se liga ao DNA celular (KABAKOV; GABAI, 2018).

Foram seguidas as recomendações do fabricante do Kit FITC *Annexin V Apoptosis Detection* Kit (I-556547- BD) com algumas modificações. Para tanto, foram plaqueadas 1×10^5 células/poço de HaCaT, em placa de 6 poços e incubadas por 24 horas à 37°C e 5% de CO2 em atmosfera úmida. Após esse período, o BB99 foi adicionado e diluído em PBS nas concentrações entre 2,5 a 45 µg/mL, definidas com base no ensaio de viabilidade celular (MTT), como citado anteriormente. O PBS foi utilizado como controle negativo e a cisplatina 0,5 mg/mL como controle positivo, foram plaqueadas 3 poços por concentração/controle. As células expostas ao corante foram incubadas por 4 horas. Nosso grupo já avaliou o mecanismo de morte celular induzido pelo corante BR51 (ZANONI et. al, 2014) e, por isso, não foi realizado neste trabalho.

Após o tratamento, o meio de cultivo foi transferido para tubos cônicos (BD) e as células foram lavadas com PBS e, então submetidas a ação de 1mL de tripsina-EDTA 0,20% por 10 minutos a 37°C. Após esse período, a tripsina foi inativada com 1 mL de meio contendo soro bovino fetal e centrifugadas a 212g por 5 minutos. Os tubos foram submetidos e mantidos em gelo e o sobrenadante foi descartado. A FITC anexina foi diluída em tampão 1x (10x Annexin V Binding Buffer 556454) e 50µL desta solução foram adicionadas ao pellet, após adição da solução de FITC anexina, o conteúdo foi transferido para tubos acrílicos para citometria (falcon) para leitura em citômetro de fluxo BD FACSCanto I em colaboração com o Laboratório Multiusuário de Citometria de Fluxo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Pouco antes da leitura, foram adicionados 50 µL de solução 2,5 µg/mL de iodeto de propídeo por tubo (exceto o tubo branco), o iodeto de propídeo também foi diluído com o mesmo tampão, para a leitura da anexina o comprimento de onda da emissão de 535nm e excitação de 485nm, para a leitura do iodeto de propídeo o comprimento de onda da emissão foi 545±nm e excitação 590±20 nm. Os testes foram realizados em triplicata e para análise estatística, foi feita a análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Dunnet (LOVELL; OMORI, 2008). As análises foram feitas por meio do software GraphPrism, versão 5.0. Os resultados com p < 0.05 foram considerados estatisticamente significativos.

3.2.3.3.Ensaio de genotoxicidade

O ensaio do cometa foi utilizado para investigar possíveis danos causados no DNA de células eucarióticas em decorrência da exposição aos corantes. Este ensaio é capaz de detectar sítios álcali-lábeis, quebras de cadeia simples e dupla (TICE et al., 2000).

O protocolo de Tice et al. (2000), foi seguido com algumas modificações. Para tanto, foram plaqueadas $2x10^5$ células/poço de HaCaT, em placa de 6 poços e incubadas por 24 horas à 37°C e 5% de CO₂ em atmosfera úmida. Após esse período, foram adicionados os corantes diluídos em PBS, nas concentrações definidas com base no ensaio de viabilidade celular (MTT). As células foram expostas por 4 horas e as concentrações variaram de 5µg/mL a 35 µg/mL para o BB99 e de 5 µg/mL a 50 µg/mL para o BR51. Como controle negativo foi utilizado o PBS e como controle positivo o Metilmetanosulfonato a 15 µg/mL (MMS, Sigma-Aldrich), com exposição de 3 horas para evitar fragmentação excessiva do DNA. As células foram lavadas, tripsinizadas e centrifugadas a 212g por 5 minutos.

Do pellet obtido, 15 µL foram utilizados para avaliação da viabilidade com o corante azul de tripano e o restante foi homogeneizado em 140 µL agarose LMP 0,5% (p/v) (Invitrogen) estabilizada a 37°C. Foram adicionados 70 µL dessa suspensão em lâminas (Deckgläser) previamente revestidas com agarose ultrapura 1,5% (p/v) (Sigma-Aldrich), após a adição da suspensão, as lâminas foram recobertas por lamínulas (24x60mm, Deckgläser), mantidas a 4°C por aproximadamente 15 minutos para a solidificação da agarose. As lamínulas então foram retiradas e as lâminas submetidas em solução de lise (2,5 M de NaCl PA-Sinth, 100 mM de EDTA PA- Sinth, 10 mM de tampão Trizma-base-Sigma, pH 10.4, com 1% Triton X-100-Sigma e 10% DMSO- Sigma) por 24 horas. Após a lise, as lâminas foram transferidas para a cuba de eletroforese contendo tampão alcalino (EDTA 200 mM, NaOH Sinth a 10 M, pH≥13) permanecendo por 20 minutos para o relaxamento do DNA. Após esse período, as lâminas foram submetidas a eletroforese (25V, 300mA) por mais 20 minutos. Decorrido o tempo da corrida de eletroforese, as lâminas foram neutralizadas em tampão Trizma (Sigma), HCl (Sinth) a 4,85% (pH 7,5) por 20 minutos. Após a neutralização, as lâminas foram secas, fixadas em etanol absoluto (Sinth) por 5 minutos e armazenadas em temperatura ambiente até a realização das análises.

As lâminas foram coradas com 200µL de solução de Gel Red (3,5x, Biotium) e examinadas em microscópio de fluorescência (Nikon, modelo 027012) na objetiva de 40x usando o filtro verde. As lesões no DNA foram quantificadas por meio da avaliação da intensidade de DNA na cauda (*Tail intensity* ou *DNA tail*) (KUMARAVEL et al., 2009; FRANCHI et al., 2015), empregando o software de análise de imagem *Comet Assay IV*. Foram confeccionadas duas lâminas por tratamento e dessas 50 nucleóides foram selecionados ao acaso totalizando 100 nucleóides por tratamento.

O ensaio foi realizado em triplicata e para análise estatística foi feita a análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de *Dunnet* (LOVELL; OMORI, 2008). As análises foram feitas por meio do *software GraphPrism*, versão 5.0. Os resultados com p < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

3.2.4. Ensaios realizados com cultura celular 3D

3.2.4.1.Ensaio de genotoxicidade

O ensaio de genotoxicidade foi realizado na cultura 3D de acordo Reus et al. (2013) com pequenas modificações. Foram utilizadas as concentrações de 50 a 1.000 μ g/mL para o BR51 e de 100 a 1.000 μ g/mL para o corante BB99. Como controle negativo foi utilizado o PBS e como controle positivo o Metilmetanosulfonato (MMS) a 30 μ g/mL.

Os modelos foram expostos aos controles e corantes por 4 horas, seguido da lavagem com PBS por 25 vezes. Depois de lavados, os insertos foram transferidos para uma placa de 12 poços e submetidos a exposição com 2 mL de solução 0,25% de tripsina- EDTA, divididos em 1mL abaixo do inserto e 1 mL acima deste, permanecendo assim por 15 minutos a 37°C. A tripsina foi inativada com 2mL de meio suplementado e a suspensão celular obtida foi filtrada em *cell strainer* (352340- falcon) de 40 µm e centrifugada a 212 g por 5 minutos. O restante do procedimento foi realizado conforme procedido com a cultura celular em monocamada.

3.2.4.2. Teste de TUNEL

O ensaio de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase Nick-End Labeling*) tem como princípio a detecção da degradação do DNA *in situ*, por meio da ligação do "TUNEL" com o terminal 3'-OH decorrente da fragmentação no DNA que ocorre no processo de morte celular por apoptose. A reação que ocorre durante o experimento, consiste na ligação do anticorpo presente no kit com o sítio de ligação presente na célula. A reação é intermediada por outros mediadores conforme representada na figura abaixo (Figura 10) (KABAKOV; GABAI, 2018).

O intermediário chave para a ocorrência da reação é a enzima deoxinucleotidiltransferase (TdT) que facilita a ligação dos deoxinucleotídeos (dUTPs) do kit às hidroxilas livres provenientes de quebras de DNA.



Figura 10- Esquema de detecção de quebras no DNA identificadas pelo teste de TUNEL

Fonte: Adaptado de Majtnerová e Rousar (2018) Representação esquemática dos intermediários envolvidos na identificação da fragmentação do DNA até a emissão de fluorescência

Para a identificação da fragmentação do DNA, os tecidos foram submetidos a uma exposição aos corantes por 4 horas em concentrações de 500 a 10.000 µg/mL para ambos corantes. As concentrações foram escolhidas com base na recomendação do Comitê Científico Europeu que considera 10.000 µg/mL de corante nas formulações de tinturas semipermanentes, como limite máximo permitido (SCCS/1436/11; SCCS/1537/14). Depois da exposição, os modelos foram lavados 25 vezes com PBS, removidos do *transwell*, fixados com formaldeído e incluídos em parafina. Os tecidos foram cortados na espessura de 8 micras e colocados em lâminas previamente silanizadas. O teste foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante e o kit utilizado foi o *DeadEndTM Fluorometric TUNEL System*- Promega. No prépreparo das amostras, as lâminas foram submetidas a 70°C por 30 minutos para promover o derretimento da parafina. Após o resfriamento, as lâminas foram lavadas com xilol por 30 minutos e lavagens seriadas com etanol 100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 50% e água destilada para promover a hidratação. Adicionalmente as amostras foram lavadas com solução 0,85% NaCl e depois PBS.

Após o pré-preparo, as amostras foram permeabilizadas com 100 µL de proteinase K 20 µg/mL por 5 minutos. O controle positivo foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, utilizando 5 unidades de DNAse (M6101-Promega). Após a permeabilização e confecção do controle positivo, todas as lâminas foram lavadas com PBS. Adicionou-se 100 µL da solução de equilíbrio, mantida por 15 minutos, seguido da adição de 50 µL da solução de tratamento igualmente preparada de acordo com as informações do fabricante. As lâminas permaneceram por uma hora em temperatura ambiente e no escuro para promover a reação e a ligação do anticorpo com os sítios de interesse. As lâminas foram mantidas em solução de SSC 2x por 15 minutos, lavadas com PBS por 2 vezes e, posteriormente, lavadas com solução de BSA 0,5% para eliminar qualquer *background* ou fluoresceína residual.

As lâminas foram montadas com *ProLong[™] Gold Antifade mountant* com DAPI (P36941-Life Technologies). As lamínulas foram adicionadas e seladas com esmalte. Todas as lâminas foram armazenadas a 4°C *overnight* para a secagem e em seguida foram submetidas à leitura em Microscópio Confocal de fluorescência a laser (Leica, TCS SP8), objetiva de 40x e 460nm (DAPI) e 520 ±20 nm (Fluoresceína) no laboratório de Microscopia Avançada da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Para a determinação do *endpoint*, foram utilizados 3 modelos para cada concentração provenientes de lotes diferentes.

3.2.4.3.Ensaio de irritação (TG OECD 439)

Antes de realizar a avaliação do potencial dos corantes de induzir à irritação, o modelo desenvolvido neste trabalho foi submetido ao teste de proficiência recomendado pelo protocolo 439 da OECD, para avaliar a capacidade do modelo em diferenciar substâncias irritantes de não-irritantes. Para tanto, foram selecionadas 11 substâncias sugeridas pela OECD (2015e). São elas: Isopropanol (CAS: 67-63-0, Merck), estearato de metila (CAS- 112-61-8, Sigma), heptil butirato (CAS: 5870-93-9), hexil salicilato (CAS- 6259-76-3), propionaldeído (CAS: 103-95-7, Sigma), 1- bromohexano (CAS: 111-25-1), hydróxido de potássio (CAS: 1310-58-3), 1- metil-3-fenil-1-piperazina (CAS: 5271-27-2, Sigma-Aldrich), heptanal (CAS: 111-71-7, Sigma), cinamaldeído (CAS: 104-55-2, Sigma), tetracloretileno (CAS: 1 27-18-4, Sigma).

Após a validação, os corantes BR51 e BB99 foram testados seguindo o mesmo protocolo descrito abaixo. Como controle negativo foi utilizado o PBS e como controle positivo o Dodecil sulfato de sódio (SDS, Sigma) a 5%. Os corantes foram testados nas concentrações de 1.000, 5.000 e 10.000 μ g/mL, que foram escolhidas com base nas recomendações do Comitê Científico Europeu, que considera o valor de 10.000 μ g/mL como limite máximo dos corantes

permitidos em formulações (SCCS/1436/11; SCCS/1537/14). Para cada concentração/controle foram utilizados 3 modelos provenientes de lotes independentes.

Além dos controles negativo e positivo convencionais, foram confeccionados controles adicionais utilizando tecidos não viáveis, para avaliação da capacidade dos corantes e controles em reagir com o MTT e gerando sinal de forma inespecífica. Para essa avaliação foram utilizados ambos os corantes, PBS e SDS adicionados em tecido não viável e esses controles passaram pelas mesmas etapas que o teste convencional.

Como já citado, diversos modelos de epiderme humana estão disponíveis comercialmente e já foram validados seguindo as recomendações do protocolo 439 da OECD (OECD, 2019a). A Tabela 1 mostra as variações metodológicas de cada modelo.

lavagem, período de pós-incubação, ensaio do MTT e critério de aceitabilidade							
Procedimento	Episkin TM (SM) ¹	Epiderm TM (EPI 200) ^{1,2}	SkinEthic TM 1,3	Keraskin VM ⁴	USP RHE ⁵	HaCaT-EHE	
Aplicação das substâncias OECD 439							
Controle Positivo	SDS 5%	SDS 5%	SDS 5%	SDS 20%	SDS 5%	SDS 5%	
Para sólidos	26 mg/cm ²	39 mg/cm ²	32 mg/cm ²	46.8 mg/cm ²	$29 \ \mu g/cm^2$	70 mg/cm ²	
Para líquidos	$26 \ \mu L/cm^2$	$26 \mu L/cm^2$	$32 \mu L/cm^2$	47 µL/cm ²	$29 \ \mu L/cm^2$	$70 \ \mu L/cm^2$	
Nylon mesh	não usado	se necessário	Aplicado	em líquidos	Não usado	Não usado	
Tempo total de aplicação	15 minutos	60 minutos	42 minutos	45 minutos	15 minutos	15 minutos	
Temperatura de aplicação	ТА	TA	ТА	37 °C	TA	ТА	
Lavagem							
Lavagem	25 mL 1x PBS	20 vezes 1x PBS	20 vezes 1x PBS	DPBS	25 mL 1x PBS	25 vezes 1x PBS	
Pós incubação e teste do MTT							
Tempo de incubação	42 horas	42 horas	42 horas	42 horas	42 horas	42 horas	
Concentração MTT	0.3 mg/mL	1 mg/mL	1 mg/mL	0.3 mg/mL	1 mg/mL	0.5 g/mL	
Tempo de aplicação	180 minutos	180 minutos	180 minutos	180 minutos	180 minutos	180 minutos	
Solvent de extração	Ácido isopropanol	Isopropanol	Isopropanol	Isopropanol	Isopropanol	Isopropanol	
Volume	500 μL	2 mL	750 μL 2x	2 mL	2 mL	1 mL	

Tabela 1- Parâmetros usados em diferentes modelos de Epiderme Humana Equivalente (EHE) em comparação com o modelo desenvolvido neste trabalho empregando queratinócitos imortalizados (HaCaT-EHE). Foram avaliados os seguintes critérios: aplicação química, lavagem, período de pós-incubação, ensaio do MTT e critério de aceitabilidade

Tempo de extração	4 horas TA	2 horas TA	2 horas TA	3 horas	2 horas	1 hora TA	
Critérios de aceitabilidade							
Desvio Padrão	DP≤18	$DP \leq 18$	$DP \le 18$	$DP \le 18$	$DP \le 18$	$DP \leq 18.5$	

Fonte: Autoria Própria.

^{1.} Dados obtidos da OECD (2019a); ^{2.} Dados obtidos da Mattek Corporation (2019); ^{3.} Dados obtidos da EURL-ECVAM (2017); ^{4.} Dados obtidos da Jung et al. (2014); ^{5.} Dados obtidos da Pedrosa et al. (2017). TA- Temperatura Ambiente; DP- Desvio Padrão; SDS- Duodecil Sulfato de Sódio.

O ensaio de irritação foi baseado no protocolo da OECD 439 (2019a). Como mostra a Tabela 1, os tecidos foram expostos a 70 μ L/cm² de cada solução (substâncias selecionadas para avaliação da predição, corantes e controles) ou 70 μ g/cm² no caso das substâncias no estado sólido. A exposição ocorreu nos tempos de 15 (substâncias, controles e corantes), 30 e 45 (corantes e controles) minutos em temperatura ambiente. Após o tempo de exposição, os modelos foram cuidadosamente lavados por 25 vezes com PBS estéril, o meio de cultura foi trocado e os modelos foram reincubados por 42 horas. Após o período de incubação foi adicionado 1mL de solução de MTT a 0,5mg/mL e os modelos foram novamente submetidos a incubação por 3h a 37°C protegidos da luz (Figura 11). Após esse período, a solução foi cuidadosamente retirada e, para a extração do sal de formazan foi adicionado 1 ml de isopropanol e os modelos foram mantidos sob agitação a 120 rpm por 1 hora em temperatura ambiente. O conteúdo foi retirado do *transwell* e transferido para um cubo cônico de vidro (Figura 12) para a secagem do isopropanol. O material foi ressuspendido em 400 μ L de fase móvel, e dessa suspensão foram injetados 100 μ L em CLAE, nas condições cromatográficas citadas anteriormente.

