

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Avaliação da sensibilização cutânea de filtros solares por métodos
*in vitro***

Carolina Gomes Benevenuto Moreira

Ribeirão Preto
2017

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Avaliação da sensibilização cutânea de filtros solares por métodos
*in vitro***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientada: Carolina Gomes Benevenuto Moreira

Orientadora: Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 24/02/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2017

MOREIRA,
C.G.B.

**Avaliação da sensibilização cutânea de filtros solares por
métodos *in vitro***

Espaço de 2,5 cm
reservado para
etiqueta de
localização da
biblioteca

DOUTORADO
FCFRPUSP
2017

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.

Moreira, Carolina Gomes Benevenuto

Avaliação da sensibilização cutânea de filtros solares por métodos *in vitro*. Ribeirão Preto, 2017.

124p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Cordeiro, Lorena Rigo Gaspar

1. Filtros solares. 2. Sensibilização cutânea. 3. Métodos alternativos ao uso de animais. 4. Pele reconstituída.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Carolina Gomes Benevenuto Moreira

Título do trabalho: Avaliação da sensibilização cutânea de filtros solares por métodos *in vitro*.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador(a): Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

A **Jesus**, por sempre caminhar ao meu lado.

Aos meus pais, **Aparecido** e **Bárbara**, e ao meu irmão **Rodolfo**, pelo amor que não tem fim.

Ao meu amor, companheiro e marido, **Paulo**, pelo seu amor e por dividirmos nossos sonhos.

À toda minha **família**, especialmente aos meus queridos avós, vovó Enez, vovô Pedro, vovó Antônia e vovô Celso (*in memoriam*), por sempre trazerem doçura à minha vida.

A todos os **amigos**, pelo apoio, incentivo e companheirismo.

A todos aqueles que me apoiaram, incentivaram ou que me trouxeram o brilho dos olhos.

A todas as **crianças** que sonham em ser cientistas.

Agradecimento Especial

À minha orientadora, Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro, por seu entusiasmo, comprometimento e solicitude em todos os momentos e por ser um exemplo de coragem e excelência.

Agradecimentos

Às amigas do Tecnoprot, **Camila, Larissa, Juliana, Renata, Karina, Karen, Marcela, Gabriela**, por todo o apoio e companheirismo durante o doutorado.

À **Profa Silvy Stuchi Maria-Engler** e à toda a sua equipe, pela parceria e pelo estágio.

À **Profa Sarah Hedtrich** e à toda a sua equipe, especialmente à doutoranda **Leonie Wallmeyer**, pela oportunidade de realização do estágio BEPE.

Às funcionárias da secretaria de pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, **Rosana dos Santos Florêncio** e **Eleni Angeli Passos**, por toda a ajuda a realização deste trabalho.

A todos os **professores** da FCFRP-USP, que contribuíram para a minha formação e aos professores que de alguma forma colaboraram para a realização desse trabalho.

A todos os **funcionários** da FCFRP-USP, que colaboraram para a realização desse trabalho.

A todos os que, de alguma forma, colaboraram para a concretização deste trabalho.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**, ao **CNPq** e à **FAPESP (Processo de Doutorado 2013/01219-6 e de BEPE 2015/08189-0)**, pelo apoio financeiro.

*“Se, porém, algum de vós
necessita de sabedoria,
peça-a a Deus, que a todos
dá liberalmente e nada lhes
impropera; e ser-lhe-á
concedida”. Tiago 1:5*

RESUMO

MOREIRA, C.G.B. **Avaliação da sensibilização cutânea de filtros solares por métodos *in vitro***. 2017. 124f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A dermatite de contato alérgica é considerada uma doença complexa e já é estimado que atinja 15-20% da população. Dentre os ingredientes cosméticos, os que representam maior risco para o desenvolvimento de alergias de contato são fragrâncias, conservantes e corantes capilares, sendo que os filtros solares podem ser considerados alérgenos emergentes. Tradicionalmente, a sensibilização cutânea, primeira etapa da dermatite de contato alérgica, era avaliada em modelos animais, tais como o LLNA - Ensaio do linfonodo local murino. Entretanto a sétima emenda da diretiva europeia (Diretiva 2003/15/CE), que resultou no completo banimento dos ensaios em animais para ingredientes e produtos cosméticos, a partir de 2013 na União Europeia impulsionou o desenvolvimento de muitos métodos *in vitro*, bem como o aceite da validação de três métodos para sensibilização pela OECD. Por outro lado, até o momento, não é possível a substituição dos ensaios de sensibilização realizados em animais por um único método *in vitro* alternativo, bem como não há um consenso sobre uma estratégia integrada para a identificação de substâncias sensibilizantes. Nesse sentido, os modelos de pele reconstituída podem ser utilizados para tal finalidade, uma vez que permitem que diversas etapas da sensibilização cutânea sejam avaliadas, bem como permitem o uso de substâncias lipofílicas. Assim, o presente estudo apresenta grande importância, pois avaliou a sensibilização cutânea de filtros solares por métodos *in vitro*. Para isso, na primeira etapa, os filtros solares avobenzona e benzofenona-3 foram submetidos ao ensaio de irritação cutânea em modelo de pele reconstituída, com a quantificação de viabilidade celular e liberação de IL-1 α . A seguir, foi avaliada a sensibilização cutânea desses filtros solares, incluindo o octocrileno, através do ensaio *in chemico* DPRA, que analisa a depleção dos peptídeos cisteína e lisina, e dos modelos de pele contendo ou não linfócitos T, através da quantificação de viabilidade celular e da liberação de IL-6, IL-8 e IL-18. Foram então avaliadas a fototoxicidade e a fotossensibilização cutânea após exposição dos modelos à radiação UVA. Os resultados demonstraram que os filtros solares não foram considerados irritantes, nem sensibilizantes cutâneos nos ensaios propostos. O modelo de pele contendo linfócitos T associado à avaliação da liberação de IL-18 foi considerado o mais adequado e promissor para a avaliação da sensibilização cutânea. A avobenzona não foi considerada fototóxica, entretanto foi considerada fotossensibilizante nos modelos de pele. Finalizando, o presente trabalho possui grande relevância e inovação pois reúne resultados obtidos com métodos alternativos ao uso de animais para a avaliação da sensibilização cutânea, bem como desfechos que estão interligados a ela, como a irritação cutânea, e ainda, os processos fotoinduzidos, tais como a fototoxicidade e a fotossensibilização cutânea. O presente trabalho trouxe ainda como novas ferramentas a inclusão dos linfócitos T em modelos de pele na avaliação da sensibilização cutânea, bem como o uso de modelos de pele na avaliação da fotossensibilização cutânea, a qual está frequentemente associada a ensaios de cultura de células em monocamadas.

Palavras-chave: Filtros solares. Sensibilização cutânea. Métodos alternativos ao uso de animais. Pele humana reconstituída.

ABSTRACT

MOREIRA, C.G.B. **Evaluation of skin sensitization potential of UV filters by *in vitro* methods.** 2017. 124f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Allergic contact dermatitis is considered a complex disease and it is estimated that it reaches 15-20% of population. Among cosmetic ingredients, fragrances, preservatives and hair dyes are the most frequently cause of cosmetic allergy and UV filters can be considered emergent allergens. Traditionally, skin sensitization, the first step of allergic contact dermatitis, was assessed by animal testing, such as LLNA – Local lymph node assay. However, in the European Union the 7th Amendment to the Cosmetics Directive (Directive 20003/15/CE) resulted in the complete ban of animal testing for cosmetic products and ingredients in 2013. This legislation stimulated the development of many *in vitro* methods and OECD accepted the validation of three of them for sensitization. However, it is not possible to replace animal testing for skin sensitization assessment with only one *in vitro* method and there is no consensus about an integrated strategy for the identification of sensitizers. This way, the reconstructed skin models can represent a good option, once they allow the assessment of many steps of skin sensitization, as well as the assessment of lipophilic chemicals. Thus, the present study presents a great relevance, once it assessed skin sensitization of UV filters by *in vitro* methods. For this purpose, in the first step, the UV filters avobenzone and benzophenone-3 were submitted to the assessment of skin irritation in reconstructed skin models, by the quantification of the cell viability and the release of IL-1 α . Then, the skin sensitization of these UV filters was assessed, including octocrylene, by the *in chemico* assay DPRA, through the depletion of the cysteine and lysine peptides, and also by the reconstructed skin models containing or not T cells, through the quantification of the cell viability and the release of IL-6, IL-8 and IL-18. Phototoxicity and Photosensitization were assessed after the exposure of the skin models to UVA radiation. Results showed that UV filters were not considered irritants nor sensitizers in the proposed methods. The assay involving the skin model with T cells with the release of IL-18 was considered the most suitable in the assessment of skin sensitization. Avobenzone was not considered phototoxic, however it was considered photosensitizer in the skin models. Finally, the present study has a great relevance and innovation, once it combines results obtained in alternative methods to animal testing for the assessment of skin sensitization, the assessment of its related endpoints, such as skin irritation and also photoinduced processes such as phototoxicity and photosensitization. The present study also presents new tools, such as the inclusion of T cells in skin models for the skin sensitization assessment as well as the skin models for skin photosensitization, which is frequently associated with monolayer cell culture assays.