O cálculo da viabilidade (%) foi realizado pela seguinte fórmula:

Viabilidade (%) = [área AMOSTRA / área CONTROLE NEGATIVO] x100

Alépée et al. (2015) aponta a necessidade da confecção de controles adicionais utilizando tecidos inviáveis, para avaliação de clivagem inespecífica do sal tetrazólio. A clivagem inespecífica pode acontecer devido a reação do sal tetrazólio com a própria amostra ou com a matriz. Para a confecção dos controles adicionais, foram utilizados modelos de epiderme inviabilizados. Para tanto, os tecidos prontos foram incubados com água destilada e mantidos em incubadora a 37°C, 5% CO₂ e atmosfera úmida por 24h. Para avaliação da

clivagem inespecífica dos corantes foi utilizado um modelo inviável para cada, e neste foi adicionado 70 μ L/cm² da solução de 10.000 μ g/mL do corante em cada modelo, já a avaliação da clivagem inespecífica da matriz, foi utilizado um modelo inviável sem adição de nenhuma solução ambos testes seguidos da adição de 1mL da solução 0,5 mg/mL do reagente de MTT. Os controles adicionais foram incubados juntamente com o experimento e os procedimentos de incubação, extração e análise foram realizados da mesma forma que citados anteriormente.

A leitura de sinal gerado de forma inespecífica detectada nos controles confeccionados com tecido não viável foi considerada com branco e os valores foram descontados das amostras testadas quando estes eram significativos.



Figura 11- Modelo de epiderme equivalente após a incubação com o reagente de MTT



Fonte: Autoria Própria

A) Modelo de epiderme equivalente após a clivagem do sal tetrazólio, porém ainda com a solução do MTT. B) Modelo de epiderme equivalente após a retirada da solução contendo o reagente de MTT Figura 12 - Sal de Formazan diluído em isopropanol logo após o processo de extração do modelo de epiderme



Fonte: Autoria Própria Tubos contendo o sal de formazan diluídos ao isopropanol após a etapa de extração do mesmo.

3.2.4.4.Ensaio de corrosão (TG OECD 431)

De forma similar ao que foi realizado para o ensaio de irritação, o modelo foi previamente avaliado para a verificação da capacidade de diferenciação entre respostas corrosivas e não-corrosivas induzidas por substâncias químicas. Para o teste de proficiência, foram selecionadas 4 substâncias sugeridas pela OECD (2015d). São elas: brometo de fenetila (CAS: 10363-9, Sigma); palmitato de metila (CAS: 112-39-0, Sigma), ácido lático (CAS: 50-21-5, Sigma), ácido octanóico (CAS: 124-07-2).

A avaliação do potencial de corrosão dos corantes foi realizada empregando concentrações variando entre 1.000 a 10.000 µg/mL, escolhidas com base nas recomendações do Comitê Científico Europeu que considera como limite máximo dos corantes em formulações o valor de 10.000 µg/mL. Para cada concentração/controle, foram utilizados 3 modelos provenientes de lotes independentes.

Como citado no ensaio de irritação, diversos modelos de epiderme humana disponíveis no mercado já foram validados seguindo as recomendações do protocolo 431 da OECD (OECD, 2019b). A Tabela 2 mostra as variações metodológicas de cada modelo. **Tabela 2**- Parâmetros usados em diferentes modelos de Epiderme Humana Equivalente (EHE) em comparação com o modelo desenvolvido neste trabalho empregando queratinócitos (HaCaT-EHE) para a avaliação de corrosão. Foram avaliados os seguintes critérios: critérios de aplicação química, lavagem, período de pós-incubação, ensaio do MTT e critério de aceitabilidade

Procedimento	Episkin TM (SM) ¹	Epiderm TM (EPI 200) ^{1,2}	SkinEthic ^{TM 1,3}	USP RHE ⁴	HaCaT- EHE		
	A	plicação das substâ	ncias OECD 431				
Controle Positivo	Ácido acético	8N KOH	8N KOH	Ácido acético	Ácido acético		
Para sólidos	52.6 mg/cm ²	39.7 mg/cm ²	40 mg/cm ²	-	30 mg/cm ²		
Para líquidos	131.6 µL/cm ²	79.4 μ L/cm ²	80 µl/cm ²	50 µL	$70 \ \mu L/cm^2$		
Nylon mesh	usado	Não usado	usado	Não usado	Não usado		
Tempo total de aplicação	3, 60 e 240 minutos	3 e 60 minutos	3 e 60 minutos	3 e 60 minutos	3 e 60 minutos		
Temperatura de aplicação	ТА	TA e 37 °C	TA e 37 °C	TA e 37 °C	ТА		
Lavagem							
Lavagem	25 mL 1x PBS	20 vezes 1x PBS	20 vezes 1x PBS	25 mL 1x PBS	25 vezes 1x PBS		
Ensaio do MTT							
Concentração MTT	0.3 mg/mL	1 mg/mL	1 mg/mL	1 mg/mL	0.5 g/mL		
Tempo de aplicação	180 minutos	180 minutos	180 minutos	180 minutos	180 minutos		
Solvent de extração	Ácido isopropanol	Isopropanol	Isopropanol	Isopropanol	Isopropanol		
Volume	500 μL	2 mL	750 μL 2x	-	1 mL		
Tempo de extração	4 horas RT	2 horas RT	2 horas RT	2 horas	1 horas RT		
Critério de aceitabilidade							
Desvio Padrão	DP≤ 30%	DP ≤ 30%	$DP \le 30\%$	$DP \leq 30\%$	$DP \leq 30\%$		

¹·Dados obtidos de OECD (2019b); ²· Dados obtidos da Mattek Corporation (2019); ³· Dados obtidos de Episkin (2020b); ⁴· Dados obtidos de CATARINO et al. (2018). TA- Temperatura Ambiente; DP- Desvio Padrão; SDS-Sodium Dodecyl Sulfate

O ensaio de corrosão foi baseado no protocolo da OECD 431 (2019b). Como controle negativo foi utilizado PBS e o ácido acético (Sinth) como controle positivo. Os tecidos foram submetidos a 70 µL de cada solução (agentes químicos selecionados para o teste de proficiência, corantes e controles) por 3, 60 minutos (corantes, controles e substâncias) e 240 (corantes e controles) minutos em temperatura ambiente. Passado o tempo, os modelos foram cuidadosamente lavados por 25 vezes com PBS. Foi adicionado 1mL de solução de MTT a 0,5mg/mL e os modelos foram incubados por 3h a 37°C protegidos da luz. Após esse período, a solução foi cuidadosamente retirada, e para promover a extração do sal de formazan, foi adicionado 1 ml de isopropanol e os modelos foram mantidos sob agitação a 120 rpm por 1 hora em temperatura ambiente. O conteúdo foi retirado do *transwell* e transferido para um cubo

cônico de vidro para a secagem do isopropanol. O material foi ressuspendido em 400µL de fase móvel, e dessa suspensão foram injetados 100 µL em CLAE, nas condições cromatográficas citadas anteriormente.

O cálculo da viabilidade (%) foi dado pela seguinte fórmula:

Na ocorrência de sinal do sal de formazan gerado de forma inespecífica, o valor foi também subtraído do valor final, como citado para o teste de irritação.

3.2.4.5. Avaliação da Função de Barreira

A avaliação da função de barreira foi realizada de acordo com os protocolos de irritação e corrosão, OECD 439 e 431, respectivamente (OECD, 2019a,b). O IC₅₀ dos modelos foi calculado após a exposição dos modelos a variadas concentrações de SDS (0,625; 1,25; 2,5; 5 μ g/mL) e controle negativo (PBS) por 18 horas conforme citado por Pedrosa et al. (2017).

Como observado, o teste foi realizado no modelo 2D e também no 3D, porém com modificações entre si. Vale ressaltar que o teste realizado no modelo 2D foi realizado de forma preliminar para realização de um *screening* da citotoxicidade, e por esse motivo não era necessário a realização de uma leitura utilizando método sensível. Diferente do 3D que o teste do MTT foi utilizado para verificação de um *endpoint* específico, além disso o fato dos corantes utilizados afetarem as respostas devido a impregnação do corante no tecido necessitava de um método mais seletivo.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Padronização do modelo de epiderme equivalente

Para a padronização do protocolo de cultivo do modelo 3D, alguns parâmetros foram testados como o período de cultivo e o período em que os modelos ficaram imersos no meio de cultura, com o objetivo de verificar quais condições proporcionariam o melhor crescimento do modelo, bem como a diferenciação celular. Assim, inicialmente foram testados os tempos de cultivo de 12, 14 e 16 dias e imersão no meio de cultura por 24 e 48 horas, visando obter uma boa espessura do modelo. A Figura 13 ilustra os tecidos obtidos após a combinação destas diferentes condições de cultivo. A condição que forneceu a melhor espessura de modelo com boa diferenciação celular foi o cultivo por 16 dias, com a manutenção dos tecidos submersos por 48 h (Figura 13 F).

Figura 13 - Modelos de Epiderme Humana Equivalente utilizando queratinócitos (HaCaT-EHE) obtidos com diferentes condições de cultivo.



Fonte: Autoria Própria

A) Cultivo por 12 dias em interface ar-líquido, submersão por 24 horas no meio de cultura; B) Cultivo por 12 dias em interface ar-líquido, submersão por 48 horas no meio de cultura; C) Cultivo por 14 dias em interface ar-líquido, submersão por 48 horas no meio de cultura; D) Cultivo por 14 dias em interface ar-líquido, submersão por 48 horas no meio de cultura; E) Cultivo por 16 dias em interface ar-líquido, submersão por 24 horas no meio de cultura; F) Cultivo por 16 dias em interface ar-líquido, submersão por 48 horas no meio de cultura; F) Cultivo por 16 dias em interface ar-líquido, submersão por 48 horas no meio de cultura; F) Cultivo por 16 dias em interface ar-líquido, submersão por 48 horas no meio de cultura; F) Cultivo por 16 dias em interface ar-líquido, submersão por 48 horas no meio de cultura; F) Cultivo por 16 dias em interface ar-líquido, submersão por 48 horas no meio de cultura; F) Cultivo por 16 dias em interface ar-líquido, submersão por 48 horas no meio de cultura; F) Cultivo por 16 dias em interface ar-líquido, submersão por 48 horas no meio de cultura; F) Cultivo por 16 dias em interface ar-líquido, submersão por 48 horas no meio de cultura, sendo que este tecido demonstrou melhor diferenciação das camadas e estrato córneo mais aparente.

Outra importante condição testada foi o tempo de fixação dos modelos em formaldeído, sendo para tanto testados os tempos de 8 e 24 horas (Figura 14).

Figura 14 - Padronização do tempo de fixação dos modelos de Epiderme Humana Equivalente utilizando queratinócitos (HaCaT-EHE)



Fonte: Autoria Própria

A) placa *deep well* de volume menor; fixação de 8 horas B) placa *deep well* de volume menor; fixação de 24 horas;C) placa *deep well* de volume maior; fixação de 8 horas; D) placa *deep well* de volume maior; fixação de 24 horas.

Adicionalmente, foi também testado se o volume de meio de cultura interferia no desenvolvimento da epiderme. Para este estudo foram utilizados dois tipos de placas, primeiramente a própria placa de 12 poços do *transwell* com capacidade de até 0,5 mL/poço e a placa *deep well* (BD) que permite aproximadamente 9 mL de meio por poço. Observando a Figura 14, podemos concluir que o menor volume de meio prejudicou o desenvolvimento do modelo, devido a presença da camada da epiderme levemente mais fina (Figura 14 A e B). O tempo de fixação em solução de formaldeído por 24 horas (Figura 14 B e D) foi escolhido devido a maior integridade tecidual do corte na lâmina em relação à fixação por 8 horas. Com o tempo menor de fixação, observamos nas fotomicrografias da Figura 14A e 14C, a presença de espaços vazios entre o núcleo e citoplasma, demonstrando uma fixação ineficiente. Já na Figura 14 B e 14 D, pode-se observar que as células estão mais coesas entre si, indicando uma fixação mais eficiente.

4.1.1. Avaliação da expressão de marcadores de diferenciação celular

A presença dos marcadores pesquisados no ensaio de imunohistoquímica é revelada pela coloração marrom, que indica a ligação do anticorpo no sítio de interesse. Em nosso modelo,

observamos a expressão de CK14 nas camadas basais do epitélio (Figura 15 A), indicando o início da estratificação do epitélio e a presença dos filamentos no interior de desmossomos. Já a transição celular dos queratinócitos das camadas basais proliferativas para as camadas suprabasais, é indicada pela expressão da CK10 (Figura 15 B). Esta Figura mostra também a camada espinhosa da epiderme composta por essas células em estágio de diferenciação, indicando a morfologia característica, levemente afilada (MOLL; DIVO; LANGBEIN, 2008).

A filagrina (Figura 15 C) foi detectada nas regiões da camada granular e córnea e a involucrina (Figura 15 D) nas camadas espinhosa e granular. Ambas proteínas começam a ser produzidas quando as células iniciam a migração para a camada espinhosa (BANKS-SCHLEGEL; GREEN, 1981; YOUSEF; ALHAJJ; SHARMA, 2020).

Figura 15 – Ilustração dos ensaios de imunohistoquímica para detecção dos marcadores de diferenciação celular



Fonte: Autoria Própria

A) Marcação com CK14; B) Marcação com CK10; C) Marcação com filagrina; D) Marcação com involucrina.

4.1.2. Validação da determinação do Sal de Formazan utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Inicialmente, foi avaliado o potencial de *Carry Over* para a verificação de possíveis resíduos do sal, decorrentes de uma injeção anterior em uma concentração elevada. O tempo de

retenção do sal de formazan é de 9,217 minutos (Figura 16A) e, após a injeção apenas da fase móvel na matriz, não foi detectado sinal do sal de formazan (Figura 16B).

Figura 16- Cromatograma obtido após a injeção de 200 μ g/mL do sal de formazan nas condições cromatográficas.



Fonte: Autoria própria

A) Pico observado após injeção de uma concentração elevada do sal de formazan. B) Ausência de pico na faixa de detecção do sal de formazan.

O teste de seletividade foi realizado por meio da extração com isopropanol de seis modelos de epiderme (3 viáveis e 3 inviáveis), porém sem a adição do MTT, ou seja, não era esperada a formação do sal de formazan. Nestas condições, não foi observada coeluição de outros compostos no mesmo tempo de retenção do sal de formazan (Figura 17).





Fonte: Autoria própria

Quanto a sensibilidade os valores obtidos da curva de calibração demonstraram variação pequena, indicando que o ensaio é sensível nas concentrações utilizadas conforme observado na figura 18.



Figura 18- Gráfico referente a curva de calibração e equação da reta

Fonte: Autoria própria

Concentração			
conhecida	área	valor obtido	(%) variação
200	19895902	199,9027806	0,999513903
100	9958264	99,93056617	0,999305662
50	5005519	50,10616273	1,002123255
20	2125048	21,12874733	1,056437367
2	179651	1,558136494	0,779068247
1	86998	0,626051266	0,626051266
0,5	49452	0,248340107	0,496680214

Tabela 3- Avaliação da sensibilidade empregando a curva de calibração e equação da reta obtida

Outros parâmetros de validação do método analítico como acurácia, robustez e precisão foram calculados com base nos dados apresentados na Tabela 4.

Tabela 4- Determinação dos coeficientes de variação obtidos nos ensaios de Exatidão/Robustez e Precisão intradia e interdia

Concentração de	Exatidão l	E PR(%)	Precisão CV (%)		
Formazan µg/mL	Intradia	Interdia	Intradia	Interdia	
0,5	-	-	9,9	3,8	
1	-	-	1,2	6,1	
2	-0,4	-10,1	1,2	6,8	
20	7,8	3,3	6,5	4,2	
50	-	-	0,2	2,8	
100	-8,3	3,2	3	1,8	
200	-	-	0,1	1,7	

Fonte: Autoria Própria

EPR- Erro Padrão Relativo, CV- Coeficiente de Variação.

Todos os coeficientes de variação e erro padrão se mostraram abaixo de 15%, como recomendado pelo guia de validação demonstrando precisão, exatidão e robustez do método cromatográfico (FDA, 2018b).
Para a avaliação da linearidade do método, foram utilizados os pontos apresentados na Tabela 1 e foi obtido um coeficiente de determinação r² de 0,99, confirmado que o método responde de forma linear nas concentrações de trabalho.

De acordo com os protocolos seguidos, é necessária a realização do teste de efeito matriz para avaliação da capacidade de recuperação do padrão durante a extração, secagem e injeção (ALÉPÉE et al., 2015; FDA, 2018b). A recuperação adequada varia de 85 a 115% sendo que o coeficiente de variação não deve ultrapassar 15%. Os mesmos autores recomendam a avaliação do coeficiente de variação apenas na concentração menor (2 μ g/mL) e na maior (100 μ g/mL), por esse motivo foi utilizado apenas um modelo para a verificação da recuperação da concentração intermediária e com isso não há valor para o coeficiente de variação.

A Tabela 4 mostra os resultados obtidos neste teste, mostrando recuperação acima de 85% nos 2 pontos da curva avaliados e com coeficiente de variação máximo de 6,1%. Demonstrando assim que não há interferência da matriz na determinação do sal de formazan.

Concentração padrão	Porcentagem de recuperação	Coeficiente de variação
2 µg/mL	85%	2,9%
20 µg/mL	98%	-
100 µg/mL	92%	6,1%

 Tabela 5- Apresentação dos dados sobre o efeito matriz

Fonte: Autoria própria

Por fim, Alépée et al., (2015) sugerem a confecção de controles com tecidos não viáveis para avaliação de possível clivagem do sal tetrazólio de forma inespecífica. A figura 18 representa um cromatograma com clivagem inespecífica do sal de formazan, ou seja, a clivagem de um tecido inviável.



Figura 19- Cromatograma obtido com a extração de um tecido inviável após incubação com o reagente de MTT

Fonte: Autoria própria

Observação do pico referente ao sal tetrazólio formado em tecido inviável, indicando que o sal é clivado de forma inespecífica.

O fato do sal de formazan ter sido produzido mesmo em condições de inviabilidade celular, torna necessária a subtração desse valor encontrado dos demais testes, além disso o BR51 também gerou uma clivagem inespecífica (dados não mostrados), com isso em todos os experimentos envolvendo o corante citado, foi realizado o controle e subtração da leitura residual, entretanto segundo os critérios de aceitabilidade, descontando esses valores residuais a viabilidade ainda foi superior a 50%, demonstrando que o corante pode ser usado neste ensaio(ALÉPÉE et al., 2015).

4.2. Avaliação da proficiência do modelo utilizando o protocolo 439 da OECD

A avaliação da proficiência seguindo as recomendações do protocolo 439 da OECD (OECD, 2015e; OECD, 2019a), demonstrou que o modelo possui boa predição para a detecção de efeitos irritantes. A Figura 20 mostra os resultados de viabilidade celular após a exposição do nosso modelo às substâncias selecionadas, de acordo com o protocolo 439 da OECD (OECD, 2015e). Cabe aqui lembrar que são consideradas sustâncias irritantes aquelas que induzirem a redução na viabilidade em 50% ou mais. Das 11 substâncias testadas, 7 são classificadas como irritantes pelo *Globally Harmonized System* (GHS) e 4 são classificadas como não irritantes. A

Tabela 5 mostra a comparação das respostas obtidas após a exposição do nosso modelo às substâncias e a classificação de acordo com o GHS. É possível verificar que apenas o isopropanol não forneceu a mesma resposta, ou seja, o GHS o classifica como não irritante e a resposta do nosso modelo foi de irritação, com viabilidade de 12,29%±10,6. Desta forma, das 7 substâncias classificadas como irritantes pelo GHS, todas induziram ao mesmo efeito no nosso modelo, sendo assim, foi obtido uma sensibilidade de 100%, de acordo com o Jung et al. (2014) e OECD (2019a). Em relação às não irritantes, das 4 testadas, apenas uma não forneceu a mesma resposta, ou seja, obtivemos uma especificidade de 75% (JUNG et al., 2014; OECD, 2019a). De forma geral, das 11 substâncias testadas, 10 responderam de forma esperada, quando comparadas ao GHS (Figura 19), portanto, nosso modelo apresentou uma exatidão de 90%, de acordo com Jung et al. (2014) e OECD (2019a).

Figura 20- Viabilidade do modelo de Epiderme Humana Equivalente (EHE) desenvolvido neste trabalho empregando queratinócitos (HaCaT-EHE) após a exposição de diversas substâncias, conforme recomendação do protocolo 439 da OECD (OECD, 2015e).



Fonte: Autoria Própria.

Observação da viabilidade do HaCaT-EHE após 15 minutos de exposição seguida de reincubação por 42 horas, submissão da solução MTT por 3 horas, extração com isopropanol e concentração de sal de formazan identificadas por CLAE. Os dados são expressos em média e desvio padrão de três experiências independentes. * indica que a diferença significativa é comparada ao controle negativo (ANOVA de uma via - Dunnet - * p <0,05). Controle negativo: PBS, controle positivo: SDS (Dodecil sulfato de sódio) 5%.

Nome	Número CAS	*Classificação GHS	Aspecto Físico	Viabilidade (%) (média ± DP)	HaCaT- EHE
Isopropanol	67-63-0	NI	Líquido	12.29±10.62	Ι
Heptil butirato	5870-93-9	NI	Líquido	72.47±13.27	NI
Hexil salicilato	6259-76-3	NI	Líquido	74.19±18.3	NI
Estearato de metila	112-61-8	NI	Sólido	66.99±3.66	NI
Propionaldeído	103-95-7	Ι	Líquido	14.96±10.35	Ι
1- Bromohexano	111-25-1	Ι	Líquido	11.5±12.37	Ι
Hidróxido de potássio 5%	1310-58-3	Ι	Líquido	2.09±2.27	Ι
1-metil-3-fenil-1- piperazina	5271-27-2	Ι	Sólido	6.33±7.54	Ι
Heptanal	111-71-7	Ι	Líquido	9.91±9.5	Ι
Cinamaldeído	104-55-2	Ι	Líquido	10.99±13.92	Ι
Tetracloetileno	127-18-4	Ι	Líquido	7.42 ± 7.78	Ι

Tabela 6- Avaliação do efeito irritante induzido na EHE (Epiderme Humana Equivalente) desenvolvido neste trabalho empregando queratinócitos (HaCaT-EHE), em comparação à classificação do *Globally Harmonized System* (GHS).

Fonte: Autoria Própria.

* Dados obtidos da OECD (2015) e US (2018). NI=não irritante; I= irritante

4.3. Avaliação da proficiência do modelo utilizando o protocolo 431 da OECD

A avaliação da capacidade do modelo HaCaT-EHE em detectar corretamente o efeito de corrosão foi baseada nas recomendações do protocolo 431 da OECD (OECD, 2015d; OECD, 2019b). Para o ensaio de proficiência, foram selecionadas 4 substâncias (2 corrosivas e duas não corrosivas), às quais os modelos HaCaT-EHE foram expostos. A Figura 20 mostra os efeitos dessas substâncias sobre a viabilidade celular, lembrando que são consideradas corrosivas as substâncias que induzem à redução de viabilidade em 35% ou mais nas condições do teste.

A Tabela 6 mostra os resultados obtidos com o modelo aqui desenvolvido HaCaT-EHE, em comparação com as respostas esperadas de efeito corrosivo de acordo com o GHS. É possível notar que os efeitos das 4 substâncias, tanto corrosivas quanto não corrosivas, foram reproduzidos no nosso modelo. Desta forma, obtivemos sensibilidade, especificidade e exatidão de 100% de acordo com Jung et al. (2014) e OECD (2015d). **Figura 21-** Viabilidade do modelo EHE (Epiderme Humana Equivalente) desenvolvido neste trabalho empregando queratinócitos (HaCaT-EHE) após a exposição de diversas substâncias, conforme a recomendação do protocolo 431 da OECD (OECD, 2015d; OECD, 2019b).



Fonte: Autoria Própria.

Observação da viabilidade do HaCaT-EHE após 3 e 60 minutos de exposição, seguida pela exposição da solução MTT por 3 horas, extração com isopropanol e concentração de sal de formazan, identifica-se em CLAE. A) Representa a exposição de 3 minutos; B) Representa a exposição de 60 minutos. Os dados são expressos em média e desvio padrão de três experiências independentes. * indica que a diferença significativa é comparada ao controle negativo (ANOVA de uma via - Dunnet - * p <0,05). Controle negativo: PBS, controle positivo: ácido acético.

Tabela 7- Avaliação do efeito corrosivo induzido no EHE (Epiderme Humana Equivalente) desenvolvido neste trabalho empregando queratinócitos (HaCaT-EHE), em comparação à classificação do *Globally Harmonized System* (GHS).

Nome	Número CAS	Classificação GHS	Aspecto Físico	Viabilidade (média ± DP) 3 minutes	Viabilidade (%) (média ± DP) 60 minutes	HaCaT- EHE
Brometo de fenetila	103-63-9	NC	Líquido	91.53±11.21	74.33±16.41	NC
Palmitato de metila	112-39-0	NC	Sólido	88.43±2.27	75.8 ± 8.15	NC
Ácido lático Ácido Octanóico	50-21-5 124-07-2	C C	Líquido Líquido	1.93±1.29 17.07±5	3.22±4.26 6.94±6.0	C C

Fonte: Autoria Própria

*Dados obtidos da OECD (2015); US (2018). NC= não corrosivo; C= corrosivo

4.4. Função de barreira

A avaliação da função de barreira foi realizada de acordo com o protocolo da OECD (2019 a,b) e verificada em conjunto com as análises histológica já apresentadas anteriormente neste documento. Os parâmetros expressam a capacidade de diferenciação celular do modelo

HaCaT-EHE, formando as camadas essenciais da epiderme (camada basal, camada espinhosa e camada córnea), além da capacidade de permeabilidade quando expostas a substâncias. Em nosso estudo foi realizada a avaliação do IC_{50} após tempo de exposição fixo (18 horas) em concentrações variadas de SDS de acordo com Pedrosa et al. (2017). A Figura 21 mostra o efeito dose dependente na redução da viabilidade celular com o aumento da concentração do SDS, revelando a permeabilidade da barreira conforme o aumento da concentração.

Figura 22- Avaliação viabilidade celular após a exposição do modelo de epiderme humana equivalente desenvolvido com queratinócitos (HaCaT-EHE) após exposição a Dodecil sulfato de sódio (SDS) visando estimar a permeabilidade da barreira.



Fonte: Autoria Própria.

Observação da viabilidade do EHE após 18 horas de exposição, seguiu-se o uso de diferentes concentrações de SDS seguida da exposição da solução MTT por 3 horas, extração usando o isopropanol e a concentração de sal de formazan, identificadas em CLAE. Os dados são expressos em média e desvio padrão de três experimentos independentes. * indica que a diferença significativa é comparada ao controle negativo (ANOVA de uma via - Dunnet - * p <0,05). SDS = Dodecil sulfato de sódio

Com os dados obtidos neste ensaio, foi possível calcular o IC_{50} médio de 1,7 mg/mL de SDS após 18 horas de exposição. A Tabela 7 mostra que o valor obtido com o modelo desenvolvido neste trabalho (HaCaT-EHE) é bastante semelhante aos valores obtidos em outros modelos já validados.

 Modelo	IC50
 Episkin ¹	1,0 – 3,0 mg/mL
LabCyte EPIMODEL 24 SIT ¹	1,4 – 4,0 mg/mL
USP RHE ²	2,1 – 3,4 mg/mL
HaCaT-EHE	1,1 – 2,9 mg/mL

Tabela 8- Comparação do valor do IC_{50} obtido pela exposição do modelo de epiderme humana equivalente desenvolvido neste trabalho empregando queratinócitos humanos (HaCaT-EHE) à diferentes concentrações de Dodecil sulfato de sódio (SDS) com outros modelos já validados.

Fonte: Autoria Própria.

¹Dados obtidos da OECD (2019a,b); ²Dados obtidos de Pedrosa et al. (2017).

Os resultados da construção do modelo, bem como os parâmetros de otimização e proficiência nos testes de irritação, corrosão e função de barreira foram compilados em um artigo que está em fase de correção e será submetido ao periódico *Toxicology in Vitro*.

4.5. Ensaios realizados com corantes

4.5.1. Corante Basic Blue 99

Inicialmente, utilizamos o ensaio cometa em células HaCaT cultivadas em monocamada, para a verificação das possíveis quebras de DNA induzidas após a exposição das células ao corante. Como pode ser verificado na Figura 23 (A e B), não foi detectado efeito genotóxico após a exposição ao corante BB99 em nenhum dos modelos, nas condições testadas. No entanto, ao analisar as lâminas foi possível visualizar intensa fragmentação do DNA em concentrações mais elevadas (dados não mostrados) sugerindo citotoxicidade. O ensaio de viabilidade com azul de tripano realizado juntamente com a colheita das células também demonstrou queda acentuada na viabilidade celular.

Figura 23- Resultados obtidos no teste do cometa comparando os efeitos genotóxicos dos queratinócitos humanos imortalizados cultivados em monocamadas e no modelo de epiderme humana equivalente produzido neste trabalho com queratinócitos humanos (HaCaT-EHE) após exposição ao corante BB99 por 4 horas.



Fonte: Autoria Própria

Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. * indicam diferença significativa do controle negativo (One-way ANOVA-Dunnet, p < 0.05). A) Controle negativo: PBS, controle positivo: MMS 15 µg/mL. 4 horas de exposição ao Basic Blue 99 em queratinócitos humanos imortalizados. B) Controle negativo: PBS, controle positivo: MMS 30 µg/mL 4 horas de exposição ao Basic Blue 99 em modelo de epiderme equivalente

Como esperado, o corante BB99 induziu a intensa queda na viabilidade celular após a exposição de 24 horas, iniciando os efeitos na menor dose testada (10 μ g/mL), seguida de uma queda abrupta da viabilidade na concentração de 30 μ g/mL (Figura 24). O IC₅₀ encontrado foi o valor de 21,82 μ g/mL.

Figura 24- Ensaio de viabilidade celular (MTT) após 24horas de exposição de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) ao corante Basic Blue 99.



Fonte: Autoria Própria

Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. * indicam diferença significativa em relação ao controle negativo (One-way ANOVA-Dunnet, p < 0.05). Controle negativo: DMEM, controle positivo: CCCP (carbonilcianeto-m-clorofenil-hidrazona) 2.000 µg/mL. 24 horas de exposição ao Basic Blue 99 em queratinócitos humanos imortalizados.

Como no ensaio do Cometa observamos uma intensa perda de células, para o ensaio de viabilidade Anexina V/PI utilizamos o tempo de exposição semelhante ao utilizado no teste de genotoxicidade que foi de 4 horas. A Figura 25 demonstra a distribuição das células marcadas, após análise por citometria de fluxo, considerando 4 h de exposição das células HaCaT.



Figura 25- Ensaio de Viabilidade celular, utilizando Anexina V e Iodeto de Propídeo (PI) após 4 horas de exposição de queratinócitos (HaCaT) ao corante Basic Blue 99.

Fonte: Autoria Própria

A) Observação da migração celular no controle negativo; B) Observação da migração celular em 2,5 μ g/mL; C) Observação da migração celular em 5 μ g/mL; D) Observação da migração celular em 15 μ g/mL; E) Observação da migração celular em 30 μ g/mL; F) Observação da migração celular em 45 μ g/mL. 4 horas de exposição ao Basic Blue 99 em queratinócitos humanos imortalizados.

O corante BB99 induziu a uma migração acentuada das células para o quadrante 1 (Figura 25 C, D, E e F), indicada pela marcação com PI e os efeitos ocorreram de forma concentração-dependente. Observando o quadrante 2, verificamos que nas duas maiores doses (30 e 45 µg/mL), parte das células foram duplamente marcadas (PI+ e AN+) (Figura 25 D, E e F), indicando o rompimento total da membrana celular, possibilitando a marcação de ambos marcadores: fosfatidilserina pela anexina, e núcleo pelo iodeto de propídeo (KABAKOV; GABAI, 2018).

A Figura 26 mostra a representação gráfica do ensaio com anexina V e PI, mostrando o aumento das células marcadas com PI nas menores concentrações, sugerindo indução de

necrose após apenas 4 horas de exposição. O gráfico mostra também que com o aumento da concentração, as células foram marcadas tanto com anexina quanto com PI, confirmando o rompimento total da membrana., indicando toxicidade elevada do corante nas condições testadas.

Figura 26- Ensaio de Viabilidade celular, utilizando Anexina V e Iodeto de Propídeo (PI) após 4 horas de exposição de queratinócitos (HaCaT) ao corante Basic Blue 99.



Fonte: Autoria Própria

Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. * indicam diferença significativa do controle negativo (One-way ANOVA-Dunnet, p < 0.05). Controle negativo: PBS, controle positivo: cisplatina 0,5mg/mL. 4 horas de exposição ao Basic Blue 99 em queratinócitos humanos imortalizados.

Após a observação desses efeitos de morte celular obtidos em monocamada, para o modelo 3D foi utilizado o teste de TUNEL, visando identificar a presença de células apoptóticas após exposição ao BB99 (Figura 27).

Figura 27- Avaliação fragmentação do DNA usando o teste de TUNEL após 4 horas de exposição ao corante BB99 utilizando modelo 3D desenvolvido neste trabalho empregando queratinócitos humanos (HaCaT-EHE).



Fonte: Autoria Própria

Detecção de fragmentação no DNA por meio do teste de TUNEL, após 4 horas de exposição do modelo HaCaT-EHE, utilizando concentrações entre 500 a 10.000 µg/mL do BB99. Tunel: é a marcação do núcleo de células que apresentaram fragmentação no DNA; DAPI: é a marcação de todas as células; MERGE: demonstração de ambas marcações. O ensaio foi realizado em 3 experimentos independentes. O PBS foi utilizado como controle negativo, e a DNAse como controle negativo

Foi observada a marcação com fluoresceína em todas as concentrações testadas (Figura 27), indicando que houve interação celular do dUTP com a terminação 3' das hidroxilas livres da fita de DNA no núcleo. Esta reação é catalisada pela enzima TdT e sugere processo de apoptose tardia devido a fragmentação do DNA (KABAKOV; GABAI, 2018; MAJTNEROVÁ; ROUSAR, 2018). Além dos testes para avaliação de genotoxicidade e citotoxicidade, os modelos HaCaT-EHE foram expostos ao corante para a avaliação da ocorrência de irritação e corrosão.

A Figura 28 mostra os resultados do teste de irritação induzida no modelo HaCaT-EHE após exposição a diferentes concentrações do corante BB99. Pode-se observar que após a exposição por 15 minutos, não foi observada incidência de irritação, mesmo com a observação de uma queda na viabilidade tecidual. Já a exposição por 30 minutos indicou a ocorrência de irritação na concentração de 10.000 μ g/mL o que corrobora com a citotoxicidade observada nos ensaios de citotoxicidade.

Figura 28- Teste de irritação após 15 e 30 minutos de exposição do modelo de epiderme humana equivalente produzido neste trabalho com queratinócitos humanos (HaCaT-EHE) ao corante Basic Blue 99



Fonte: Autoria Própria

Ensaio de irritação realizado de acordo com a TG 439 da OECD. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. * indicam diferença significativa do controle negativo (One-way ANOVA-Dunnet, p < 0.05), controle negativo: PBS. Estão demonstrados a viabilidade após a exposição ao corante BB99 de 15 e 30 minutos. De acordo com a OECD, são consideradas substâncias irritantes aquelas que apresentam viabilidade inferior a 50%.