Keywords: UV filters. Skin sensitization. Alternative methods to animal testing. Reconstructed skin models.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de deslocalização dos aminobenzoatos. Fonte: SHAATH, 2010.....	12
Figura 2 - Mecanismo de deslocalização dos salicilatos. Fonte: SHAATH, 2010....	13
Figura 3 - Mecanismo de deslocalização dos cinamatos. Fonte: SHAATH, 2010....	14
Figura 4 - Mecanismo de deslocalização das benzofenonas. Fonte: SHAATH, 2010.....	14
Figura 5 - Fotoisomerização dos derivados de cânfora. Fonte: SHAATH, 2010.....	15
Figura 6 - Fórmula estrutural do bemotrizinol. Fonte: WANG; LIM, 2016.....	16
Figura 7 - Fórmula estrutural do octocrileno. Fonte: SIGMA-ALDRICH, 2017.....	16
Figura 8 - O tautomerismo ceto-enólico da avobenzona. Fonte: WANG; LIM, 2016.....	17
Figura 9 - Diferentes processos envolvidos na fotoestabilidade da avobenzona. Fonte: Adaptado de LHIAUBET-VALLET, 2010.....	18
Figura 10 - Modelo de pele reconstituída utilizada no ensaio de irritação cutânea: tamanho real; corte histológico com aumento de 10x; aumento de 20x; aumento de 40x.....	54
Figura 11 - Modelo de pele reconstituída utilizada no ensaio de irritação cutânea: tamanho real, corte histológico com aumento de 10x, aumento de 20x e aumento de 40x. Modelos tratados com (A) dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% e (B) dinitroclorobenzeno (DNCB) 10%.....	54

- Figura 12 - Modelo de pele reconstituída utilizada no ensaio de irritação cutânea: tamanho real, corte histológico com aumento de 10x, aumento de 20x e aumento de 40x. Modelos tratados com (A) veículo benzoato de alquila (BA); (B) avobenzona (AVO) 10% e (C) benzofenona-3 (BZF-3) 10%.... 55
- Figura 13 - Viabilidade celular por meio do método de MTT (valores absolutos de absorbância). NT: não tratado ou tratado com: veículo benzoato de alquila (VE), dodecil sulfato de sódio (SDS - irritante), dinitroclorobenzeno (DNCB - sensibilizante), avobenzona (AVO) e benzofenona-3 (BZF-3) Barras: média \pm SEM (n=2-3)..... 56
- Figura 14 - Liberação de IL-1 α (pg/mL) em modelos de pele. NT: não tratado ou tratado com: veículo benzoato de alquila (VE), dodecil sulfato de sódio (SDS - irritante), dinitroclorobenzeno (DNCB - sensibilizante), avobenzona (AVO) e benzofenona-3 (BZF-3) Barras: média \pm SEM (n=2-3)..... 57
- Figura 15 - Curvas padrão para os peptídeos cisteína (A) e lisina (B)..... 59
- Figura 16 - Cortes histológicos para os modelos de pele sem linfócitos T (A) NT: não tratado e tratado com (B) VE: veículo, (C) SDS: dodecil sulfato de sódio, (D) DNCB: dinitroclorobenzeno, (E) AVO: avobenzona, (F) BZF-3: benzofenona-3 e (G) OCT: octocrileno. Aumento de 100x..... 63
- Figura 17 - Cortes histológicos para os modelos de pele contendo linfócitos T (A) NT: não tratado e tratado com (B) VE: veículo, (C) SDS: dodecil sulfato de sódio, (D) DNCB: dinitroclorobenzeno, (E) AVO: avobenzona, (F) BZF-3: benzofenona-3 e (G) OCT: octocrileno. As setas indicam os linfócitos T. Aumento de 100x..... 64
- Figura 18 - Liberação de IL-6 em modelos de pele (A) e em modelos de pele contendo linfócitos T (B). NT: não tratado ou tratado com: veículo

- benzoato de alquila (VE), dodecil sulfato de sódio (SDS - controle negativo: irritante), dinitroclorobenzeno (DNCB - controle positivo: sensibilizante), avobenzona (AVO), benzofenona-3 (BZF-3) e octocrileno OCT. Barras: média \pm SEM (n=2-3)..... 68
- Figura 19 - Liberação de IL-8 em modelos de pele (A) e em modelos de pele contendo linfócitos T (B). NT: não tratado ou tratado com: veículo benzoato de alquila (VE), dodecil sulfato de sódio (SDS - controle negativo: irritante), dinitroclorobenzeno (DNCB - controle positivo: sensibilizante), avobenzona (AVO), benzofenona-3 (BZF-3) e octocrileno OCT. Barras: média \pm SEM (n=2-3)..... 71
- Figura 20 - Liberação de IL-18 em modelos de pele (A) e em modelos de pele contendo linfócitos T (B). NT: não tratado ou tratado com: veículo benzoato de alquila (VE), dodecil sulfato de sódio (SDS - controle negativo: irritante), dinitroclorobenzeno (DNCB - controle positivo: sensibilizante), avobenzona (AVO), benzofenona-3 (BZF-3) e octocrileno OCT. Barras: média \pm SEM (n=2-3)..... 75
- Figura 21 - Fototoxicidade no modelo de pele reconstituída. NT: não tratado ou tratado com: VE: veículo benzoato de alquila, CETO: cetoprofeno (controle positivo: fototóxico e fotossensibilizante), BERG: óleo de bergamota (controle positivo: fototóxico) e AVO: avobenzona. Barras: média \pm SEM (n = 2). De acordo com o modelo de predição, uma redução na viabilidade maior que 30% (Δ) indica fototoxicidade..... 77
- Figura 22 - Cromatografia gasosa do óleo de bergamota Sigma–Aldrich..... 78
- Figura 23 - Ensaio de fotossensibilização cutânea em modelos de pele: razão entre a produção de IL-18 e a viabilidade celular (n=2-3). Os valores (%)

indicados no gráfico são referentes à variação entre o tecido não irradiado e irradiado.....	81
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Filtros solares aprovados no Brasil. Fonte: SCHALKA et al., 2014.....	11
Tabela 2 –	Descrição das etapas realizadas no presente projeto. AC: aldeído cinâmico; SDS: dodecil sulfato de sódio; DNCB: dinitroclorobenzeno; CETO: Cetoprofeno; BERG: Óleo de bergamota; AVO: avobenzona; BZF-3: benzofenona-3; OCT: octocrileno.....	42
Tabela 3 –	Modelo de predição baseado na depleção dos peptídeos cisteína e lisina Fonte: OECD, 2015a.....	47
Tabela 4 –	Modelo de predição baseado na depleção do peptídeo cisteína. Fonte: OECD, 2015a.....	47
Tabela 5 –	Substâncias de proficiência recomendadas para a demonstração da proficiência técnica do DPRA (OECD 2015a). Fonte: OECD, 2015a. ¹ Dados fornecidos pela OECD, nos quais a predição foi baseada pelo LLNA (NATSCH et al., 2013). A potência <i>in vivo</i> foi derivada usando os critérios propostos pelo ECETOC (2003). ² A predição pelo DPRA deve ser considerada no âmbito da IATA, conforme descrito pela OECD (2015a). ³ Faixas determinadas pela OECD (2015a) em pelo menos 10 valores de depleção gerados por 6 laboratórios independentes.....	48
Tabela 6 –	Viabilidade Celular pelo ensaio de MTT (Absorbância) – Modelo de pele sem tratamento (NT) ou tratado com: o veículo benzoato de alquila (VE), dodecil sulfato de sódio (SDS), dinitroclorobenzeno (DNCB), avobenzona (AVO), benzofenona-3 (BZF-3). Resultados de absorbância absolutos e a porcentagem em relação ao modelo sem tratamento. (n=2 ou 3). a: viabilidade celular menor que 50%, em relação ao veículo.....	56