Foi também realizado o teste de corrosão induzido pelo corante Basic Blue 99 nas células do modelo HaCaT-EHE. A Figura 29 mostra que apenas a concentração de 5000 µg/ml após a exposição por 60 minutos foi capaz de reduzir a viabilidade em menos de 35%, indicando efeito o corrosivo. Interessantemente, as maiores doses induziram a um aparente aumento na viabilidade celular. No entanto, considerando que o teste de MTT, avalia a capacidade metabólica da célula como estimativa de viabilidade, o efeito observado foi um aumento da atividade na célula.

Figura 29- Teste de corrosão após 3, 60 e 240 minutos de exposição do modelo de epiderme humana equivalente produzido neste trabalho com queratinócitos humanos (HaCaT-EHE) ao corante Basic Blue 99.



Fonte: Autoria Própria

Ensaio de corrosão realizado de acordo com a TG 431 da OECD. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. *indicam diferença significativa do controle negativo (One-way ANOVA-Dunnet, p < 0.05), controle negativo: PBS. Viabilidade da epiderme humana equivalente após 3, 60 E 240 minutos de exposição ao Basic Blue 99. Segundo a OECD (2015d) são consideradas substâncias corrosivas as que apresentam viabilidade inferior a 35%, a intensidade do efeito é medida de acordo com o tempo de exposição.

4.5.2. Corante Basic Red 51

Primeiramente, foi realizada a avaliação de genotoxicidade após a exposição dos queratinócitos cultivados tanto em monocamada como em ambiente tridimensional ao corante BR51 (Figura 30).

Figura 30- Ensaio de cometa comparando os efeitos genotóxicos induzidos em queratinócitos humanos imortalizados cultivados em monocamadas e no modelo de epiderme humana equivalente produzido neste trabalho com queratinócitos humanos (HaCaT-EHE) após exposição ao corante BR51 por 4 horas.



Fonte: Autoria Própria

Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. * indicam diferença significativa do controle negativo (One-way ANOVA-Dunnet, p < 0.05). A) Controle negativo: PBS, controle positivo: MMS 15 µg/mL. 4 horas de exposição ao Basic Red 51 em queratinócitos humanos imortalizados. B) Controle negativo: PBS, controle positivo: MMS 30 µg/mL 4 horas de exposição ao Basic Red 51 em epiderme humana equivalente

As células cultivadas de forma tradicional expostas ao corante vermelho, apresentaram efeitos genotóxicos a partir da concentração de 15 μ g/mL e com efeito mais intenso em 30 μ g/mL. As concentrações mais elevadas (40 e 50 μ g/mL) aparentemente induziram a um efeito menos intenso (Figura 30 A), no entanto, durante a avaliação das lâminas, foi possível a observação de uma redução da população celular, o que pode sugerir toxicidade das maiores concentrações. Já no modelo 3D HaCaT-EHE (Figura 30 B), observamos a ocorrência de efeito de menor intensidade.

Além da genotoxicidade, também foi avaliada a citotoxicidade, iniciando pelo ensaio de viabilidade por MTT (Figura 31). Foi observada a queda da viabilidade celular a partir da concentração de 5 μ g/mL, com IC₅₀ calculado em 8,46 μ g/mL.

Figura 31- Ensaio de viabilidade celular (MTT) após 24 horas de exposição de queratinócitos (HaCaT) cultivados em monocamada ao corante Basic Red 51



Fonte: Autoria própria

Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. * indicam diferença significativa do controle negativo (One-way ANOVA-Dunnet, p < 0.05). Controle negativo: DMEM, controle positivo: CCCP 2000 µg/mL 24 horas de exposição ao Basic Red 51 em queratinócitos humanos imortalizados

Assim como o BB99, foi realizado o teste de TUNEL para avaliação da indução a apoptose no modelo 3D. Como pode ser observado na Figura 32, houve marcação com a fluoresceína, o que indica morte celular por apoptose e corrobora tanto com o teste do MTT realizado, como com os dados obtidos por ZANONI et al., (2014).

Figura 32- Avaliação da fragmentação do DNA usando o teste de TUNEL após 4 horas de exposição do modelo de epiderme humana equivalente produzido neste trabalho com queratinócitos humanos (HaCaT-EHE) ao corante Basic Red 51





Fonte: Autoria Própria

Detecção de fragmentação no DNA por meio do teste de TUNEL, após 4 horas de exposição do modelo 3D, utilizando concentrações entre 500 a 10.000 µg/mL do BR51. Tunel: é a marcação do núcleo de células que apresentaram fragmentação no DNA; DAPI: é a marcação de todas as células; MERGE: demonstração de ambas marcações. O ensaio foi realizado em 3 experimentos independentes. O PBS foi utilizado como controle negativo, e a DNAse como controle positivo.

Assim como realizado com o BB99, foi avaliada a capacidade do corante BR51 em induzir corrosão e irritação no modelo HaCaT-EHE. A Figura 33 mostra que não houve redução da viabilidade em 50% nas condições testadas, indicando ausência de efeito irritativo. Este corante também não induziu a efeito de corrosão nas células do modelo HaCaT-EHE (Figura 34).

Figura 33- Teste de irritação após 15, 30 e 45 minutos de exposição do modelo de epiderme humana equivalente produzido neste trabalho com queratinócitos humanos (HaCaT-EHE) ao corante Basic Red 51.



Ensaio de irritação realizado de acordo com a TG 439 da OECD. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. * indicam diferença significativa do controle negativo (One-way ANOVA-Dunnet, p < 0.05), controle negativo: PBS. Viabilidade da epiderme humana equivalente após 15, 30 e 45 minutos de exposição ao Basic Red 51; De acordo com a OECD, são consideradas substâncias irritantes aquelas que apresentam viabilidade inferior a 50%.

Figura 34- Teste de corrosão após 3, 60 e 240 minutos de exposição modelo de epiderme humana equivalente produzido neste trabalho com queratinócitos humanos (HaCaT-EHE) ao corante Basic Red 51



Fonte: Autoria Própria

Ensaio de corrosão realizado de acordo com a TG 431 da OECD. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. * indicam diferença significativa do controle negativo (One-way ANOVA-Dunnet, p < 0.05), controle negativo: PBS A) Viabilidade da epiderme humana equivalente após 3 minutos de exposição ao Basic Red 51; B) Viabilidade da epiderme humana equivalente após 60 minutos de exposição ao Basic Red 51; C) Viabilidade da epiderme humana equivalente após 240 minutos de exposição ao Basic Red 51. Segundo a OECD (2015d) são consideradas substâncias corrosivas as que apresentam viabilidade inferior a 35%, a intensidade do efeito é medida de acordo com o tempo de exposição.

Os resultados da avaliação dos efeitos decorrentes da exposição do modelo tridimensional aos corantes BB99 e BR 51 foram compilados em um artigo submetido ao periódico Chemico-Biological Interaction (Anexo A).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1. Padronização do modelo de epiderme equivalente

O desenvolvimento de modelos *in house* responsivos e compatíveis com modelos internacionalmente validados, já foram descritos em alguns trabalhos (JUNG et al., 2014; PEDROSA et al.,2017; CATARINO et al., 2018). No entanto, os modelos de epiderme utilizados pelos autores citados, foram construídos a partir de células de tecido humano, obtidos principalmente de cirurgias de remoção de prepúcio, há desvantagem em utilizar as células de doadores é a variabilidade genética, que é um dos fatores de dificuldade em se padronizar as respostas (COLOMBO et al., 2017), porém a variabilidade também pode ser um ponto positivo considerando que a resposta poderia ser mais representativa.

Além disso, a Sociedade Brasileira de Urologia não recomenda mais a intervenção cirúrgica para todos os casos de fimose, devido a existência de outros tratamentos mais eficientes e menos invasivos. Adicionalmente, alguns pesquisadores desaprovam a realização do procedimento, pois na maioria dos casos a condição do paciente é revertida naturalmente (SBU, 2006; LOURENÇÃO et al., 2017). Desta maneira, os tecidos provenientes deste tipo de cirurgia estão se tornado cada vez mais escasso. Com isso, um dos objetivos deste trabalho foi padronizar a construção de um modelo de epiderme equivalente que não necessitasse de obtenção de células humanas provenientes de cirurgia. Para tanto, utilizamos queratinócitos (HaCaT) e fibroblastos (HFF-1) de linhagem conhecida, tendo como base os procedimentos de cultivo e suplementação publicados por Boelsma, Verhoeven e Ponec (1999) e Pedrosa et al. (2017).

De acordo com Brohem et al. (2010), existem diversos protocolos de cultivo e estes podem conter variações em alguns parâmetros como: o tipo celular, tipo de modelo desenvolvido, quantidade de suplementos entre outros. Assim, é importante determinar quais as variáveis que podem interferir na qualidade do modelo e proceder as adaptações necessárias. Boelsma, Verhoeven e Ponec (1999) mostraram que a diferenciação das camadas quando as HaCaT são utilizadas para a construção da epiderme, demora entre duas a três semanas, adicionalmente, Colombo et al. (2017) demonstrou a capacidade da linhagem de queratinócitos imortalizados (HaCaT) em expressar marcadores de diferenciação celular em até duas semanas de cultivo. Seguindo as recomendações de cultivo propostas nos trabalhos, nosso modelo HaCaT-EHE demonstrou boa diferenciação celular e espessura do tecido, comparável a modelo outros modelos já publicados e que utilizaram células primárias (JUNG et al., 2014; MORALES et al., 2016; PEDROSA et al., 2017; HWANG et al. 2020). Porém, para o desenvolvimento do modelo utilizando HaCaT, foi necessária a submersão em meio por 48h e 16 dias de cultivo em interface ar-líquido. A utilização das HaCaT podem ser uma vantagem pela facilidade em se adquirir e manusear, porém há desvantagem está na mutação do gene P53 (MARIE et al., 2008) e na incapacidade da geração de um estrato córneo pronunciado (BOELSMA; VERHOEVEN; PONEC, 1999).

Outros modelos tridimensionais utilizando queratinócitos imortalizados foram publicados, entretanto em sua maioria foram desenvolvidos modelos de pele completa (derme e epiderme) (SCHOOP et al., 1999; ZANONI et al., 2014; LIU et al., 2017; LI et al., 2017; TAN et al., 2019). Liu et al. (2017) construiu um modelo *in house* utilizando as HaCaT, foi relatado que as células não se diferenciaram de forma adequada, entretanto o autor não realizou ensaios de avaliação da expressão de biomarcadores o que é essencial para concluir a capacidade proliferativa e maturação adequada das células.

A capacidade de diferenciação das células no protocolo de cultivo estabelecido foi confirmada pela detecção da expressão de biomarcadores celulares de diferenciação. As citoqueratinas CK10 e CK14 encontradas nas camadas basal, granulosa e espinhosa, foram utilizadas como marcadores moleculares de diferenciação nas células epiteliais. Essas moléculas são filamentos intermediários produzidos pelas células e são encontrados no espaço intercelular, com a função de manter a estabilidade e integridade celular, além de permitir a formação e preservação do tecido (SCHWEIZER et al., 2006; MOLL; DIVO; LANGBEIN, 2008). Além das citoqueratinas, outras proteínas associadas à diferenciação celular são produzidas tardiamente pelas células e encontradas nas camadas mais superiores do epitélio da epiderme (ALIBARDI, 2013), como resultado da maturação das células (POUMAY; COQUETTE, 2007). A filagrina e involucrina são produzidas quando as células começam a migrar da camada espinhosa e são indicadoras da formação do estrato córneo que é o principal responsável pela permeabilidade da pele (BANKS-SCHLEGEL; GREEN, 1981; YOUSEF; ALHAJJ; SHARMA, 2020; LIU et al., 2017).

Em relação a expressão dos biomarcadores, nosso modelo foi capaz de expressar a CK14, indicando que as células da camada basal estavam proliferativas. Além disso houve a

expressão da camada suprabasal indicada pela CK10, corroborando com a informação dos estudos apresentados anteriormente, que nosso modelo apresentou grau de diferenciação dos queratinócitos. O estrato córneo embora não muito visível pela fotomicrografia apresentada com a coloração de HE, foi observado pela expressão de filagrina e involucrina, demonstrando que há formação de estrato córneo pelas células HaCaT nas condições de cultivo utilizadas.

Outro parâmetro utilizado para validar o modelo da epiderme foi a avaliação da função barreira do estrato córneo. De acordo com o protocolo 439 e 431 da OCDE (2019a,b), a função barreira está relacionada à permeabilidade e à capacidade do tecido de impedir a penetração de substância exógena. Como já citado anteriormente, alguns trabalhos (ABDAYEM; HAFTEK, 2018; YOUSEF; ALHAJJ; SHARMA, 2020) também demonstraram que a boa integridade do estrato córneo protege as células das camadas inferiores de fatores externos. Hwang et al (2020) avaliaram a incidência de alteração da morfologia celular após a exposição a substâncias irritantes e não irritantes e constataram que a as substâncias irritantes alteraram consideravelmente a integridade do estrato córneo e com isso as células das camadas inferiores, corroborando com a informação apresentada nos estudos. O modelo aqui desenvolvido mostrou permeabilidade de barreira comparável a outros modelos de epiderme humana equivalente já validados e vale ressaltar que o modelo HaCaT-EHE, não apresentou um estrato córneo pronunciado, entretanto Poumay; Coquete (2007) considera que a comunicação intercelular mais eficiente é uma das coisas que faz o modelo 3D mimetizar os efeitos que ocorreriam no organismo. Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que não somente o estrato córneo está ligado a permeabilidade de substâncias, mas sim a epiderme como um todo.

Vários grupos desenvolveram modelos dérmicos/epidérmicos 3D, que são capazes de detectar substâncias irritantes e corrosivas visando a substituição do teste de Draize. A avaliação desses efeitos se baseia na determinação da viabilidade celular, utilizando como indicador o sal de formazan gerado após a clivagem do MTT pela desidrogenase mitocondrial (FENTEN et al., 1998; DRAIZE; WOODARD; HERBERT, 1944; OCDE 2015; ESKES et al., 2007). No entanto, segundo ALÉPÉE et al., (2015), as substâncias coloridas podem interferir no sinal espectrofotométrico, prejudicando a análise. Assim, considerando que vários produtos utilizados em cosméticos possuem cores, como por exemplo os corantes capilares, buscamos padronizar um método capaz de avaliar substâncias coloridas e incolores. Para esse fim, foi validado o método de determinação de sal de formazan em CLAE, que não sofre interferências devido a presença de cores na amostra. Para a validação do método, foi utilizado o manual internacional para validação analítica do FDA (FDA, 2018b), bem como as recomendações de

Alépée et al. (2015) e o protocolo da SkinEthic (EURL-ECVAM, 2017). O método mostrou-se reprodutível, exato, linear nas concentrações de trabalho, além de não mostrar interferência da matriz. Portanto, é adequado para análises de acordo com o manual da FDA e as recomendações da OCDE (FDA, 2018b; OECD, 2019a,b).

Nossa intenção era desenvolver um modelo de epiderme usando células imortalizadas, que pudesse ser utilizado em estudos preliminares para avaliar a segurança de produtos aplicados na pele. Assim, é importante que o HaCaT-EHE seja capaz de detectar efeitos irritantes e corrosivos. O European Center for Validation of Alternative Methods (ECVAM) propôs o uso de vários produtos químicos, a fim de confirmar a capacidade de detectar efeitos irritantes e corrosivos. Nesse contexto, Alépée et al. (2010) avaliaram a capacidade de dois modelos diferentes de RHE, SkinEthic[®] e EpiskinTM. Neste estudo, os autores avaliaram a resposta à irritação e corrosão, após a exposição celular a diversos produtos químicos. Kandárová et al. (2006) também estudaram a capacidade de predição da SkinEthic[®]. Mais tarde, Alépée et al. (2014) validaram o uso do SkinEthic[®] para avaliar os efeitos da corrosão, mostrando sua capacidade de distinguir substâncias corrosivas de não corrosivas. Alépée, Grandidier e Cotovio (2019) usaram o Episkin para avaliar algumas recomendações diferentes da classificação GHS e mostrou boas respostas preditivas usando os testes Bottom-Up e Top-Down. Mewes et al. (2016) também desenvolveram um modelo in vitro que poderia ser usado para detectar irritação. Para a validação do nosso modelo, utilizamos uma lista de produtos químicos com efeitos conhecidos, escolhidos com base no protocolo da OECD (2015d,e) e, nos trabalhos desenvolvidos por Pedrosa et al. (2017) e Catarino et al. (2018).

Embora não tenhamos usado todas as substâncias presentes na lista (OECD, 2015d,e), nossos resultados com 11 substâncias recomendadas para avaliação da irritação e 4 substâncias recomendadas para avaliação da corrosão, mostram que nosso modelo é capaz de distinguir efeitos irritantes de não irritantes, bem como substâncias corrosivas e não corrosivas, e com grande valor preditivo quando comparados aos modelos validados, de acordo com os parâmetros demonstrados por Jung et al. (2014) e estabelecidos pela OECD (OECD, 2015d,e; OECD, 2019a) pelo qual considera adequado: sensibilidade 80%, especificidade 70% e exatidão 75% para irritação e os resultados demonstraram 100%, 75% e 90% respectivamente; sensibilidade >95%, especificidade >70%, exatidão >82,5% para corrosão e os resultados demonstraram 100% para os três parâmetros.

No entanto, dentre as 11 substâncias selecionadas para o ensaio de proficiência de irritação, uma substância testada não induziu ao efeito esperado. Segundo a OECD (2015e, 2019a), o isopropanol é considerado uma substância não irritante. Mas, o modelo HaCaT-EHE exibiu efeito irritante após exposição ao isopropanol. Alguns estudos demonstraram potencial de irritação dessa substância (CARTNER et al., 2017; ABO et al., 2018) e, como o protocolo da OECD permite uma grande variação na área de aplicação da substância no tecido, decidimos usar 70 μ l, pois essa quantidade é capaz de cobrir toda a superfície do tecido. Considerando o diâmetro tecidual obtido nas condições de cultivo, a adição de 70 μ L representa 70 μ L/cm² de exposição, que foi superior a outros modelos (OECD, 2019a; PEDROSA et al., 2017) e, provavelmente devido a exposição a uma concentração mais alta, foi observado o efeito de irritação. Assim, podemos considerar que o modelo foi capaz de detectar um efeito irritante devido à exposição a altas concentrações de isopropanol, mais uma vez comprovando a validade do modelo.

Outros modelos *in house* também apresentaram bons resultados preditivos assim como o nosso, quando os protocolos da OECD foram aplicados. Morales et al. (2016) desenvolveram um modelo *in house* de pele *full* e aplicaram este modelo para algumas substâncias preditivas e sugeridas pela OECD e concluíram que embora seja necessário a realização de novos ensaios, os resultados foram promissores. Jung et al. (2014) e Hwang et al. (2020) utilizaram o modelo KeraskinTM para aplicação dos mesmos protocolos e também apresentaram bons resultados preditivos quando comparados com os modelos já validados.

5.2. Ensaios realizados com os corantes

5.2.1. Basic Blue 99

Nossos dados não demonstraram a indução de quebras de DNA em células HaCaT cultivadas em monocamada quando expostas ao corante BB99, porém já foi relatada a capacidade do BB99 de induzir a mutações do tipo *frameshift*, detectadas no ensaio de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* empregando as linhagens TA1538, TA98, TA100, TA1537. Adicionalmente, também já foi relatado que este corante aumenta a incidência de aberrações cromossômicas em células V79, após exposição por 18 horas em concentrações acima de 45 µg/mL (COSMETIC INGREDIENT REVIEW EXPERT PANEL, 2007). Com

isso, podemos sugerir que o corante tem potencial em induzir instabilidade genômica, mas não pelo mecanismo de quebra de DNA.

Alguns estudos já demonstraram a relevância em testar substâncias nos modelos tridimensionais devido às semelhanças com o organismo humano (POUMAY et al., 2004; BROHEM et al, 2010). O teste do cometa faz parte de uma sequência de ensaios para verificar a toxicidade de substâncias a serem utilizadas em cosméticos, como é o caso do BB99 (REUS et al., 2013; REISINGER et al., 2018). Nossos dados mostram que o BB99 não é genotóxico para as células cultivadas em monocamada, nem tampouco no modelo tridimensional (HaCaT-EHE). Por outro lado, observamos que o corante é capaz de provocar efeitos citotóxicos em HaCaT cultivadas em monocamada quando expostas em concentrações de 50 µg/mL por 4 horas. Alguns estudos mostram que os modelos tridimensionais são mais resistentes, pois mimetizam a arquitetura tecidual e a comunicação intercelular (POUMAY et al., 2004; FLAMAND et al., 2006; MAZZOLENI; LORENZO; STEIMBERG, 2009; MATHES; RUFFINER; GRAF-HAUSNER, 2014), e provavelmente por esse motivo, foi possível realizar testes com o modelo de epiderme em concentrações mais elevadas quando comparado ao estudo em monocamadas, mantendo uma boa viabilidade celular, mas ainda assim com resultados negativos para genotoxicidade.

O ensaio do cometa como já mencionado anteriormente, sugeriu a alta toxicidade do corante para as células HaCaT assim, utilizamos testes de viabilidade celular para verificar a potência deste efeito para as células da pele e já foi relatado o uso desses ensaios para diversas finalidades, inclusive há relatos com a utilização de queratinócitos. Recentemente Santos-Filho et al. (2018) utilizaram células HaCaT como modelo para avaliação de quimioprevenção de antioxidantes naturais. Já Mohit et al., (2018) demonstraram que quando os queratinócitos humanos imortalizados foram expostos a concentrações baixas de arsênio, a capacidade proliferativa das células aumentou e neste mesmo estudo, efeitos tóxicos com as mesmas células foram observados em concentrações elevadas da mesma substância.

Utilizando os resultados obtidos pelo teste do MTT, observamos que o BB99 reduziu drasticamente a viabilidade das células cultivadas em monocamada, mesmo em baixas concentrações, com IC₅₀ de 21,82 μ g/mL. Após a observação da citotoxicidade intensa, a etapa seguinte do trabalho foi a investigação do mecanismo de morte celular. Desta maneira, foi realizado o ensaio de viabilidade celular utilizando anexina V e iodeto de propídeo (PI). Neste ensaio é realizada a leitura por meio de citometria de fluxo para a determinação da densidade

celular nos diferentes quadrantes, indicando processos de apoptose precoce, apoptose tardia, necrose e as células viáveis (TURAN-ZITOUNI et al., 2018). A detecção da exposição da fosfatidilserina revelada pela ligação com anexina e a perda da integridade da membrana revelada pelo iodeto de propídeo ocorre por emissões fluorescentes em verde e vermelho, respectivamente (HINGORANI et al., 2011).

Utilizando o ensaio de anexina-V FITC / PI, observamos que o BB99 induz a necrose em células HaCaT, cultivadas em monocamada e exposta por apenas por 4 horas. Este efeito pode ser observado por um aumento significativo nas células PI + em concentrações tão baixas quanto 5 μ g/mL, porém sem marcação significativa de anexina V. Em concentrações mais altas (30 e 45 μ g/mL), observamos células com padrão de dupla marcação (PI +/Anexina-V +). Esse efeito pode ocorrer porque a anexina V também é capaz de marcar células necróticas após a ruptura das membranas citosólicas, permitindo que a anexina V acesse o citoplasma (Idris et al., 2017).

Para comparar a citotoxicidade induzida pelos corantes capilares detectada nas células cultivadas em monocamada e em 3D, realizamos o ensaio TUNEL com os modelos HaCaT-EHE expostos ao corante BB99. Esta técnica foi escolhida por ser sensível para a identificação de apoptose através da marcação de fragmentos de DNA (KYRYLKOVA et al., 2012; MAJTNEROVÁ; ROUŠAR, 2018). Foi observada intensa marcação com fluoresceína em todas as concentrações testadas, indicando a ocorrência de apoptose devido a presença da fragmentação no DNA, desde a concentração de 500 µg/mL, muito inferior ao limite estabelecido pelo Comitê Científico Europeu de 10.000 µg/mL de corantes em formulações de tinturas semipermanentes (SCCS/1436/11; SCCS/1537/14). Alguns trabalhos já demonstraram que há correlação entre a detecção de fragmentação no DNA identificado pelo teste de TUNEL com a expressão de caspases identificadas por *Western Blot* e marcação com fosfatidilserina utilizando o ensaio de viabilidade Anexina V/PI (LIANG et al., 2019; HAO et al., 2019; ZHOU et al., 2019).

É importante considerar que as células cultivadas em monocamada sofreram necrose após a exposição ao corante, detectada no ensaio de Anexina V/PI, diferente do modelo em 3D que indicou ocorrência de apoptose. No entanto, cabe salientar que o modelo 3D possui maior similaridade com os humanos quando comparado ao modelo 2D e, portanto, são mais eficazes na estimativa do efeito esperado após exposição humana (HOFFMAN 1991; DHIMAN et al. 2005; SUN et al. 2006; FERRAZ, et al, 2012; LEME et al., 2015).

Considerando a intensa morte celular induzida pelo corante BB99, tanto em células cultivadas em monocamadas quanto em 3D, era esperado que esse corante azul fosse capaz de induzir a efeitos irritativos e corrosivos. De fato, o corante BB99 induziu irritação após a exposição do modelo HaCaT-EHE e segundo a RDC de nº 19 de 2013, os produtos cosméticos não podem apresentar irritação, sensibilização e fotossensibilização (BRASIL, 2013). Sendo assim o BB99 demonstrou estar fora desses pré-requisitos devido ao efeito de irritação observado na concentração mais elevada no período de 30 minutos. Adicionalmente, a literatura mostra que o corante BB99 pode levar a leve irritação em pele de coelho, além de provocar reações alérgicas e urticária em humanos, tanto em indivíduos submetidos a procedimentos de tintura em que o corante estava presente na fórmula, como em profissionais que realizam esses procedimentos (COSMETIC INGREDIENT REVIEW EXPERT PANEL, 2007; BROECKE et al., 2014). Nos últimos anos, foi relatado um caso de reação alérgica severa em uma mulher de 56 anos durante um procedimento de tintura, utilizando um produto comercial que continha o corante. Testes de alergia foram realizados e constatou-se que a concentração de 0,1% do corante aplicado diretamente na pele, foi suficiente para provocar uma reação severa (WASHIO et al., 2017).

Em relação ao teste de corrosão, o efeito também foi detectado por meio do ensaio de MTT, mesmo após exposição a curta período de tempo (1 hora), revelado pela redução da viabilidade celular. Por outro lado, as maiores concentrações do corante aparentemente elevaram a viabilidade celular, devido ao aumento na detecção do sal de formazan. No entanto, como já relatado por alguns autores, o MTT é reduzido principalmente, nas mitocôndrias por enzimas ativas no local. Desta maneira, a redução do MTT não é considerada apenas um fator que estima a viabilidade celular, mas principalmente um indicador da capacidade metabólica da célula (WHITAKER et al., 2016). Rai et al (2018) demonstraram que células expostas à radiação apresentaram um aumento na formação do sal de formazan nas mitocôndrias, além do aumento da ativação mitocondrial e indução da biogênese mitocondrial.

O estresse causado pela exposição a substâncias químicas pode induzir à biogênese mitocondrial, que representa não apenas a multiplicação dessas organelas em número, mas também o aumento da atividade metabólica realizada por elas, como resultado do estresse químico. Desta forma, ocorre uma expressão elevada das desidrogenases mitocondriais, que são as principais enzimas envolvidas na redução do reagente de MTT (RAI et al., 2018). No entanto, a estimulação excessiva da mitocôndria antecede a morte celular (LO et al., 2018; RAI et al., 2018), que pode ser confirmada pela redução da viabilidade celular na maior concentração

de BB99 testada, após o tempo de exposição de 240 minutos. Vale ressaltar que foram realizados testes com esse corante para avaliar a geração de clivagem inespecífica do MTT e foi constatado a ausência (dados não mostrados).

O corante BB99 ainda é pouco estudado, entretanto este trabalho somado a outros já publicados, demonstraram a toxicidade do corante. O comitê científico europeu em seu último relatório (SCCS/1585/17), não conseguiu avaliar se a concentração do corante nas fórmulas de tinturas proposta em 2014 (SCCS/1537/14) poderia ser considerada segura devido a quantidade de isômeros que podem ser encontrados no produto, além disso, há carência de resultados atuais sobre seus efeitos, reforçando assim a necessidade de cautela na utilização de produtos que o contenha.

5.2.2. Basic Red 51

Similarmente ao corante BB99, iniciamos a verificação da toxicidade do corante BR51 por meio da avaliação da capacidade em induzir a quebras no DNA, com o objetivo de complementar os dados referentes à toxicidade gerada pela substância ao material genético, considerando que já existem na literatura estudos mostrando efeitos induzidos por este corante. Tarfu-Cardona et al. (2015) demonstraram que o corante provoca efeitos genotóxicos significativos e estes efeitos foram avaliados pelo ensaio do Cometa em células HepG2, na concentração de 0,02 µg/mL. Também foi observada a capacidade em induzir mutações do tipo *frameshift* em bactérias (*Salmonella typhimurium*, linhagem TA98) (SCCS 1436/11). Adicionalmente, nosso grupo já demonstrou a capacidade na indução de estresse oxidativo e formação de espécies reativas de oxigênio (ZANONI et al., 2014).

Primeiramente, foi realizado o teste cometa em queratinócitos humanos imortalizados cultivados em monocamada, para que, em uma etapa posterior, as concentrações determinadas fossem utilizadas nos estudos em modelo tridimensional. Nossos resultados mostram que o BR51 é capaz de induzir quebras de DNA em HaCaT expostas já a partir da concentração de 15 µg/mL. Ao comparar os resultados obtidos por Tarfut-Cardona et al. (2015), podemos concluir que os queratinócitos não são tão sensíveis como as células HepG2, uma vez que os efeitos apareceram em concentrações inferiores nas células hepáticas quando comparadas com as células da epiderme.

Complementarmente, os nossos dados mostraram que a concentração de 30 µg/mL induziu os efeitos mais acentuados, com redução da manifestação dos efeitos nas concentrações mais elevadas. Durante a análise das lâminas, foi possível também observar diversos nucleóides com intensa fragmentação, conhecidos como "fantasmas" e que não são contabilizados pelo software (dados não mostrados). No entanto, como o ensaio do cometa não constitui uma metodologia de análise de indução de morte celular, são necessários ensaios complementares para afirmar que as estruturas observadas durante a análise, sejam mesmo resultado de células inviáveis ou artefatos de técnica, pois as células em apoptose normalmente são a minoria quando comparadas a análise completa da lâmina (COLLINS, 2004; LORENZO et al., 2013). Ainda assim, a redução no efeito observado nas concentrações maiores quando somada à observação de danos intensos durante a análise, sugerem que o corante seja também citotóxico. Chequer et al. (2009) e Ferraz et al. (2011) já observaram fenômenos semelhantes na avaliação da instabilidade genômica induzida por corantes têxteis, ao empregarem o ensaio de micronúcleos e cometa, respectivamente, em células HepG2. Em ambos os trabalhos, os autores observaram o aumento na intensidade do efeito em função da concentração até um limite, e posteriormente houve a redução no efeito observado que foi atribuída à morte celular, indicando a perda de sensibilidade do método utilizado (CHEQUER et. al., 2009; FERRAZ et al, 2011).

Além disso, já foi relatado que o estresse oxidativo pode gerar danos no DNA e também mediar morte celular por apoptose (FRANCHI et al., 2015), e também induzir a fragmentação no DNA. Nosso grupo já demonstrou que o corante BR51 é capaz de induzir o estresse oxidativo nas mesmas células (ZANONI et al., 2014), possivelmente essas alterações bioquímicas são responsáveis pela fragmentação do DNA aqui observada.

No modelo HaCaT-EHE também foi observado o efeito genotóxico, porém em menor intensidade em comparação ao efeito detectado em monocamada, ou seja, o BR51 induziu a fragmentação do DNA nos dois modelos. As células cultivadas no modelo 3D parecem ser mais resistentes a esse dano quando comparadas à cultura 2D. Alguns trabalhos mostraram comparação semelhante usando outros parâmetros. Li et al. (2008) avaliaram os efeitos de medicamentos antitumorais utilizando células HepG2 cultivadas nos modelos 2D e 3D e a comparação mostrou maior resistência do modelo 3D em comparação ao modelo 2D, após a exposição a substâncias em ensaios de viabilidade e avaliação de sensibilidade a medicamentos. A comparação entre os modelos 3D e 2D usando drogas anticâncer realizada por Fontoura et al. (2020) mostraram os mesmos resultados, mas foram utilizadas células primárias extraídas de um tumor hepático. Sun et al. (2006) utilizaram células de epiderme cultivadas tanto em 2D

quanto em 3D e ambos modelos foram expostos a algumas substâncias. Na avaliação de citotoxicidade, os autores também concluíram que o modelo 3D é mais resistente que as células cultivadas na forma tradicional (Sun et al, 2006).

Como o teste cometa sugeria citotoxicidade em concentrações maiores, realizamos a avaliação da viabilidade celular nas células HaCaT, mostrando intensa redução no número de células viáveis logo na primeira dose testada (5 μ g/mL), após 24 horas de exposição. Vale lembrar que, no ensaio do cometa a exposição é de apenas 4 horas e, provavelmente por isso, a redução do efeito e aparecimento de nucleóides altamente fragmentados tenha ocorrido em doses mais elevadas. Tratando-se do modelo 3D, a avaliação do mecanismo de indução da morte celular também foi realizada utilizando o teste de TUNEL, e similarmente ao ocorrido com o BB99, a marcação com fluoresceína indica indução de morte celular por apoptose em todas as concentrações testadas.

Tarfut-Cardona et al., (2015) além de avaliar os efeitos de genotoxicidade, avaliaram também a viabilidade celular e observaram redução de viabilidade após a exposição ao mesmo corante, porém utilizando HepG2. Foi observada a diminuição da atividade mitocondrial de forma acentuada a partir concentração de 20 µg/mL, após 24 horas de tratamento, bem como a perda da integridade da membrana mesmo que de forma menos intensa. No entanto, concentração de 2.000 µg/mL levou a perda da integridade da membrana em mais de 50% das células, nossos achados demonstraram efeitos de citotoxicidade e genotoxicidade em concentrações superiores, indicando uma resistência dos queratinócitos quanto ao BR51, adicionalmente, resultados similares foram demonstrados por Marie et al. (2008) pelo qual a exposição ao benzo[a]pireno provocou efeitos nas células HepG2 em concentrações inferiores quando comparados às HaCaT, os autores defendem que esses resultados são em decorrência da baixa capacidade metabólica dos queratinócitos e no caso da HaCaT, pode ser também devido a mutação do gene p53 (MARIE et al., 2008; TARFUT-CARDONA et al., 2015).

Zanoni et al. (2014) também constataram a citotoxicidade do corante na mesma linhagem celular aqui estudada, além da detecção de estresse oxidativo, indução de apoptose indicada pela marcação celular com a fosfatidilserina e expressão de caspases. Também foi relatado em queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) a incidência de estresse oxidativo, apoptose e danos no DNA em decorrência da exposição a luz ultravioleta (KUO et al., 2020). Os mesmos efeitos de estresse oxidativo, apoptose e genotoxicidade foram observados em células de pele humana após a exposição a nanopartículas de níquel (ALARIFI et al., 2014). Com isso, podemos inferir que a incidência de fragmentação no DNA pode estar relacionada ao estresse oxidativo e morte celular por apoptose.