- Tabela 7 - Liberação de IL-1 α (pg/mL). Modelo de pele sem tratamento (NT) ou tratado com: o veículo benzoato de alquila (VE), dodecil sulfato de sódio (SDS), dinitroclorobenzeno (DNCB), avobenzona (AVO) e benzofenona-3 (BZF-3). *Os valores negativos foram considerados como “zero” para o cálculo da média.
b: aumento da liberação de IL-1 α em mais que 10x em relação ao veículo. 57
- Tabela 8 – Substâncias de proficiência testadas para o DPRA para CIS (n=3).
¹De acordo com a OECD TG 442C (2015a), valores negativos para a depleção foram considerados “0” para o cálculo da média.
²Dados fornecidos pela OECD TG 442C (2015a)..... 59
- Tabela 9 – Substâncias de proficiência testadas para o DPRA para LIS (n=3).
¹De acordo com a OECD TG 442C (2015a), valores negativos para a depleção foram considerados “0” para o cálculo da média.
²Dados fornecidos pela OECD TG 442C (2015a)..... 60
- Tabela 10 – Avaliação da sensibilização cutânea de filtros solares por meio do ensaio de depleção de peptídeos. Peptídeo contendo cisteína (CIS) e lisina (LIS) AC: aldeído cinâmico; DNCB: dinitroclorobenzeno; SDS: dodecil sulfato de sódio; AVO: avobenzona; BZF-3: benzofenona-3, OCT: octocrileno. DP: desvio padrão. Depleção negativa foi considerada como “0” no cálculo da média (OECD, 2015a) (n=3).
^A Depleção negativa foi considerada como “0” no cálculo da média (OECD, 2015a)..... 61
- Tabela 11 – Liberação de IL-6 em modelos de pele. NT: não tratado ou tratado com: veículo benzoato de alquila (VE), dodecil sulfato de sódio (SDS - controle negativo: irritante), dinitroclorobenzeno (DNCB - controle positivo: sensibilizante), avobenzona (AVO), benzofenona-3 (BZF-3) e octocrileno (OCT) (n=3)..... 66

- Tabela 12 – Liberação de IL-6 em modelos de pele contendo linfócitos T. NT: não tratado ou tratado com: veículo benzoato de alquila (VE), dodecil sulfato de sódio (SDS - controle negativo: irritante), dinitroclorobenzeno (DNCB - controle positivo: sensibilizante), avobenzona (AVO), benzofenona-3 (BZF-3) e octocrileno OCT (n=2)..... 67
- Tabela 13 – Liberação de IL-8 em modelos de pele. NT: não tratado ou tratado com: veículo benzoato de alquila (VE), dodecil sulfato de sódio (SDS - controle negativo: irritante), dinitroclorobenzeno (DNCB - controle positivo: sensibilizante), avobenzona (AVO), benzofenona-3 (BZF-3) e octocrileno OCT (n=3)..... 69
- Tabela 14 – Liberação de IL-8 em modelos de pele contendo linfócitos T. NT: não tratado ou tratado com: veículo benzoato de alquila (VE), dodecil sulfato de sódio (SDS - controle negativo: irritante), dinitroclorobenzeno (DNCB - controle positivo: sensibilizante), avobenzona (AVO), benzofenona-3 (BZF-3) e octocrileno OCT (n=2)..... 70
- Tabela 15 – Liberação de IL-18 em modelos de pele. NT: não tratado ou tratado com: veículo benzoato de alquila (VE), dodecil sulfato de sódio (SDS - controle negativo: irritante), dinitroclorobenzeno (DNCB - controle positivo: sensibilizante), avobenzona (AVO), benzofenona-3 (BZF-3) e octocrileno OCT (n=3).
a: viabilidade celular entre 5-50% relação ao veículo..... 73
- Tabela 16 – Liberação de IL-18 em modelos de pele contendo linfócitos T. NT: não tratado ou tratado com: veículo benzoato de alquila (VE), dodecil sulfato de sódio (SDS - controle negativo: irritante), dinitroclorobenzeno (DNCB - controle positivo: sensibilizante), avobenzona (AVO), benzofenona-3 (BZF-3) e octocrileno OCT (n=2).
a: viabilidade celular entre 5-50% relação ao veículo.
b: aumento maior que 1,6 vezes na produção de IL-18 em relação ao veículo..... 74

- Tabela 17 - Viabilidade celular por meio do método de MTT (valores absolutos de absorbância) para o ensaio de fototoxicidade em modelo de pele. NT: não tratado ou tratado com: VE: veículo benzoato de alquila, CETO: cetoprofeno (controle positivo: fototóxico e fotossensibilizante), BERG: óleo de bergamota (controle positivo: fototóxico) e AVO: avobenzona (n=2).
*Redução maior que 30 % em relação ao controle não irradiado..... 77
- Tabela 18 – Caracterização do óleo de bergamota Sigma–Aldrich por CG/MS. Conteúdo dos componentes fotoativos majoritários (%), MM = massa molecular (g/mol)..... 79
- Tabela 19 – Viabilidade celular e liberação de IL-18 obtidos no ensaio de fotossensibilização cutânea em modelos de pele (n=2-3)..... 80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrômetro
³ AVO ^K	Avobenzona na forma cetona no estado excitado tripleto
3T3 NRU PT	Teste de fototoxicidade por captação do vermelho neutro em fibroblastos murinos 3T3
AC	Aldeído cinâmico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOP	Vias de eventos adversos (<i>Adverse Outcome Pathways</i>)
ARE-Nrf2 luciferase	Ensaio ARE-Nrf2 luciferase na linhagem KeratinoSens
AVO	Avobenzona
AVO ^E	Avobenzona - tautômero enólico
AVO ^K	Avobenzona - tautômero cetona
BA	Benzoato de alquila
BERG	Óleo de bergamota
BMDBM	Butil metoxidibenzoilmetano
BPG	<i>British Photodermatology Group</i>
BZF-3	Benzofenona-3
CETO	Cetoprofeno
CG/MS	Cromatografia gasosa / espectrometria de massas
CIS	Cisteína
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm	Centímetro
COLIPA	<i>European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association</i>
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
Da	Dalton
DCA	Dermatite de contato alérgica

dm	Decímetro
DME	Dose mínima eritematosa
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMEnp	Dose mínima eritematosa na mesma pele quando desprotegida
DMEp	Dose mínima eritematosa em uma pele protegida por um protetor solar
DMP	Dose mínima pigmentária
DMPnp	Dose mínima pigmentária na mesma pele quando desprotegida
DMPp	Dose mínima pigmentária em uma pele protegida por um protetor solar
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNCB	2,4-dinitroclorobenzeno
DO	Densidade Óptica
DP	Desvio Padrão
DPRA	Ensaio de Depleção de Peptídeos (<i>Direct peptide reactivity assay</i>)
<i>E</i>	Isômero trans
EC	Concentração efetiva (<i>Effective concentration</i>)
ECVAM- EURL	<i>European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EROS	Espécies reativas do oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FPS	Fator de proteção solar
FPUVA	Fator de proteção UVA
g	Gramma
GPMT	<i>Guinea pig maximization test</i>
h	Hora
H3D-PT	Modelos de pele tridimensionais
h-CLAT	Human Cell Line Activation Test
HLA- DR	<i>Human leukocyte antigen D related</i>

HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRIPT	Ensaio humano de insulto repetido em patch (<i>Human repeated insult patch test</i>)
IATA	<i>Integrated Approach on Testing and Assessment</i>
ICDRG	<i>International Contact Dermatitis Research Group</i>
ICH	<i>International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use</i>
IL-18	Interleucina 18
IL-1 α	Interleucina 1 α
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
INCA	Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
J	Joule
KGM	Meio de crescimento de queratinócitos (<i>Keratinocyte growth médium</i>)
LIS	Lisina
LLNA	Ensaio do Linfonodo Local Murino (<i>Local Lymph Node Assay</i>)
mg	Miligrama
MGM-4	Meio de crescimento de melanócitos (<i>Melanocyte growth medium-4</i>)
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal (<i>Molecular histocompatibility complex</i>)
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MM	Massa molecular
mol	Mol
MPE	<i>Mean photo effect</i>
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio

mW	Miliwatt
n	Número de replicatadas
nm	Nanômetro
NT	Não tratado
OCT	Octocrileno
OECD	<i>Organisation for economic co-operation and development</i>
p	Peso
PA	Padrão analítico
PABA	Ácido para-aminobenzóico
PBS	Tampão fosfato (<i>Phosphate buffered saline</i>)
pg	Picograma
PM	Peso molecular
PPD	<i>Persistent pigment darkening</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SCCFNP	<i>Scientific Committee on Cosmetic Products and non-Food Products Intended For Consumers</i>
SCCS	<i>Scientific Committee on Consumer Safety</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SEM	Erro padrão da media (<i>Standard error of the mean</i>)
SI	Índice de estimulação (<i>Stimulation Index</i>)
TFA	Ácido trifluoroacético
TG	<i>Test Guideline</i>
UN GHS	United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
v	Volume
v/v	Volume / volume
VE	Veículo

VIS	Visível
Z	Isômero cis

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
λ	Comprimento de onda
CO ₂	Dióxido de carbono
%	Porcentagem
™	Trademark
$\lambda_{MÁX}$	Comprimento de onda máximo de absorção
Δ	Variación
\pm	Mais ou menos
¹ O ₂	Oxigênio singleto
f	Frequência
°C	Graus Cécius

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de tabelas.....	vii
Lista de abreviaturas e siglas.....	xi
Lista de símbolos.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1. A radiação solar e a pele.....	8
2.2 Filtros solares e a fotoproteção.....	10
2.3 Avaliação da performance de fotoprotetores.....	18
2.3.1 Estabilidade.....	18
2.3.2 Eficácia.....	19
2.3.3 Segurança	21
2.3.3.1 Processos não dependentes do sistema imunológico e não induzidos pela radiação UV: Irritação cutânea.....	22
2.3.3.2 Processos não dependentes do sistema imunológico, mas induzidos pela radiação UV: Fototoxicidade (fotoirritação)	23
2.3.3.3 Processos dependentes do sistema imunológico, mas não induzidos pela radiação UV: Sensibilização cutânea.....	25
2.3.3.4 Processos dependentes do sistema imunológico e induzidos pela radiação UV: Fotossensibilização cutânea.....	33
3. OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivo geral.....	36
3.2 Objetivo específico.....	36
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 Material.....	38

4.1.1	Matérias-primas e reagentes.....	38
4.1.2	Equipamentos e acessórios.....	39
4.2	Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP.....	40
4.3	Métodos.....	41
4.3.1	Ensaio de irritação cutânea <i>in vitro</i> utilizando modelo tridimensional de pele reconstituída.....	42
4.3.1.1	Modelo de pele reconstituída.....	43
4.3.1.2	Histologia.....	43
4.3.1.3	Ensaio de irritação cutânea	43
4.3.1.3.1	Exposição às substâncias teste.....	43
4.3.1.3.2	Ensaio de viabilidade celular por MTT ((brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio).....	44
4.3.1.3.3	Quantificação de IL-1 α por ELISA (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)....	44
4.3.2	Avaliação da sensibilização cutânea.....	45
4.3.2.1	Substâncias.....	45
4.3.2.2	Ensaio <i>in chemico</i> de depleção de peptídeos (<i>Direct Peptide Reactivity Assay - DPRA</i>)	45
4.3.2.2.1	Curva de padronização.....	45
4.3.2.2.2	Soluções de reação.....	45
4.3.2.2.3	Análise cromatográfica.....	46
4.3.2.2.4	Análise da depleção dos peptídeos.....	46
4.3.2.2.5	Ensaio de proficiência da técnica do DPRA.....	47
4.3.2.3	Avaliação da sensibilização cutânea nos modelos de pele reconstituída contendo ou não linfócitos T.....	48
4.3.2.3.1	Modelos de pele reconstituída.....	48
a.	histologia.....	49
b.	exposição às substâncias teste.....	49
c.	ensaio de viabilidade celular por MTT ((brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio).....	49
d.	quantificação das citocinas por ELISA.....	49
4.3.2.3.2	Modelos de pele reconstituída contendo linfócitos T.....	50
a.	histologia.....	50
b.	exposição às substâncias teste.....	50

4.3.3 Ensaio <i>in vitro</i> de fototoxicidade e fotossensibilização cutânea nos modelos de pele reconstituída.....	51
4.3.3.1 Modelos de pele reconstituída.....	51
4.3.3.2 Avaliação da fototoxicidade nos modelos de pele reconstituída: exposição às substâncias teste e irradiação.....	51
4.3.3.3 Avaliação da fotossensibilização nos modelos de pele reconstituída: exposição às substâncias teste, irradiação e ensaio de viabilidade celular.....	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1 Ensaio de irritação cutânea <i>in vitro</i> utilizando modelo tridimensional de pele reconstituída	54
5.1.1 Controle de qualidade histológico modelos de pele reconstituída.....	54
5.1.2 Ensaio de viabilidade celular por MTT ((brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio).....	55
5.1.3 Quantificação de IL-1 α por ELISA	57
5.2 Avaliação da sensibilização cutânea.....	58
5.2.1 Ensaio <i>in chemico</i> para a avaliação da sensibilização cutânea por depleção de peptídeos (DPRA).....	58
5.2.1.1 Ensaio de proficiência da técnica do DPRA.....	58
5.2.1.2 Ensaio de sensibilização cutânea das substâncias em estudo por DPRA.....	60
5.2.2 Ensaio <i>in vitro</i> para a avaliação da sensibilização cutânea nos modelos de pele reconstituída contendo ou não linfócitos T.....	62
5.2.2.1 Histologia.....	62
5.2.2.2 Quantificação de IL-6, IL-8 e IL-18 após exposição dos modelos de pele aos filtros solares.....	65
5.3 Avaliação da fototoxicidade nos modelos de pele reconstituída.....	76
5.3.1 Avaliações complementares do óleo de bergamota.....	78
5.4 Avaliação da fotossensibilização cutânea nos modelos de pele reconstituída.....	79
6. CONCLUSÕES.....	84
7. REFERÊNCIAS.....	87

APÊNDICES	102
ANEXOS.....	105

1. Introdução

A dermatite de contato alérgica é um tipo de reação de hipersensibilidade tardia (tipo IV), induzida por substâncias químicas reativas, chamadas haptenos, a qual é mediada por linfócitos T, sendo descrita como uma resposta inflamatória adaptativa após a exposição ao alérgeno químico (SMITH; HOTCHKISS, 2001; MOED et al., 2004; RUSTEMEYER et al., 2004).

Os haptenos, ou alérgenos químicos, são moléculas de baixo peso molecular que podem formar um complexo sensibilizante, uma vez ligado a uma proteína (WELTZIEN et al., 1996). Após o contato com esse complexo hapteno / proteína, o processo de sensibilização dérmica pode ser iniciado (SMITH; HOTCHKISS, 2001), sendo que vários fatores podem influenciar a capacidade de a substância agir como um sensibilizante de contato, incluindo a habilidade de penetrar na pele, de reagir com proteínas presentes na pele, bem como o reconhecimento do complexo substância / proteína pelo sistema imunológico.

Dentre as matérias-primas utilizadas em formulações cosméticas, as que representam maior risco para o desenvolvimento de alergias de contato são o níquel, as fragrâncias, os conservantes e os corantes capilares (THYSSEN et al., 2007). Entretanto, outras matérias-primas também vêm sendo cada vez mais relacionadas ao desenvolvimento de processos alérgicos cutâneos, como é o caso dos filtros solares (AVENEL-AUDRAN et al., 2010; NASH, 2006; SARASWAT, 2012).

Considerando que há uma crescente utilização de filtros solares em diversas formulações cosméticas e que os cosméticos em geral permanecem em contato com a pele por longos períodos de tempo, favorecendo as reações de sensibilização (SCHEMAN, 2000), os estudos acerca da reatividade dos filtros solares no produto final são de extrema importância, visando minimizar as reações de alergia para o consumidor.

Para a obtenção de uma formulação fotoprotetora eficaz, o formulador deve utilizar uma combinação de filtros UVB e UVA. Porém, apesar dos formuladores contarem com um grande número de filtros solares UVB, há poucos filtros solares UVA disponíveis no mercado, sendo que a avobenzona tem sido o mais utilizado, por possuir uma alta absorção no UVA. No entanto, tem sido relatado que essa substância, além de estar associada a processos fotoalérgicos, levando a dermatites de contato, também está relacionada ao desenvolvimento de processos de sensibilização (NASH, 2006).

Além disso, outros filtros solares estão cada vez mais relacionados ao desenvolvimento de alergias, como é o caso do octocrileno, que já foi descrito como um fotoalérgeno emergente (AVENEL-AUDRAN et al., 2010).

Dentre as benzofenonas, a benzofenona-3 é a mais empregada, sendo que dentre os filtros solares mais utilizados no mercado, esta substância é a que apresenta o maior número de relatos de fotodermatites (NASH, 2006).

Além disso, esses filtros solares contêm grupos funcionais com potencial de causar sensibilização cutânea, tais como carbonila α,β -insaturada no octocrileno, o precursor de o-alquil resorcinol na benzofenona-3 e a 1,3-dicetona na avobenzona (SUSHKO, 2012).

Considerando o aumento da incidência de dermatite de contato alérgica na população, novas abordagens no mapeamento das vias da sensibilização cutânea tem sido desenvolvidos (HARTUNG; CORSINI, 2013). Em 2012, a OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) lançou um programa para o desenvolvimento de estudos baseados nas vias de eventos adversos (AOP), com enfoque na descrição dos eventos chave sequenciais que levam a um determinado evento adverso. As AOPs são essenciais no desenvolvimento de estratégias integradas para a avaliação de risco em diferentes níveis de organização biológica, tais como haptização e/ou interação com células cutâneas ou imunológicas (OECD, 2012).

A AOP da sensibilização cutânea envolve a penetração do hapteno na pele, a ligação do hapteno a proteínas da pele, a estimulação de queratinócitos, a estimulação e a migração de células de Langerhans, bem como a estimulação dos linfócitos T *naïve* após a primeira exposição ao alérgeno (MEHLING et al., 2012). No caso de um segundo contato, o qual é considerado a segunda fase da dermatite de contato alérgica, são observadas respostas clínicas, tais como inflamação cutânea, induzidas pelos linfócitos T (MEHLING et al., 2012).

A identificação de substâncias como potenciais sensibilizantes esteve frequentemente vinculada aos testes em animais, sendo que o Ensaio do Linfonodo Local Murino (LLNA; OECD TG 429, 2010a) ainda é considerado o padrão ouro para esse desfecho, uma vez que esse teste é preciso no que diz respeito à relevância (capacidade preditiva) e à confiabilidade (reprodutibilidade dentro e entre laboratórios) em distinguir uma substância sensibilizante de uma substância não sensibilizante (KIMBER et al., 2002; BASKETTER; CADBY, 2004; GERBERICK et al., 2004). Entretanto, mesmo o LLNA apresenta algumas limitações, tais como resultados falso positivos para o irritante dodecil sulfato de sódio (SDS) (BASKETTER et al., 2009), taxas de falso positivo de 14 a 20%, bem como alta variabilidade quando realizado com diferentes veículos (HOFFMANN, 2015).

Nas últimas décadas, tem sido observado um grande empenho dos órgãos governamentais de saúde, das indústrias, bem como da comunidade científica para a redução geral do uso de animais de experimentação baseado no conceito dos 3R's, que representam o refinamento, redução e substituição (*Refine, Reduction e Replacement*), que tem como estratégia, uma

pesquisa racional minimizando o uso de animais e o seu sofrimento, sem comprometer a qualidade do trabalho científico que está sendo executado. Além disso, há uma preocupação acerca de erros relacionados aos estudos *in vivo* pré-clínicos, sendo que 95% de novas drogas falham em ensaios clínicos apesar de terem sido aprovados na fase pré-clínica (HARTUNG, 2013).

O Governo Federal, por meio da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, estabeleceu procedimentos para o uso científico de animais, criando o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, BRASIL, 2008) ligado ao Ministério da Ciência e Tecnologia e que apresenta como função, dentre outras, avaliar a introdução de técnicas alternativas que substituam a utilização de animais em ensino e pesquisa. A criação do CONCEA corrobora com as exigências dos Órgãos Governamentais Regulatórios de Saúde, tanto no Brasil (ANVISA) quanto no exterior, que necessitam da validação de metodologias confiáveis para a realização dos testes de segurança e eficácia de novos ingredientes e de formulações sem o uso de animais de experimentação.

Desde março de 2013, na União Europeia não é possível realizar ensaios para a determinação da sensibilização cutânea de ingredientes e produtos cosméticos em animais. Este banimento ocorreu gradualmente e teve grande impulso com a sétima emenda da diretiva europeia (Diretiva 2003/15/CE, EUROPEAN UNION, 2003), que levou ao desenvolvimento de diversos métodos alternativos ao uso de animais para esse desfecho e para outros.

Nesse sentido, três testes *in vitro* foram validados até agora para a sensibilização cutânea, o ensaio de Luciferase ARE-Nrf2 (*ARE-Nrf2 Luciferase Test Method* - KeratinoSens™ - OECD TG 442D 2015b), o ensaio de ativação de linhagem celular humana (*human Cell Line Activation Test* - h-CLAT – OECD TG 442E 2016) e o ensaio direto de reatividade com peptídeos (*Direct Peptide Reactivity Assay* - DPRA - OECD TG 442C 2015a). O DPRA tem o objetivo de mimetizar o modelo de haptênização proteica *in vitro*, quantificando a depleção de dois peptídeos sintéticos (uma cadeia lateral contendo uma única cisteína ou uma lisina, como alvo da reação) usando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Outros métodos têm sido desenvolvidos utilizando peptídeos, queratinócitos, células dendríticas, linfócitos T, especialmente utilizando modelos de epiderme ou de pele reconstituída para a avaliação da sensibilização cutânea (MEHLING et al., 2012; GIBBS et al., 2013; NATSCH et al., 2015, OECD, 2012).

Os modelos de pele mimetizam satisfatoriamente a pele humana *in vitro* e são muito utilizados para diversos ensaios, tais como ensaio de absorção cutânea (SCHAFER-KORTING et al., 2008), triagens toxicológicas (KEJLOVÁ et al., 2007; ALÉPÉE et al., 2014;

KANDÁROVÁ et al., 2004), ou ensaios de processos fisiopatológicos da pele humana (HONZKE et al., 2016; ALI et al., 2015; VAVROVA et al., 2014; DANSO et al., 2014). Eles permitem também que diversas etapas da via de eventos adversos da sensibilização cutânea sejam avaliadas, tais como a penetração cutânea, a interação com proteínas da pele e com queratinócitos. Além disso, é possível testar substâncias lipofílicas, devido ao estrato córneo presente nesses modelos.

Nesse sentido, os modelos de pele têm sido usados e adaptados para avaliar diversos desfechos, os quais podem se relacionar entre si. DOS SANTOS et al. (2011) demonstraram o papel claro da irritação cutânea na dermatite de contato alérgica, uma vez que existe uma correlação entre a força de um sensibilizante e seu potencial irritante (DOS SANTOS et al., 2011; SPIEKSTRA et al., 2009), o que evidencia a importância da avaliação da irritação cutânea durante a avaliação da sensibilização cutânea.

Em relação à maior proximidade com a pele humana, até agora, a maioria dos modelos de pele não contém nenhuma célula imunológica, o que representa uma limitação da sua aplicabilidade para, por exemplo, a identificação de alérgenos. Alguns grupos de pesquisa estão envolvidos no desenvolvimento de um modelo de pele reconstituída contendo um componente imunológico (MEHLING et al., 2012; FACY et al., 2005, GUIRONNET et al., 2001), o qual poderia abranger mais etapas da via de eventos adversos envolvidas na sensibilização cutânea (MEHLING et al., 2012). Entretanto, os modelos contendo células de Langerhans apresentaram limitações, tais como a manutenção dessas células nos modelos e sua migração por entre as camadas (FACY et al., 2005, GUIRONNET et al., 2001).