O corante BR51 não induziu a efeitos corrosivos ou irritantes após a exposição do modelo HaCaT-EHE. Desta forma, pode-se concluir que o efeito tóxico mais relevante do BR51 é a genotoxicidade e não citotoxicidade segundo os resultados encontrados e segundo Zanoni et al. (2014) o corante pode induzir o estresse oxidativo e apoptose.

Da mesma forma que o corante BB99, o BR51 induziu a efeitos tóxicos em concentrações inferiores ao limite recomendado pelo Comitê Científico Europeu (SCCS/1436/11) que permite a presença de até 1% (10.000 μ g/mL) em formulações de tinturas semi-permanentes e 0,5% (5.000 μ g/mL) em formulações de tinturas permanentes, o BR51 já foi muito estudado e os trabalhos demonstraram o potencial da molécula em causar danos genônimos além de potencial citotóxico embora o IC₅₀ de citotoxicidade encontrado ter ocorrido em concentração inferior quando comparado ao BB99, o corante azul demonstrou efeitos mais pronunciados em relação a morte celular além da capacidade em provocar irritação no modelo 3D.

Os efeitos provocados pelos corantes foram diferentes entre o modelo 2D e 3D, como já citado anteriormente os modelos 3D mimetizam melhor o organismo humano quando comparado ao modelo 2D. Tal fato associado a ascensão da utilização de métodos alternativos ao uso de animais, estimula ainda mais o uso de modelos tridimensionais para avaliação de *endpoints* relacionados a toxicidade de substâncias.

Além disso, ambos os corantes são utilizados em produtos similares, porém os efeitos apresentados demonstram as diferenças no mecanismo de ação, tais diferenças são em decorrência das características físico-químicas da molécula, embora não haja legislação específica para esses corantes no Brasil, a comunidade europeia considera o BR51 como tóxico acima das concentrações listadas e considera a segurança do BB99 como duvidosa. Considerando nossos resultados em conjunto com outros dados encontrados na literatura, sugerimos que a avaliação da segurança desses produtos deve ser reconsiderada.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Com os dados obtidos neste trabalho podemos concluir:

1- Quanto a validade do modelo desenvolvido:

- O modelo de pele humana equivalente (HaCaT-EHE) foi desenvolvido com sucesso e, apresenta características histológicas, capacidade de diferenciação celular e função de barreira semelhantes a outros modelos validados, com a vantagem de não utilizar células primárias e sim células imortalizadas;
- O método de validação analítica demonstrou reprodutibilidade, exatidão, linearidade nas concentrações de trabalho, além de não demonstrar interferência da matriz;
- Adicionalmente, o HaCaT-EHE pode ser utilizado para estudos preliminares de avaliação da segurança de produtos cosméticos, devido a sua capacidade de distinguir efeitos irritantes e corrosivos, com bom valor preditivo de acordo com a recomendação da OECD.

2- Quanto a aplicação do modelo para estudo de toxicidade de corantes de cabelo:

 O corante Basic Blue 99 tem a citotoxicidade como principal mecanismo de toxicidade dérmica, revelada pela indução de apoptose, irritação e corrosão de células da epiderme. Já o corante Basic Red 51, tem como principal mecanismo de toxicidade, a genotoxicidade.

Desta forma, como os efeitos induzidos em modelo que mimetizam a resposta humana foram detectados em concentrações menores do que as encontradas em formulações comerciais, a utilização destes corantes em tinturas capilares deve ser revista.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABDAYEN, R.; HAFTEK, M. The epidermal barrier. Annales of Dermatologie et de Venereologie, France, v. 145, n.4, p. 293-301, 2018.

ABO, T.; YUKI, T.; XU, R.; ARAKI, D.; TAKAHASHI, Y.; SAKAGUCHI, H.; ITAGAKI, H. Expansion of the applicability domain for highly volatile substances on the short time exposure test method and the predictive performance in assessing eye irritation potential. **The journal of Toxicological Sciences**, Toquio, v. 43, n. 7, p. 407-422, 2018.

AGÊNCIA BRASIL. **Veja as medidas que cada estado está adotando para a covid-19**. 2020. Disponível em: < https://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2020-03/veja-medidas-quecada-estado-esta-adotando-para-combater-covid-19 >. Acesso em 26 Maio 2020.

ALARIFI, S.; ALI, D.; ALAKHTANI, S.; AL SUHAIBANI, E. S.; AL-QAHTANI, A. A. Reative oxygen species-mediated DNA damage and apoptosis in human skin epidermal cells after exposure to nickel nanoparticles. **Biological Trace Element Research**, Totowa, v. 157, p. 84-93, 2014.

ALÉPÉE, N.; TORNIER, C.; ROBERT, C.; AMSELLEM, C.; ROUX, M-H.; DOUCET, O.; PACHOT, J.; MÉLONI, M.; BRUGEROLLE, FRAISSINETTE, A. B. A catch- p validation study on reconstructed human epidermis (SkinEthic[™] RHE) for full replacement od Draize skin irritation test. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 24, p.257-266, 2010.

ALÉPÉE, N; ROBERT, C.; TORNIER, C.; COTOVIO, J. The usefulness of the validated SkinEthicTM RHE test method to identify skin corrosive UN GHS subcategories. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 28, p. 616-625, 2014.

ALÉPÉE, N.; BARROSO, J.; SMEDT, A. D.; WEVER, B. D.; HIBATALLAH, J.; KLARIC, M.; MEWES, K. R.; MILLET, M.; PFANNENBECKER, U.; TAILHARDAT, M.; TEMPLIER, M.; MCNAMEE, P. Use of HPLC/UPLC'spectrophotometry for detection of formazan in *in vitro* reconstruction human tissue (RhT)- based test methods employing the MTT-reduction assay to expand their applicability to strongly coloured test chemicals. **Toxicology in vitro**, Oxford, v.29, p.741-761, 2015.

ALÉPÉE, N.; GRANDIDIER, M-H.; COTOVIO, J. Usefulness of the EpiskinTM reconstructed human epidermis model within integrated approaches on testing and assessment (IATA) for skin corrosion and irritation. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 54, p. 147-167, 2019.

ALERICO, G. C.; BECKENKAMP, A.; VIGNOLI-SILVA, M.; BUFFON, A.; POSER, G.L. Proliferative effect of plants used for wound healing in Rio Grande do Sul state, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v.176, p.305-310, 2015.

ALIBARDI, L. Cornification in reptilian epidermis occurs through the deposition of keratinassociated beta proteins (beta-keratins) onto a scaffold of intermediate filament keratins. **Journal of Morphology**, Hoboken, v. 274, p. 175-193, 2013.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Hair Dyes**. 2019. Disponível em: < https://www.cancer.org/cancer/cancer-causes/hair-dyes.html > Acesso em: 02 Maio 2020.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE HIGIENE PESSOAL, PERFUMARIA E COSMÉTICOS. **Panorama do setor HPPC**. 2019. Disponível em: < https://abihpec.org.br/publicacao/panorama-do-setor-2019-2/ > Acesso em: 25 Maio 2020.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE HIGIENE PESSOAL, PERFUMARIA E COSMÉTICOS. Venda de produtos de higiene e beleza cai até 15%. 2020a. Disponível em: < https://abihpec.org.br/venda-de-produto-de-higiene-e-beleza-cai-ate-15/ >. Acesso em 26 Maio 2020.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE HIGIENE PESSOAL, PERFUMARIA E COSMÉTICOS. **Venda de itens de higiene cresce enquanto de outros segmentos caem**. 2020b. Disponível em: < https://abihpec.org.br/venda-de-itens-de-higiene-cresce-enquanto-deoutros-segmentos-caem/ >. Acesso em 26 Maio 2020.

BANKS-SCHLEGEL, S. GREEN, H. Involucrin synthesis and tissue assembly by keratinocytes in natural and cultured human epithelia. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 90, p. 732-737, 1981.

BOELSMA, E.; VERHOEVEN, M. C. H.; PONEC, M. Reconstruction of a human skin equivalent using a spontaneously transformed keratinocyte cell line (HaCaT). Journal of Investigative Dermatology, New York, v.112, p.489-498, 1999.

BRASIL. Agencia nacional de vigilância sanitária. **RDC nº 19 de 10/04/2013**. 2013. Disponível em: < http://portal.anvisa.gov.br/legislacao/?inheritRedirect=true#/visualizar/356500 >. Acesso em 25 Abr. 2020.

BRASIL. Agencia nacional de vigilância sanitária. **Anvisa aceita 17 métodos alternativos validados em substituição ao uso de animais**. 2014. Disponível em: < http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/anvisa-aceita-17-metodos-alternativos-validados-em-substituicao-ao-uso-de-animais/219201/pop_up?inheritRedirect=false >. Acesso em: 25 Maio 2020.

BRASIL. Câmara dos Deputados. **Projetos de leis e outras proposições.** 2013. Disponível em: < http://www.camara.gov.br/proposicoesWeb/fichadetramitacao?idProposicao=597587 >. Acesso em: 25 Maio 2020.

BRASIL. Instituto brasileiro do meio ambiente e dos recursos naturais renováveis. **Lei dos** crimes ambientais: Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998 e decreto nº 6.514, de 22 de julho de 2008. 2014. Disponível em: < http://www.ibama.gov.br/sophia/cnia/livros/ALeiCrimesAmbientais.pdf > Acesso em 20 Maio 2020.

BRASIL. Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008. Subchefia para Assuntos Jurídicos. Brasília-
DF. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-
2010/2008/lei/111794.htm > Acesso em 25 Maio 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n°44, de 9 de agosto de 2012. 2012. Disponível em: < https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0044_09_08_2012.html#:~:text=A prova%200%20Regulamento%20T%C3%A9cnico%20Mercosul,perfumes%22%20e%20d% C3%A1%20outras%20provid%C3%AAncias. >. Acesso em 25 Set. 2020.
BRASIL. Ministério de Estado da Ciência, Tecnologia e Inovação. **Portaria nº 491 de 3 de julho de 2012**. 2012. Disponível em: < https://www.jusbrasil.com.br/diarios/38460811/dou-secao-1-05-07-2012-pg-19 >. Acesso em: 25 Set 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicações. **Concea reconhece 17 métodos alternativos ao uso de animais.** 2014. Disponível em: < https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/migracao/Resoluc ao_Normativa_CONCEA_n_18_de_24092014.html >. Acesso em: 25 Maio 2020.

BRASIL. Diário Oficial da União. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Resolução normativa nº 31, de 18 de agosto de 2016**. 2016. Disponível em: < https://www.jusbrasil.com.br/diarios/123227518/dou-secao-1-19-08-2016-pg-4 >. Acesso em: 25 Set. 2020.

BROECKE, K. V.; BRUZE, M.; PERSSON, L.; DEROO, H.; GOOSSENS, A. Contact urticarial syndrome caused by direct hair dyes in a hairdresser. **Contact Dermatitis**, Malden, v. 71, p. 108-128, 2014.

BROHEM, C. A.; CARDEAL, L. B. da S.; TIAGO, M.; SOENGAS, M. S.; BARROS, S. B. de M.; MARIA-ENGLER, S. S. Artificial skin in perspective: concepts and applications. **Pigment Cell & Melanoma Research**, Malden, v.24, p.35-50, 2010.

BUFFOLI, B.; RINALDI, F.; LABANCA, M.; SORBELLINI, E.; TRINK, A.; GUANZIROLI, E.; REZZANI, R.; RODELLA, L.F. The human hair: from anatomy to physiology. **International Journal of Dermatology**, Malden, v.53, n.3, p.331-341, 2014.

CARTNER, T.; BRAND, N.; TIAN, K.; SAUD, A.; CARR, T.; STAPLETON, P.; LANE, M. E.; RAWLINGS, A. V. Effect of different alcohols on stratum corneum kallikrein 5 and phospholipase A2 together with epidermal keratinocytes and skin irritation. **Cosmetic Science**, v. 39, p. 188-196, 2017.

CARVALHO, A. L. L.; WAIZBORT, R. A dor além dos confins do homem: aproximações preliminares ao debate entre francês Power Cobbe e os darwinistas a respeito da vivissecção na Inglaterra vitoriana (1863-1904). **História, Ciência, Saúde**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 3, p. 577-605, 2010.

CATARINO, C. M.; PEDROSA, T. N.; PENNCCHI, P. C.; ASSIS, S. R.; GIMENES, F.; CONSOLARO, M. E. L.; BARROS, S. B. M.; MARIA-ENGLER, S. S. Skin corrosion test: a comparison between reconstructed human epidermis and full thickness skin models. **European** Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Amsterdam, v. 125, p. 51-57, 2018.

CHEQUER, F. M. D.; ANGELI, J. P. F.; FERRAZ, E. R. A.; TSUBOY, M. S.; MARCARINI, J. C.; MANTOVANI, M. S.; OLIVEIRA, D. P. The azo dyes disperse red 1 and disperse Orange 1 increase the micronuclei frequencies in human lymphocytes and in HepG2 cells. **Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 676, p. 83-86, 2009.

CLANCY, S. DNA damage & repair: mechanisms for maintaining DNA integrity. **Nature Education**, v. 1, n. 1, p. 103, 2008. Disponível em: < https://www.nature.com/scitable/topicpage/dna-damage-repair-mechanisms-for-maintaining-dna-344/ >. Acesso em 27 Maio 2020.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 26, p. 249- 261, 2004.

COLOMBO, I.; SANGIOVANNI, E.; MAGGIO, R.; MATTOZZI, C.; ZAVA, S.; CORBETT, Y.; FUMAGALLI. M.; CARLINO, C.; CORSETTO, P. A.; SCACCABAROZZI, D.; CALVIERI, S.; GISMONDI, A.; TARAMELLI, D.; DELL'AGLI, M. HaCaT cells as a reliable in vitro differentiation model to dissect the inflammatory/repair response of human keratinocytes. **Mediators of inflammation**, London, p. 1-12, 2017.

COSMETIC INGREDIENT REVIEW EXPERT PANEL. Final report on the safety assessment of basic blue 99. International Journal of Toxicology, Thousand Oaks, v.26, n.2, p.51-63, 2007.

COSMETICS INFO. **A history of cosmetics from ancient times**. 2016. Disponível em: < http://www.cosmeticsinfo.org/Ancient-history-cosmetics > Acesso em: 21 Maio 2020.

COZIGOU, G.; CROZIER, J.; HENDRIKSEN, C.; MANOU, I.; RAMIREZ-HERNANDEZ, T.; WEISSENHORN, R. The european partnership for alternative approaches to animal testing (EPAA): promoting alternative methods in Europe and beyond. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, Memphis, v. 54, n. 2, p.209-213, 2015.

D'ARCY, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biology Inernational**, Roboken , v. 43, p.582-592, 2019.

DHIMAN, H. K.; RAY, A. R.; PANDA, A. K. Three-dimensional chitosan scaffold based MCF-7 cell culture for the determination of the cytoxicity of tamoxifen. **Biomaterials**, Oxford, v.26, p.979-986, 2005.

DIEGEL, K. L. **Pathology of the intergumentary system**. In: STEINBACH, T. J.; PATRICK, D. J.; COSENZA, M. E. Toxicology pathology for non-pathologists. 2019. Totowa: Human Press p. 483-535.

DOMINGUEZ, M. H.; SALES, D. Safety evaluation. In: SALVADOR, A.; CHISVERT, A. Analysis of cosmetic products. 2007. Elsevier Science ed. p. 423-461.

DRAELOS, Z.D.; **Hair care**: an illustrated dermatologic handbook. 2004. London: Taylor & Francis ed, 263p.

DRAIZE, H.; WOODARD, G.; CALVERY, H. O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, p.377-390, 1944.

EC/2009. Official Journal of the European Union. **Regulation 1223/2009/EC of the European parliament and of the council of 30 November 2009**. 2009. Disponível em: < http://eurlex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1223&from=EN > Acesso em: 25 Maio 2020.

EEC/1986. Official Journal of the European Union. **Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986.** 1986. Disponível em: < http://eur-lex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:31986L0609&from=EN > Acesso em: 25 Maio 2020. EEC/2010. Official Journal of the European Union. **Council Directive 2010/63/EU of the European parliament and the council of 22 September 2010**. 2010. Disponível em: < http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063&from=EN > Acesso em 25 Maio 2020.

ESKES, C.; COLE, T.; HOFFMANN, S.; WORTH, A.; COCKSHOTT, A.; GERNER, I.; ZUANG, V. The ECVAM international validation study *in vitro* tests for acute skin irritation: selection of test chemicals. **ATLA- Alternative to Laboratory Animals**, England, v. 35, p. 603-619, 2007.

EUROPEAN COMMISSION. Communication from the commission to the European parliament and the council. On the animal testing and marketing ban and on the state of play in relation to alternative methods in the field of cosmetics. 2013. Disponível em: < http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:52013DC0135&from=EN > Acesso em: 25 Maio 2020.

EUROPEAN UNION REFERENCE LABORATORY FOR ALTERNATIVES TO ANIMAL TESTING. **SkinEthicTM skin irritation test, protocol n°135**. 2017. Disponível em: < https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/methods-and-protocols/search/135 > Acesso em: 25 Maio 2020.

FENTEN, J. H.; ARCHER, G. E. B.; BALLS, M.; BOTHAM, P. A.; CURREN, R. D.; EARL, L. K.; ESDAILE, D. J.; HOLZHÜTTER, H. G.; LIEBSCH, M. The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the management team. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 12, p. 483-524, 1998.