Recentemente, Van den Bogaard et al. (2014) descreveram a importância da comunicação entre queratinócitos e linfócitos T em um modelo de pele reconstituída para o estudo de doenças inflamatórias da pele. Eles observaram que essa interação tem um papel fundamental no desenvolvimento dessas doenças (VAN DEN BOGAARD *et al.*, 2014). A importância dessa interação também foi observada em um modelo de pele proposto por Wallmeyer *et al.* (submetido) para dermatite atópica. Dessa forma, um modelo de pele contendo linfócitos T poderia ultrapassar a dificuldade da inclusão de um componente do sistema imunológico em modelos pele para a sensibilização cutânea.

Vale ressaltar que durante a avaliação da segurança de produtos cosméticos, de acordo com a região e horário de aplicação da formulação cosmética, deve ser considerada uma potencial interação com a radiação UV e a produção de irritação, sensibilização, toxicidade ou carcinogenicidade fotoinduzidas (HAYDEN et al., 2003). Dessa forma, em relação aos filtros solares, a análise da sensibilização cutânea induzida pela interação com a luz, ou seja, a

fotosensibilização cutânea, representa papel fundamental na avaliação de segurança desses produtos.

Nesse sentido, em termos de substituição animal, Oeda *et al.* (2016) apresentaram alguns testes *in vitro* descritos na literatura para fotossensibilização cutânea, tais como a modificação do teste h-CLAT e o ensaio de ativação de células dendríticas (HINO *et al.*, 2008; HOYA *et al.*, 2009; KARSCHUK *et al.*, 2010). Apresentaram ainda ensaios ligados à produção de IL-18 por cultura de queratinócitos (GALBIATI *et al.*, 2014), o ensaio de apoptose utilizando queratinócitos HaCaT (KURITA *et al.*, 2007), o ensaio *in vitro* de foto-ligação à albumina sérica humana (LOVELL; JONES, 2000), além do ensaio baseado em mudanças de grupamentos tiol e amina de superfície celular de células THP-1 (OEDA *et al.* 2016). Entretanto, nenhum desses testes é realizado em modelos de pele, o que não permite a mimetização da função barreira da pele, bem como limita a utilização de substâncias lipofílicas, tais como filtros solares.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a sensibilização cutânea de filtros solares por métodos *in vitro*, o qual foi realizado por meio da integração de ensaios que avaliaram diversos desfechos relacionados à sensibilização cutânea. Foram realizados os ensaio de irritação cutânea *in vitro* em modelos de pele reconstituída, ensaios de sensibilização cutânea *in vitro* em modelos de pele contendo ou não linfócitos T e *in chemico*, por DPRA, bem como ensaios para esses processos após a exposição à luz, ou seja, fototoxicidade e fotossensibilização cutânea.

2. Revisão Bibliográfica

2 Revisão Bibliográfica

2.1. A radiação solar e a pele

O espectro eletromagnético emitido pelo Sol abrange uma enorme quantidade de comprimentos de onda, sendo que a radiação ultravioleta (UV) é um pequeno componente desse espectro, a qual é definida por comprimento de onda (λ) e frequência (f) (MATTS, 2006). Devido aos efeitos biológicos, a radiação UV é dividida em UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) e UVC (200-280 nm) (BRASIL, 2012b), sendo que aproximadamente 95 % da radiação UV que atinge a Terra é UVA e apenas 5 % da radiação é UVB (MILLER et al, 1998. PASTILA; LESZCZYNSKI, 2007).

O UVB penetra até camadas basais da epiderme e da superfície da derme, enquanto o UVA pode penetrar até camadas mais profundas, atingindo a derme reticular (DE LAAT et al., 1996). O UVB tem potencial 1000 vezes maior de causar eritema (vermelhidão) que o UVA (MAHMOUD et al., 2010; PARRISH; ZAYNOUN; ANDERSON, 1981). Já o UVA geralmente está associado ao bronzeamento e normalmente está mais relacionado que o UVB às mudanças ligadas ao fotoenvelhecimento, como perda da elasticidade da pele e formação de rugas (KOZMA; EIDE, 2014; NARAYANAN; SALADI; FOX, 2010).

O UVB pode danificar diretamente o DNA de queratinócitos, levando à formação de fotoprodutos diméricos entre as bases pirimidínicas adjacentes, sendo que os dois fotoprodutos mais comuns são o dímero de pirimidina ciclobutano e o fotoproduto 6-4 pirimidina-pirimidona (ICHIHASHI et al., 2003; KOBAYASHI et al., 2001).

O UVA danifica indiretamente o DNA, por meio da formação de radicais livres (ICHIHASHI et al., 2003), os quais são formados por com a participação dos cromóforos da pele (RUNGER; KAPPES, 2008; WONDRAK; JACOBSON; JACOBSON, 2006). Há principalmente a geração de espécies reativas do oxigênio (EROs), tais como o oxigênio singlete, o ânion superóxido e o radical hidroxila, que causam danos ao DNA e às membranas celulares, além de promovem carcinogênese e mudanças associadas ao fotoenvelhecimento (PATHAK; CARRARO, 1988). A interação dos EROS com o DNA também pode gerar fotoprodutos, tais como a formação da base 8-hidroxiguanina (EPE,1991).

Os danos ao DNA, causados direta ou indiretamente pela radiação UV são submetidos a um sistema de reparo (CLANCY, 2008). Entretanto, caso haja um reparo incorreto, podem haver mutações no DNA (CLANCY, 2008). Quando essas mutações afetam oncogenes e genes supressores de tumor, tais como o p53, há uma perda do controle do ciclo celular, com possível transformação de queratinócitos ou melanócitos que levam ao aparecimento de tumores (KRÄMER et al., 1990).

O gene supressor de tumor p53 permite tanto o reparo do DNA, quanto a apoptose da célula, quando o dano ao genoma é muito grande (HORNUNG, 2011). No entanto, no dano solar crônico é possível encontrar células contendo p53 mutante, bem como em queratoses actínicas, carcinoma basocelular e carcinoma espinocelular (MARROT; MEUNIER, 2008), levando à conclusão de que a radiação UV pode induzir mutações no gene supressor de tumor p53, conduzindo à iniciação do câncer de pele (BENJAMIN; ANANTHASWAMY, 2007).

Dessa forma, apesar da patogênese do câncer ser multifuncional, a radiação UV tem sido descrita como um colaborador relevante, por ser um carcinógeno potente (NARAYANAN; 2010; DIEPGEN; MAHLER, 2002; GILCHREST et al., 1999; PRESTON; STERN, 1992). Nesse sentido, é estimado que a radiação UV pode causar aproximadamente 65 % dos melanomas e 90 % dos cânceres tipo não-melanoma (ARMSTRONG; KRICKER, 1993; PLEASANCE et al., 2010).

Os cânceres de pele são comumente agrupados em duas categorias, melanoma e não melanoma, baseado na origem celular e nas características clínicas (INCA, 2017).

Segundo o INCA (Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva), o câncer de pele é o tipo de câncer mais frequente no Brasil, sendo que o câncer de pele não melanoma atinge 30 % dos tumores malignos registrados no país e pode ser dividido em carcinoma basocelular e o carcinoma epidermoide (INCA, 2017). A estimativa do INCA para novos casos em 2016 foi de 175.760 novos casos e 1.769 mortes (1,0 %) (INCA, 2017). Já o melanoma corresponde a 3 % das neoplasias malignas do órgão, sendo que a estimativa do INCA para novos casos em 2016 foi de 5.670 novos casos e 1.547 mortes (27,3 %) (INCA, 2017).

Diversos estudos têm mostrado que os cânceres de pele podem ser prevenidos reduzindo a exposição intencional ao UV e melhorando as estratégias de fotoproteção (WANG; LIM, 2016). Essas estratégias (WANG; LIM, 2016; SCHALKA et al., 2014) envolvem a não exposição solar entre 10:00 -15:00 h (devido à maior incidência de UVB), o uso de roupas e chapéus e procurar sombras.

Além disso, os protetores solares, quando usados corretamente, podem prevenir os cânceres de pele tipo melanoma (GREEN et al., 2011; DIFFEY et al., 2005) e não melanoma (IANNACONE et al., 2013). O uso adequado dos protetores solares como parte da estratégia da prevenção do câncer de pele inclui utilizar produtos com fator de proteção solar (FPS) acima de 30, proteção UVA de pelo menos 1/3 da proteção UVB, hidrorresistência quando necessário, produtos de preferência fotoestáveis, bem como aplicar a quantidade adequada, ou seja, 2 mg cm⁻² e reaplicar a cada duas horas (BRASIL 2012b, SCHALKA et al., 2014)

2.2 Filtros solares e a fotoproteção

Segundo LIM e DRAELLOS (2009), a história da fotoproteção começa com o descobrimento dos raios ultravioleta (UV), pelo alemão Ritter, em 1801. Em 1820, Home descobriu que a queimadura solar estava relacionada à exposição ao UV e não ao calor do Sol, como se pensava (LIM, DRAELOS, 2009). Começaram a surgir, então, estudos relacionados à fotoproteção, bem como a descoberta de substâncias precursoras dos atuais filtros solares, tais como o tanino (LIM, DRAELOS, 2009), o sulfato de quinino acidificado e a esculina (extrato de castanha) (URBACH, 2001).

O primeiro filtro comercial surgiu nos Estados Unidos da América (EUA), o qual era uma emulsão contendo salicilato de benzila e cinamato de benzila (SHAATH, 1990). Na Alemanha, uma pomada contendo ácido benzimidazol tornou-se disponível em 1933 (LIM, DRAELOS, 2009). Já na França, o primeiro filtro solar surgiu em 1936, uma formulação oleosa contendo salicilato de benzila, que foi vendida como *Ambre Solaire* por Schueller, o futuro fundador da L'Oreal (REBUT, 1990).

O número de patentes começou a aumentar: em 1943, o ácido *para*-aminobenzóico (PABA) foi patenteado, mas somente foi comercializado como filtro solar muito tempo depois (MACKIE; MACKIE, 1999). Em 1944, uma das substâncias conhecidas até hoje como o primeiro filtro solar amplamente utilizado, foi o petrolato veterinário vermelho (*red veterinary petrolatum*), produzido nos Estados Unidos por Greene, o fundador da Coppertone (LIM, DRAELOS, 2009), o qual foi extensivamente utilizado durante a Segunda Grande Guerra Mundial (MacEACHERN, JILLSON, 1946). Entretanto, esse produto vermelho e pegajoso e tinha uma eficácia limitada uma vez que deveria ser aplicado em uma camada espessa para prevenir as queimaduras solares (LIM, DRAELOS, 2009).

Outras substâncias surgiram a seguir: em 1948 ésteres de PABA mais efetivos foram disponibilizados no mercado (KUMLER; DANIELS, 1948). Em 1962, a benzofenona foi introduzida como filtro solar (URBACH, 2001) e, em 1979, os filtros solares UVA derivados do dibenzoilmetano. Em 1989, foram introduzidas partículas inorgânicas micronizadas, o dióxido de titânio e o óxido de zinco (ROELANDTS, 1995).

Atualmente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), segundo o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos (BRASIL, 2012b), define que protetor solar é “qualquer preparação cosmética destinada a entrar em contato com a pele e lábios, com a finalidade exclusiva ou principal de protegê-la contra a radiação UVB e UVA, absorvendo, dispersando ou refletindo a radiação” (BRASIL, 2012, p. 3). A Tabela 1 apresenta os filtros solares aprovados para uso no Brasil.

Tabela 1: Filtros solares aprovados no Brasil.

Filtro solar (nomenclatura INCI) (nome usual)	Absorção	Concentração máxima permitida pela ANVISA (2012b) (%)
3-Benzylidene camphor	UVB	2
4-Aminobenzoic acid (PABA)	UVB	15
4-methylbenzylidene camphor	UVB	4
Benzophenone-3	UVA/B	10
Benzophenone-4 (ácido)	UVA/B	10 (expresso como ácido)
Benzophenone-5	UVA/B	5% (expresso como ácido)
Benzophenone-8	UVA/B	3
Benzylidene Camphor Sulfonic Acid	UVB	6% (expresso como ácido)
Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine	UVA/B	10
Butyl methoxy dibenzoyl methane (Avobenzona)	UVA	5
Camphor benzalkonium METHOSULFATE	UVB	6
Cinoxate	UVB	3
Diethylamino hydroxybenzoyl hexil benzoate	UVA	10
Diethylhexyl butamido triazone	UVB	10
Disodium phenyl dibenzimidazole tetrasulfonate	UVA	10% (expresso como ácido)
Drometrizole trisiloxane	UVA/B	15
Ethylhexyl dimethyl PABA (Padimate O)	UVB	8
Ethylhexyl methoxycinnamate	UVB	10
Ethylhexyl salicylate	UVB	5
Ethylhexyl Triazone	UVB	5
Homosalate	UVB	15
Isoamyl p-methoxycinnamate	UVB	10
Menthyl anthranilate	UVA	5
Methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol	UVA/B	10
Octocrylene	UVB	10 (expresso como ácido)
PEG-25 PABA	UVB	10
Phenylbenzimidazole Sulfonic acid	UVB	8 (expresso como ácido)
Polyacrylamidomethyl benzylidene camphor	UVB	6
Polysilicone-15	UVB	10
Terephthalylidene dicamphor sulfonic acid	UVA	10 (expresso como ácido)
Titanium Dioxide	UVA/B	25
Triethanolamine salicylate (TEA salicilato)	UVB	12
Tris-Biphenyl Triazine	UVA/B	10
Zinc Oxide	UVA/B	25

Fonte: SCHALKA et al., 2014.

Os filtros solares podem ser divididos em inorgânicos (ou físicos), os quais refletem ou dissipam a radiação UV e orgânicos (ou químicos), os quais absorvem a radiação (DRAELLOS, 2012).

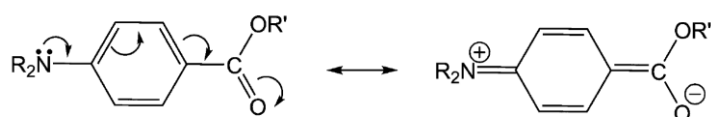
Além disso, os filtros solares químicos podem também ser divididos em diferentes classes, de acordo com a sua estrutura química, tais como aminobenzoatos, salicilatos, cinamatos, benzofenonas, derivados de cânfora, derivados de triazina, benzotriazóis, cianoacrilatos e dibenzoilmetanos. Os principais representantes dos filtros físicos são o dióxido de titânio (TiO₂) e o óxido de zinco (ZnO).

Os aminobenzoatos (derivados de PABA) estão entre os primeiros filtros solares. Apresentam um anel aromático dissubstituído em posição *para* por um grupo doador de elétron amino (NR₂) e um grupo aceptor de elétrons ácido carboxílico (COOR), permitindo a deslocalização eletrônica na molécula (SHAATH, 2010) (Figura 1).

Estudos demonstraram o potencial fotoalergênico do PABA em cobaias (GERBERICK; RYAN, 1989) e em humanos (NASH, 2006), decorrido de sua fotoativação (ALLEN et al, 1996) e de sua fotodegradação (GASPARRO, 1985).

Assim, o uso do PABA em filtros solares foi diminuído e o *claim* “livre de PABA/PABA-free” é usado até hoje (NASH, 2006).

Figura 1. Mecanismo de deslocalização dos aminobenzoatos.



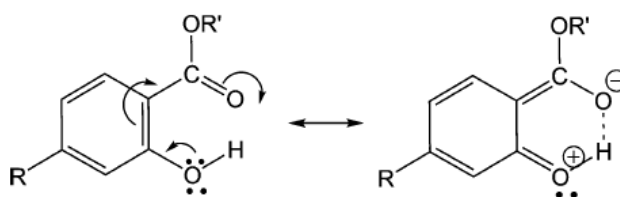
Fonte: SHAATH, 2010.

Os salicilatos apresentam dissubstituição na posição *orto* com um arranjo espacial que permite ligações de hidrogênio dentro da própria molécula (SHAATH, 2010) (Figura 2). Os principais representantes dessa classe são o salicilato de etilexila e o homossalato, os quais são fracos absorvedores UV, porém fotoestáveis. O salicilato de etilexila é também empregado como solvente para outros filtros solares, especialmente para a avobenzona e esses filtros solares raramente aparecem sozinhos em uma formulação (NASH, 2006).