FERRAZ, E. R. A.; GRANDO, M. D.; OLIVEIRA, D. P. The azo dye disperse Orange 1 induces DNA damage and cytotoxic effects but does not ecotoxic effects in Daphnia similis and Vibrio fischeri. **Journal of Hazardous Materials**, Netherlands, v. 192, p. 628-633, 2011.

FERRAZ, E. R. A.; LI, Z.; BOUBRIAK, O.; OLIVEIRA, D. P. Hepatotoxicity assessment of the azo dyes disperse Orange 1(DO1), disperse red 1 (DR1) and disperse red 13 (DR13) in HepG2 cells. Journal of Toxicology and Environmental Health, part A, Philadelphia, v.75, p.991-999, 2012.

FLAMAND, N.; MARROT, L.; BELAID, J. P.; BOUROUF, L.; DOURILLE, E.; FELTES, M.; MEUNIER, J. R. Dvelopment of genotoxicity test procedures with Episkin, a reconstructed human skin model: towards new tools forin vitro risk assessment of dermally applied compounds? **Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 606, n.1-2, p.39-51, 2006.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Is it a cosmetic, a drug, or both? (or is it soap?).2018a.Disponívelem:<</td>https://www.fda.gov/Cosmetics/GuidanceRegulation/LawsRegulations/ucm074201.htm>Acesso em 20 Maio 2020.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bioanalytical method validation**. 2018b. Disponível em: < https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070107.Pdf >. Acesso em: 25 Maio 2020.

FONTOURA, J. C.; VIEZZER, C.; SANTOS, F. G.; LIGABUE, R. A.; WEINLICH, R.; PUGA, R. D.; ANTONOW, D.; SEVERINO, P.; BONORINO, C. Comparison of 2D and 3D

cell culture models for cell growth, gene expression and drug resistance. **Materials Science & Engineering C**, Amsterdam, v.107, p.110264, 2020.

FRANCHI, L. P.; MANSHIAN, B. B.; SOUZA, T. A. J.; SOENEN, S. J.; MATSUBARA, E. Y.; ROSOLEN, M.; TAKAHASHI, C. S. Cyto- and genotoxic effects of metallic nanoparticles in untransformed human fibroblast. **Toxicology in vitro**, Oxford, v. 29, n. 7, p.1319-1331, 2015.

FRANCO, J. H.; SILVA, B.F.; ZANONI, M.V.B. Using ionic liquid combined with HPLC-DAD to analyze semi-permanent hair dyes in commercial formulations. **Analytical Methods**, Cambridge, v.7, p.1115-1122, 2015.

GALUZZI, L.; BRAVO-SAN PEDRO, J.M.; VITALE, I.; AARONSON, S. A.; ABRAMS, J. M.; ADAM, D.; ALNEMRI, E. S.; ALTUCCI, L.; ANDREWS, D.; ANNICCHIARICO-PETRUZZELLI, M.: BAEHRECKE, E. H.: BAZAN, N. G.: BERTRAND, M. J.: BIANCHI, K.; BLAGOSKLONNY, M. V.; BLOMGREN, K.; BORNER, C.; BREDESEN, D. E.; BRENNER, C.; CAMPANELLA, M.; CANDI, E.; CECCONI, F.; CHAN, F. K.; CHANDEL, N. S.; CHENG, E. H.; CHIPUK, J. E.; CIDLOWSKI, J. A.; CIECHANOVER, A.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L.; DE LAURENZI, V.; DE MARIA, R.; DEBATIN, K-M; DI DANIELE, N.; DIXIT, V. M.; DYNLACHT, B. D.; EL-DEIRY, W. S.; FIMIA, G. M.; FLAVELL, R. A.; FULDA, S.; GARRIDO, C.; GOUGEON, M-L, GREEN, D. R.; GRONEMEYER, H.; HAJNOCZKY, G.; HARDWICK, J. M.; HENGARTNER, M. O.; ICHIJO, H.; JOSEPH, B.; JOST, P. J.; KAUFMANN, T.; KEPP, O.; KLIONSKY, D. J.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LEMASTERS, J. J.; LEVINE, B.; LINKEMANN, A.; LIPTON, S. A.; LOCKSHIN, R. A.; LÓPEZ-OTIN, C.; LUGLI, E.; MADEO, F.; MALOMI, W.; MARINE, J-C, MARTIN, S. J.; MARTINOU, J-C, MEDEMA, J. P.; MEIER, P.; MELINO, S.; MIZUSHIMA, N.; MOLL, U.; MUÑOZ-PINEDO, C.; NUÑES, G.; OBERST, A.; PANARETAKIS, T.; PENNINGER, J. M.; PETER, M. E.; PIACENTINI, M.; PINTON, P.; PREHN, J. H.; PUTHALAKATH, H.; RABINOVICH, G. A.; RAVICHANDRAN, K. S.; RIZZUTO, R.; RODRIGUES, C. M.; RUBINSZTEIN, D. C.; RUDEL, T.; SHI, Y.; SIMON, H-U.; STOCKWELL, B. R.; SZABADKAI, G.; TAIT, S. W.; TANG, H. L.; TAVERNARAKIS, N.; TSUJIMOTO, Y.; VANDEN BERGHE, T.; VANDENABEELE, P.; VILLUNGER, A.; WAGNER, E. F.; WALCZAK, H.; WHITE, E.; WOOD, W. G.; YUAN, J.; ZAKERI, Z.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G.; KROEMER, G. Essential versus acessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. Cell Death and Differentiation, London, v.22, p. 58-73, 2015.

GERA, R.; MOKBEL, R.; IGOR, I.; MOKBEL, K. Does the use of hair dyes increase the risk of developing breast câncer? A meta-analysis and review of the literature. **Anticancer Research**, Athens, v. 38, n.2, p. 707-716, 2018.

GUERRA-TAPIA, A.; GONZALEZ-GUERRA, E. Hair cosmetics: dyes. ACTAS Dermo-Sifiliográficas, Spain, v. 105, p.833-839, 2014.

HAO, Y.; BAI, X.; LIU, X.; KANG, S.; ZHANG, X.; LIU, C.; LI, Z. Downregulation of surviving by adenovirus-mediated shRNA promotes apoptosis in skin cancer cells. **Oncotargets and Therapy**, England, v. 12, p.2921-2930, 2019.

HINGORANI, R.; DENG, J.; ELIA, J.; McINTYRE, C.; MITTAR, D. **Detection of apoptosis using the BD annexin V FITC assay on the BD FACSVerse TM system**, 2011. Disponível em: < https://www.bdbiosciences.com/documents/BD_FACSVerse_Apoptosis_Detection_AppNote. pdf >. Acesso em: 25 Maio 2020.

HIRSCH, C.; SCHILDKNECHT, S. In vitro research reproducibility: keeping up high standards. **Frontiers in Pharmacology**, Switzerland, v.10, p. 1-9, 2019.

HOFFMAN, R. M. Three-dimensional histoculture: origins and applications in cancer research. **Cancer Cell**, Cambridge, v.3, p.86-92, 1991.

HUME, C.W.; LOND, M. C. B. The strategy and tatics of experimentation. **The Lancet**. p. 1049-1052, 1957. Disponível em: < https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19592703563 >. Acesso em 21 Maio 2020.

HWANG, J-H.; JEONG, H.; HUR, S.; NAM, K. T.; LIM, K-M. Employment of cytology for in vitro skin irritation test using a reconstructed human epidermis model, keraskim. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v.69, 104962, 2020.

IDRIS, A.; ZULKIPLI, I. N.; ZULHILMI, N. R.; LEE, H. F.; RAJABALAYA, R.; CHEE, L. Y.; MAJID, M.; DAVID, S. R. *Melastoma malabathricum* ethyl acetate fraction induces secondary necrosis in human breast and lung cancer cell lines. **Pharmacognosy Magazine**, Mumbai, v. 13, p. 688-692, 2017.

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS. **Epitélio estratificado pavimentoso corneificado**. 2019. Disponível em: < http://mol.icb.usp.br/index.php/2-23-tecido-epitelial-de-revestimento-2/ > Acesso em: 25 Maio 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. **Tinturas para cabelo**. 2006. Disponível em: < http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/tintura_cabelo.asp > Acesso em: 25 Maio 2020.

INTERNATIONAL AGENCY RESEARCH on CANCER. Occupational exposures of hairdressers and barbers and personal use of hair colourants. v.99, 2010. Disponível em: < http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol99/mono99.pdf > Acesso em: 25 Maio 2020.

JIANN, B-P. Does hair dye use really increase the risk of prostate cancer? **BMC Cancer**, London, v. 17, n. 1, p. 724-728, 2017.

JONG, W. H.; HOFFMANN, S.; LEE, M.; KANDÁROVÁ, H.; PELLEVOISIN, C.; HAISHIMA, Y.; ROLLINS, B.; ZDAWZCYK, A.; WILLOUGHBY, J.; BACHELOR, M.; SCHATZ, T.; SKOOG, S.; PARKER, S.; SAWYER, A.; PESCIO, P.; FANT, K.; KIM, K.; KWON, J. S.; GEHRKER, H.; HOFMAN-HÜTHER, H.; MELONI, M.; JULIUS, C.; BRIOTET, D.; LETASIOVA, S.; KATO, R.; MIYAJIMA, A.; FONTEYNE, L.; VIDEAU, C.; TORNIER, C.; TURLEY, A.; CHRISTIANO, N.; ROLLINS, T.; COLEMAN, K. P. Round robin study to evaluate the reconstructed human epidermis (RHE) model as an *in vitro* skin irritation test for detection of irritant activity in medical device extracts. **Toxicology in Vitro**, Oxford, Disponível em: < https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.01.001 > Acesso em 30 Jan. 2018.

JOSSET, P.; BUENO, V. SANT'ANA, O. A. **Histology and immunology of the skin**. In: MAIBACH, H. I.; HALL, A. H. Chemical skin injury. 2014. Berlin: Springer, p. 21-42. Disponível em: < https://link.springer.com/book/10.1007%2F978-3-642-39779-0 > Acesso em: 29 Abr. 2020.

JUNG, K.-M.; LEE, S-H.; JANG, W-H.; JUNG, H-S.; HEO, Y.; PARK, Y-H.; BAE, S.; LIM, K-M.; SEOK, S.H. KeraSkin TM_VM: a novel reconstructed human epidermis model for skin irritation tests. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 28, p. 742-750, 2014.

KABAKOV, A. E.; GABAI, V. L. Cell death and survival assays. In: CALDERWOOD, S.; PRINCE, T. **Chaperones**. Methods in molecular biology, v. 1709 p. 107-127, 2018. Human Press, New York-NY.

KANDÁROVÁ, H.; LIEBSCH, M.; SPIELMANN, H.; GENSCHOW, E.; SCHMIDT, E.; TRAUE, D.; GUEST, R.; WHITTINGHAM, A.; WARREN, N.; GAMER, A. O.; REMMELE, M.; KAUFMANN, T.; WITTMER, E.; WEVER, B.; ROSDY, M. Assessment of the human epidermis model SkinEthic RHE for *in vitro* corrosion testing of chemicals according to new OECD TG 431. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 20, p.547-559, 2006.

KANDÁROVÁ, H.; WILLOUGHBY, J. A.; JONG, W. H.; LETASIOVA, S.; MILASOVA, T.; BACHELOR, M. A.; BREYFOGLE, B.; HANDA, Y.; FONTEYNE, L.; COLEMAN, K. P. Pre-validation of an in vitro skin irritation test for medical devices using the reconstructed human tissue model EpiDerm TM. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 50, p.407-417, 2018.

KIM, K-H; KABIR, E.; JAHAN, S. A. The use of personal hair dye and its implications for human health. **Environment International**, Oxford, v. 89-90, p. 222-227, 2016.

KUMARAVEL, T. S.; VILHAR, B.; FAUX, S. P.; JHA, A. N. Comet assay measurements: a perspective. **Cell Biology and Toxicology**, Netherlands, v.25, p.53-64, 2009.

KUO, Y.H.; CHIANG, H-L.; WU, P-Y.; CHANG, Q-X.; WEN, K-C.; LIN, C-Y.; CHIANG, H-M. Protection against ultraviolet A-induced skin apoptosis and carcinogenesis through the oxidative stress reduction effects of N-(4- bromophenetyl) caffeamide, a propolis derivative. **Antioxidants**, Switzerland, v.9, n.4, p.1-17, 2020.

KYRYLKOVA, K.; KYRYACHENKO, S.; LEID, M.; KIOUSSI, C. **Detection of apoptosis by TUNEL assay**. 2012. Disponível em: < https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-61779-860-3_5 >. Acesso em 01 Jun 2020.

LEHMAN-MCKEEMAN, L. D. Absorção, distribuição e excreção de toxicantes. In: **Casarett & Doull's**: Fundamentos de toxicologia. Porto Alegre: AMGH, p.63, 2012.

LEHMAN-MCKEEMAN, L. D. Absorption, distribution and excretion of toxicants. In: KLAASSEN; C. D. **Casarett &Doull's toxicology**: the basic science of poisons. Mc Graw Hill Education editora:- NY, 8 ed. p.153-183,2013.

LEME, D. M.; PRIMO, F. L.; GOBO, G. G.; COSTA, C. R. V.; TEDESCO, A. C.; OLIVEIRA, D. P.. Genotoxicity assessment of reactive and disperse textile dyes using human dermal equivalente (3D cell culture system). **Journal of Toxicology Environmental Health A**, Philadelphia, v. 78, n. 7, p. 466-480, 2015.

LI, C-L.; TIAN, T.; NAN, K-J.; ZHAO, N.; ZHANG, W-G. Survival advantages of multicellular spheroids vs. monolayers of HepG2 cells *in vitro*. **Oncology Reports**, Athens, v. 20, p.1465-1471, 2008.

LI, N.; SHANG, L.; WANG, S. C.; LIAO, L. S.; CHEN, D.; HUANG, J. F.; XIONG, K.; The toxic effect of ALLN on primary rat retinal neurons. **Neurotoxicity Research**, New York, v. 30, n.3, p.392-406, 2016.

LI, N.; LIU, Y.; QIU, J.; ZHONG, L.; ALÉPÉE, N.; COTOVIO, J.; CAI, Z. In vitro skin irritation assessment becomes a reality in China using a reconstructed human epidermis test method. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 41, p. 159-167, 2017.

LIANG, T.; XU, X.; YE, D.; CHEN, W.; GAO, B.; HUANG, Y. Caspase/AIF/ apoptosis pathway: a new target of puerarin for diabetes mellitus therapy. **Molecular Biology Reports**, Netherlands, p. 1-11, 2019, DOI: https://doi.org/10.1007/s11033-019-04925-1.

LIU, Y.; LU. T.; ZHOU, Z.; ZHANG, Y. Study on feasibility of HaCaT epidermal model as an alternative to skin irritation *in vitro*. **Chinese journal of reparative and reconstructive surgery**, Ontario, v.31, n. 10, p. 1262-1266, 2017.

LO, H-M.; MA, M-C.; SHIEH, J-M.; CHEN, H-L.; WU, W-B. Naked physically synthetized gold nanoparticles affect migration, mitocondrial activity, and proliferation of vascular smooth muscle cells. **International Journal of Nanomedicine**, Albany, v. 13, p. 3163-3173, 2018.

LOURENÇÃO, P. L. T. A.; QUEIROZ, D. S.; OLIVEIRA JUNIOR, W. E.; GOMES, G. T.; MARQUES, R. G.; JOZALA, D. R.; ORTOLAN, E. V. P. Tempo de observação e resolução espontânea de fimose primária em crianças. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.44, n.5, p.505-510, 2017.

LORENZO, Y.; COSTA, S.; COLLINS, A. R.; AZQUETA, A. The comet assay, DNA damage repair and cytoxicity: hedgehogs are not always dead. **Mutagenesis**, Dordrecht, v. 28, n. 4, p. 427-432, 2013.

LOUHIMIES, S. Directive 86/609/EEC on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. **ATLA- Alternative to Laboratory Animals**, England, v. 30, n.2, p.217-219, 2002.

LOVELL, D. P.; OMORI, T. Statistical issues in the use of the comet assay. **Mutagenesis**, Oxford, v.23, n.3, p.171-182, 2008.

MADNANI, N.; KHAN, K. Symposium-hair disorders. Indian Journal of Dermatology, Venerology & Leprology, Mumbai, v. 79, n. 5, p.654-667, 2013.

MAJTNEROVÁ, P.; ROUŠAR, T. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 45, n. 5, p.1469-1478, 2018.

MARIE, C.; MAITRE, A.; DOUKI, T.; GATEAU, M.; TARANTINI, A.; GUIRAUD, P.; FAVIER, A.; RAVANAT, J-L. Influence of the metabolic properties of human cells on the kinetic of formation of the major benzo[a]pyrene DNA adducts. **Journal of Applied Toxicology**, England, v. 28, p.579-590, 2008.

MATHES, S. H.; RUFFNER, H.; GRAF-HAUSNER, U. The use of skin model in drug development. Advanced Drug Delivery Reviews, Amsterdam, v.69, p.81-102, 2014.

MAZZOLENI, G.; LORENZO, D.; STEIMBERG, N. Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology. **Genes and Nutrition**, v. 4, p. 13-22, 2009.

MEWES, K. R.; FISCHER, A.; ZÖLLER, N. N.; LAUBACH, V.; BERND, A.; JACOBS, A.; ROMPAY, A.; LIEBSCH, M.; PIROW, R.; PETERSOHN, D. Catch-up validation study of an

in vitro skin irritation test method based on an open source reconstructed epidermis (phase I). **Toxicology in Vitro**, Oxford, v.36, p.238-253, 2016.

MILAN, E. C.; RIEDER, E. A. An approach to cosmeceuticals. Journal of Drugs in Dermatology, New York, v. 15, n. 4, p. 452-456, 2016.

MOHIT, R.; KUJUR, P. K.; MISHRA, A.; SINGH, R. P. Flavonoids inhibit chronically exposed arsenic-induced proliferation and malignant transformation of HaCaT cells. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, Malden, v. 34, n.1, p. 91-101, 2018.

MOLL, R.; DIVO, M.; LANGBEIN, L. The human keratins: biology and pathology. **Histochemistry and Cell Biology**, Germany, v. 129, p. 705-733, 2008.

MORALES, M.; PÉREZ, D.; CORREA, L.; RESTREPO, L. Evaluation of fibrina-based dermal-epidermal organotypic cultures for in vitro skin corrosion and irritation testing chemical according OECD TG 431 and 439. Toxicology in Vitro, Oxford, v. 36, 89-96, 2016.

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

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Hair dyes and cancer risk**. 2016. Disponível em: < http://www.cancer.gov/cancertopics/causes-prevention/risk-factors/myths/hair-dyes-fact-sheet > Acesso em: 25 Maio 2020.

NOHYNEK, G. J.; ANTIGNAC, E.; RE, T.; TOUTAIN, H. Safety assessment of personal care products/ cosmetics and their ingredients. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v.243, p.239-259, 2010.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test no. 406**. Skin sensitization. Adopted by the council 17TH july 1992. 1992. Disponível em: < https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264070660-

en.pdf?expires=1587781559&id=id&accname=guest&checksum=CE1E0D1913B461FB651 AD49C8F26BD8B >. Acesso em 24 Abr. 2020.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. ENV/JM/MONO(2005)14. **OECD series on testing and assessment number 34**. Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment. 2005. Dísponível em: < https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd-gd34.pdf>. Acesso em 24 Abr. 2020.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test no. 429.** Skin sensitization: local lymph node assay. 2010. Disponível em: < https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd-tg429-2010.pdf >. Acesso 24 Abr. 2020.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test nº. 404**. Acute dermal irritation/corrosion. 2015a. Disponível em: < https://read.oecdilibrary.org/environment/test-no-404-acute-dermal-irritation-corrosion_9789264242678en#page1> > Acesso em 10 Mar. 2020. ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test nº. 430**. *In vitro* skin corrosion: transcutaneous electrical resistance test method (TER). 2015b. Disponível em: < https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-430-in-vitro-skincorrosion-transcutaneous-electrical-resistance-test-method-ter_9789264242739-en >. Acesso em 02 Maio 2020.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test no. 435**. *In vitro* membrane barrier test method for skin corrosion. 2015c. Disponível em: < https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264242791-

en.pdf?expires=1587780473&id=id&accname=guest&checksum=7B82115700067D74E1D2 7C7A0663B764> Acesso em 24 Abr. 2020.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. ENV/JM/MONO(2015)26. Joint meeting of the chemicals committee and the working party on chemical, pesticides and biotechnology. Performance standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* reconstructed human epidermis (RHE) test methods for skin corrosion testing as described in TG 431. 2015d. Disponível em: < http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2015)26&doclanguage=en >. Acesso em 10 Mar. 2020.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. ENV/JM/MONO(2015)27. Joint meeting of the chemicals committee and the working party on chemical, pesticides and biotechnology. Performance standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* reconstructed human epidermis (RHE) test methods for skin irritation testing as described in TG 439. 2015e. Disponível em: < http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2 015)27&doclanguage=en >. Acesso em 10 Mar. 2020.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test nº. 489**. *In vivo* mammalian alkaline comet assay. 2016. Disponível em: < https://www.oecdilibrary.org/docserver/9789264264649-

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test no. 402**. Acute dermal toxicity: fixed dose procedure. 2017. Disponível em: < https://www.oecdilibrary.org/docserver/9789264070585-

en.pdf?expires=1587781028&id=id&accname=guest&checksum=12C5D5E5F8A472835D44 F7B893472EBF >. Acesso em 24 Abr. 2020.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test no. 439**. In vitro skin irritation: reconstructed human epidermis test method. 2019a. Disponível em: < https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-439-in-vitro-skin-irritationreconstructed-human-epidermis-test-method_9789264242845-en > Acesso em: 29 Out. 2019.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test no. 431**. In *vitro skin* corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method. 2019b. Disponível em: < https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-431-in-vitro-skincorrosion-reconstructed-human-epidermis-rhe-test-method_9789264264618-en > Acesso em 10 Nov. 2019.

PARK, E.; LEE, G.; SHIM, J.; CHO, M.; LEE, B.; KIM, Y.; KIM, J.; KIM, Y.; KIM, D. Comparison of the toxicity of aluminum oxide nanorods with different aspect ratio. **Archieves of Toxicology**, New York, v.89, p.1771-1782, 2015.

PEDROSA, T. N.; CATARINO, C. M.; PENNACCHI, P. C.; ASSIS, S. R.; GIMENES, F.; CONSOLARO, M. E. L.; BARROS, S. B. M.; MARIA-ENGLER, S. S. A new reconstructed human epidermis (RHE) for *in vitro* skin irritation testing. **Toxicology In Vitro**, Oxford, v.42, p.31-37, 2017.

PINA, C. **José de Alencar; Guia Estudo**. 2019. Disponível em < https://www.guiaestudo.com.br/jose-de-alencar >. Acesso em: 18 Maio 2020.

POUMAY, Y.; DUPONT, F.; MARCOUX, S.; LECLERCQ-SMEKENS, M.; HÉRIN, M.; COQUETTE, A. A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in *in vitro* studies. **Archieves of Dermatological Research**, Germany, v. 296, p.203-211, 2004.

POUMAY, Y.; COQUETTE, A. Modelling the human epidermis *in vitro*: tools for basic and applied research. Archives of Dermatological Research, Germany, v. 298, p. 361-369, 2007.

PRAY, L. A. DNA replication and causes of mutation. **Nature Education**, v. 1, n. 1, p. 214, 2008. Disponível em: < https://www.nature.com/scitable/topicpage/dna-replication-and-causes-of-mutation-409/ >. Acesso em: 27 Maio 2020.

PRESGRAVE, O. A. F. The need for the establishment of a Brazilian centre for the validation of alternative methods (BraCVAM). **ATLA**, New York, v. 36, p.705-708, 2008.

RADHIKA, P.; JYOTHI, Y. A review on genotoxicity, its molecular mechanisms, regulatory testing in drug development process. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, Panchkula, n. 5, p. 4054-4069, 2019.

RAI, Y.; RICHA, P.; KUMARI, N.; SAH, D. K.; PANDEY, S.; KALRA, N.; SONI, R.; DWARAKANATH, B. S.; BHATT, A. N. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. **Scientific Reports**, London, v. 9, p. 1-15, 2018.

REISINGER, K.; BLATZ, V.; BRINKMANN, J.; DOWNS, T. R.; FISCHER, A.; HENKLER, F.; HOFFMANN, S.; KRUL, C.; LIEBSCH, M.; LUCH, A.; PIROW, R.; REUS, A. A.; SCHULZ, M.; PFUHLER, S. Validation of the 3D skin comet assay using full thickness skin models: transferability and reproducibility. **Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental**, Amsterdam, v. 827, p. 27-41, 2018.

REUS, A. A.; REISINGER, K.; DOWNS, T. R.; CARR, G. J.; ZELLER, A.; CORVI, R.; KRUL, C. A. M.; PFUHLER, S. Comet assay in reconstructed 3D human epidermal skin models- investigation of intra- and inter- laboratory reproductibility with coded chemicals. **Mutagenesis**, Oxford, v.28, n.6, p.709-720, 2013.

RUKWIED, R. Physiology of the scalp. Hautarzt, Alemanha, v. 68, n. 6, p.431-436, 2017.

RUSSELL, W.M.S.; BURCH, R.L. **The principles of humane experimental technique**. 1959. Disponível em: < http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc >. Acesso em 31 Maio 2020.

SANÍA, A. C.; CARREÑO, A. S. Analysis of cosmetics products. 2007. Amsterdam: Elsevier ed., 487p.

SANTOS-FILHO, E. X.; SILVA, A. C. G.; ÁVILA, R. I.; BATISTA, A. C.; MARRETO, R. N.; LIMA, E. M.; OLIVEIRA, C. M. A.; MENDONÇA, E. F.; VALADARES, M. C. Chemopreventive effects of FITOPROT against 5-fluorouracil- induced toxicity in HaCaT cells. **Life Sciences**, Oxford, v. 193, p.300-308, 2018.

SCCS/1436/11: Scientific committee on consumer safety (SCCS)opinion on Basic red 51 COLIPA B116 12th plenary meeting of 20 September2011. Disponível em: < http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_067.pdf >. Acesso em: 25 Maio 2020.

SCCS/1537/14. Scientific committee on consumer safety opinion on Basic blue 99 COLIPA C059. Submission III, opinion adopted in 7 th plenary meeting of 23 september 2014. Disponível em: < http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_067.pdf >. Acesso em: 25 Maio 2020.

SCCS/1564/15. The SCCS notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation 9th revision. 2016. Disponível em: < https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_190.pdf >. Acesso em: 28 Abr. 2020.

SCCS/1585/17. Scientific committee on consumer safety opinion on Basic Blue 99 Colipa C059 opinion adopted on 6 june 2017. 2017. Disponível em: < https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs _o_205.pdf >. Acesso em: 25 Maio 2020.

SCHOOP, V.; FUSENING, N. E.; MIRANCEA, N. Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. **Journal of Investigative in Dermatology**, New York, v. 112, n.3, p. 343-352, 1999.

SCHWEIZER, J.; BOWDEN, P. E.; COULOMBE, P. A.; LANGBEIN, L.; LANE, E. B.; MAGIN, T. M.; MALTAIS, L.; OMARY, M. B.; PARRY, D. A. D.; ROGERS, M. A.; WRIGHT, M. W. New consensus nomenclature for mammalian keratins. Journal of Cell Biology, New York, v. 174, n.2, p. 169-174, 2006.

SMEDEN, J. V.; BOUWSTRA, J. A. Stratum corneum lipids: their role for the skin barrier function in healthy subjects and atopic dermatitis patients. **Current Problems in Dermatology**, Switzerland, v.49, p.8-26, 2016.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA. **Cirurgia peniana**: fimose e hipospádia. 2006. Disponível em: < https://diretrizes.amb.org.br/_BibliotecaAntiga/cirurgia-peniana-fimose-e-hipospadia.pdf > Acesso em: 25 Maio 2020.

SUN, T.; JACKSONA, S.; HAYCOCK, J. W.; MACNEIL, S. Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.122, p.372-381, 2006.

TAN, J. J. Y.; COMMON, J. E.; WU, C.; HO, P. C. L.; KANG, L. Keratinocytes maintains compartimentalization between dermal papilla and fibroblasts in 3D heterotypic tri cultures. **Cell Proliferation**, Hoboken, v. 52, n.5, p. 1-11, 2019.

TARFUT-CARDONA, Y.; SUARES-ROCHA, P.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A. Cytotoxic and genotoxic effects of two hair dyes used in the formulation of black color. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.86, p.9-15, 2015.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, Hoboken, v.35, p.206-221, 2000.

TURAN-ZITOUNI, G.; YURTTAŞ, L.; TABBI, A.; ÇIFTÇI, G. A.; TEMEL, H. E.; KAPLANCIKLI, Z. A. New thiazoline-tetralin derivatives and biological activity evaluation. **Molecules**, Switzerland, v.23, n.135, p.1-15, 2018.

UNITED NATIONS. GLOBALLY HARMONIZED SYSTEM OF CLASSIFICATION AND LABELLING OF CHEMICAL (GHS). **8th revised edition**. 2018. Available in: < https://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev08/ST-SG-AC10-30-Rev8e.pdf >. Access on Mar 10, 2020.

VENUS, M.; WATERMAN, J.; McNAB, I. Basic physiology of the skin. **Surgery**, New York, v. 29, n. 10, p. 471-474, 2011.

VINEIS, P.; PIRASTU, R. Aromatic amines and cancer. Cancer Causes & Control, Dordrecht, v.8, n.3, p.346-355, 1997.

WARD, E. M.; SABBIONI, G.; DE BORD, D.G.; TEASS, A.W.; BROWN, K. K.; TALASKA, G. G.; ROBERTS, D.R.; RUDER, A.M.; STREICHER, R.P. Monitoring of aromatic amine exposures in workers at a chemical plant with a known bladder cancer excess. **Journal of the National Cancer Institute**, Cary, v.88, n.15, p.1046-1052, 1996.

WASHIO, K.; IJUIN, K.; FUKUNAGA, A.; NAGAI, H.; NISHIGORI, C. Contact anaphylaxis caused by basic blue 99 in hair dye. **Contact Dermatitis**, Malden, v. 77, p. 116-123, 2017.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, London, v. 171, p. 737-738, 1953

WEYERMANN, J.; LOCHMANN, D.; ZIMMER, A.; A pratical note on the use of cytotoxicity assays. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 288, n.2, v. 369-376, 2005.

WHITAKER, R. M.; CORUM, D.; BEESON, C. C.; SCHNELLMANN, R. G. Mitochondrial biogenesis as a pharmacological target: a new approach to acute and chronic diseases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 56, p.229-249, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO guidelines on hand hygiene in health care.** 2009. Disponível em: < http://www.who.int/gpsc/5may/tools/9789241597906/en/ > Acesso em 25 Maio 2020.

YOUSEF, H.; ALHAJJ, M.; SHARMA, S. **Anatomy, skin (intergument), epidermis**, 2017. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/#_NBK470464_pubdet_> Acesso em 25 Set. 2020.

ZANONI, T.B.; TIAGO, M.; FAIÃO-FLORES, F.; BARROS, S.B. de M.; BAST, A.; HAGEMAN, G.; OLIVEIRA, D.P. de; MARIA-ENGLER, S.S. Basic red 51, a permited semi-

permanent hair dye, is cytotoxic to human keratinocytes (HaCaT). **Toxicology Letters**, Clare, v.227, p.139-149, 2014.

ZANONI, T. B.; HUDARI, F.; MUNNIA, A.; PELUSO, M.; GODSCHALK, R. W.; ZANONI, M. V. B.; DEN HARTOG, G. J. M.; BARROS, S. B. M.; MARIA-ENGLER, S. S.; HAGEMAN, G. J.; OLIVEIRA, D. P. The oxidation of p-phenylenediamine, na ingrediente used for permanente hair dyeing purposes, leads to the formation of hidroxyl radicals: oxidative stress and DNA damage in human immortalized keratinocytes. **Toxicology Letters**, Clare, v.239, p.194-204, 2015.

ZANONI, T. B.; PEDROSA, T. N. CATARINO, C. M.; SPIEKSTRA, S. W.; OLIVEIRA, D. P.; HARTOG, G. D.; BAST, A.; HAGEMANN, G.; GIBBS, S.; BARROS, S. B. M.; MARIA-ENGLER, S. S. Allergens of permanente hair dyes induces epidermal damage, skin barrier loss IL-1 α increase in epidermal *in vitro* model. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 112, p. 265-272, 2017.

ZHOU, T.; HU, Y.; WANG, Y.; SUN, C.; ZHONG, Y.; LIAO, J.; WANG, G. Fine particulate matter (PM 2.5) aggravates apoptosis of cigarette-inflamed bronchial epithelium in vivo and *in vitro*. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 248, p. 1-9, 2019.

ANEXOS

ANEXO

Anexo A- Comprovação da submissão do artigo

03/06/2020

Gmail - Track your co-authored submission to Chemico-Biological Interactions



Camila Mini <camilaamini@gmail.com>

Track your co-authored submission to Chemico-Biological Interactions

Chemico-Biological Interactions <EviseSupport@elsevier.com> Responder a: EviseSupport@elsevier.com Para: camilaamini@gmail.com 3 de junho de 2020 13:52

Dear Mrs Mini,

Submission no: CHEMBIOINT_2020_873 Submission title: IMMORTALIZED EQUIVALENT HUMAN EPIDERMIS AS A PLATFORM TO EVALUATION HAIR DYES TOXICITY: EFFICIENCY COMPARISON BETWEEN 3D AND MONOLAYER CULTURE Corresponding author: Professor Danielle Palma de Oliveira Listed co-author(s): Mrs Camila Mini, Dr Daniel Dorta, Dr Silvya Stuchi Maria-Engler

Professor Palma de Oliveira has submitted a manuscript to Chemico-Biological Interactions and listed you as a coauthor. This email is to let you know we will be in contact with updates at each decision stage of the submission process.

The link below takes you to a webpage where you can sign in to our submission system using your existing Elsevier profile credentials or register to create a new profile. You will then have the opportunity to tailor these updates and view reviewer and editor comments once they become available.

http://www.evise.com/profile/api/navigate/CHEMBIOINT?resourceUrl=%2Fco-author%2F%3Fdgcid%3Dinvite_email_ coauthoroutreach00092797%23%2FCHEMBIOINT%2Fsubmission%2FCHEMBIOINT_2020_873&email= camilaamini@gmail.com&firstName=Camila&surname=Mini&country=Brazil&institution=Faculty+of+Pharmaceutical+ Sciences+of+Ribeir%C3%A3o+Preto-+Laboratory+of+Ecotoxicology+and+Human+ Toxicology%2C+University+of+S%C3%A3o+Paulo&title=Mrs

If you are not a co-author of this manuscript, please contact Researcher Support at: https://service.elsevier.com

Thank you very much for your submission and we will be in touch as soon as we have any news to share.

Chemico-Biological Interactions

If you do not wish to receive further update emails on your co-authored submission, you can unsubscribe via this link:

http://www.evise.com/co-author/#/CHEMBIOINT/unsubscribe/camilaamini@gmail.com/-Nw8wStFK4FywabnjW8uOh34ghiKq1ZKD-cn37JqcPz8bJlj93JILLawW5qWJoQ8nzWT0md7DwfTkQaxkbAaaQ