Alguns estudos mostraram que o homossalato tem penetração cutânea limitada, assim como outros salicilatos (CHATELAIN; GABARD; SURBER, 2003; WALTERS et al., 1997). Outros estudos consideram rara a sensibilização e a fotossensibilização cutâneas induzidas pelo homossalato (NASH, 2006; DROMGOOLE; MAIBACH, 1990).

A penetração cutânea tem sido considerada baixa (1% da dose aplicada) por estudos realizados com o salicilato de etilexila na pele humana (CHATELAIN; GABARD; SURBER, 2003; WALTERS et al., 1997). Análises dos efeitos tipo estrogênio (*estrogen-like*) mostraram esse efeito *in vitro*, mas não *in vivo* (MOROHOSHI et al., 2005). Assim, os salicilatos apresentam um perfil toxicológico favorável para o uso em filtros solares (NASH, 2006).

Figura 2. Mecanismo de deslocalização dos salicilatos.



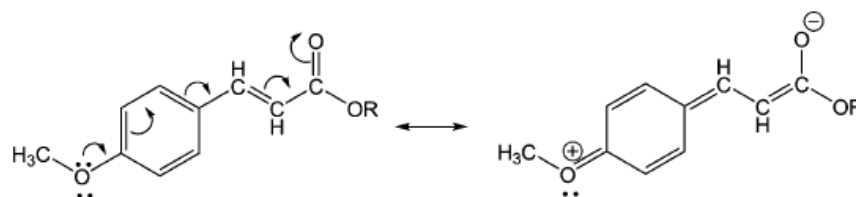
Fonte: SHAATH, 2010.

Os cinamatos apresentam anel aromático dissubstituído com um grupo doador de elétrons (OCH_3) e um grupo aceptor de elétrons (éster conjugado com dupla ligação), o que permite a deslocalização eletrônica, tornando a molécula capaz de absorver na região de 310 nm (SHAATH, 2010) (Figura 3).

Os cinamatos estão sujeitos à fotoisomerização *cis-trans* (*cis* – isômero *Z*; *trans* – isômero *E*) (SHAATH, 2010). Enquanto o isômero *E* é predominante e apresenta um $\lambda_{\text{máx}}$ de 310 nm, com um coeficiente de absorvidade molar (ϵ) de $19500 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, o isômero *cis*, que é formado pela absorção da luz, apresenta um $\lambda_{\text{máx}}$ de 312 nm, com um ϵ de $10000 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, resultando em menor absorção da radiação UV (SHAATH, 2010).

O principal representante da classe dos cinamatos é o metoxicinamato de etilexila, o qual é o filtro solar mais utilizado no mundo e cuja fotoisomerização *cis-trans* já é prevista (NASH, 2006). A incidência de fotodermatites provocadas por essa substância é considerada muito baixa (DARVAY et al., 2001). Estudos *in vitro* de permeação cutânea mostraram que há uma penetração de 0,2-0,4 % da dose aplicada do metoxicinamato de etilexila, outros estudos ainda revelam que valores *in vitro* podem estar superestimados quando comparados a estudos em humanos (CHATELAIN; GABARD; SURBER, 2003; JANJUA et al., 2004). Há relatos de que o metoxicinamato de etilexila tenha apresentado efeito tipo estrogênio *in vivo* (SEIDLOVÁ-WUTTKE et al., 2005), entretanto esse efeito não foi observado em seres humanos (JANJUA et al., 2004).

Figura 3. Mecanismo de deslocalização dos cinamatos.



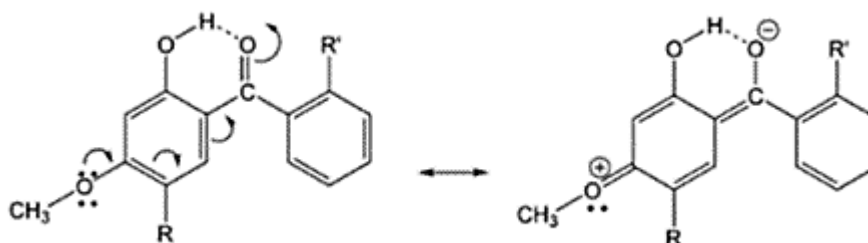
Fonte: SHAATH, 2010.

As benzofenonas são cetonas aromáticas, sendo que o anel aromático pode estar substituído nas posições *orto*, *para* ou em ambas, por um grupo doador de elétrons, o que as leva a apresentar $\lambda_{\text{máx}}$ em 286 nm e em 324 nm (SHAATH, 2010) (Figura 4).

O principal representante da classe, a benzofenona-3 tem sido descrita como o filtro solar responsável pela maior incidência de fotodermatites (SCHAUDER; IPPEN, 1997), além de ser absorvida sistemicamente (JIANG et al, 1999).

Alguns estudos relataram efeitos tipo estrogênio (SUZUKI et al, 2005) e efeitos antiandrogênicos da benzofenona-3 (MA et al, 2003). No entanto, estes resultados foram baseados em estudos realizados *in vitro*.

Figura 4. Mecanismo de deslocalização das benzofenonas.



Fonte: SHAATH, 2010.

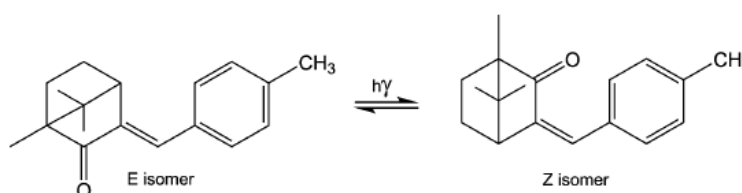
Muitos autores têm estudado a fotoalergenicidade da benzofenona-3. A experiência de mercado com as benzofenonas tem sido favorável ao seu uso em filtros solares (NASH, 2006), embora haja maior incidência de fotodermatites relacionada a esse filtro que outros (SZCZURKO et al., 1994; DELEO; SUAREZ; MASO, 1992; FISHER, 1992; KNOBLER et al., 1989; SCHAUDER; IPPEN, 1997). De acordo com o *Cosmetic Ingredient Review*, a benzofenona-3 foi considerada ligeiramente irritante, não sensibilizante e não fototóxica em animais e ligeiramente irritante e sensibilizante em estudos com seres humanos, sendo assim

considerada segura para uso em seres humanos (COSMETIC INGREDIENT REVIEW EXPERT PANEL, 2005; COSMETIC INGREDIENT REVIEW EXPERT PANEL; 1983).

A benzofenona-3 apresenta um grupamento o-alkil resorcinol, o qual pode levar à sensibilização cutânea (SUSHKO et al., 2012). De acordo com um estudo multicêntrico de *patch/photopatch* para filtros solares e produtos tópicos, conduzido com 1155 pacientes, o fotoalérgeno mais comum foi a benzofenona-3 (27 reações, 21 %), bem como o terceiro alérgeno mais comum (9 reações, 7 %), evidenciando que a benzofenona-3 está mais relacionada à alergia de fotocontato do que apenas alergia (BRYDEN et al., 2006).

Os derivados de cânfora absorvem UVB na região de 290-300 nm (SHAATH, 2010). Assim como os cinamatos, estes filtros solares sofrem isomerização, atingindo o equilíbrio entre a formação dos isômeros logo após a exposição à luz. Além disso, também apresentam boa fotoestabilidade (DEFLANDRE; LANG, 1988) (Figura 5).

Figura 5. Fotoisomerização dos derivados de cânfora.

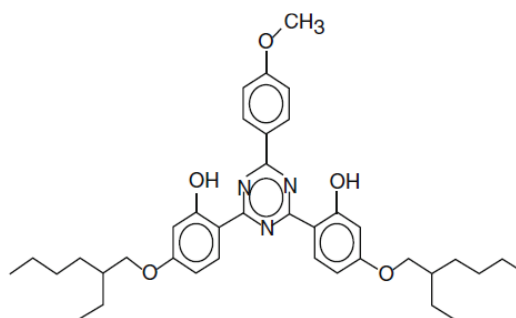


Fonte: SHAATH, 2010.

Uma das estratégias no desenvolvimento de novos filtros solares é a utilização da regra de 500 Dalton (LIM; HÖNIGSMANN; HAWK, 2007; SHAATH, 2010). Essa regra, já conhecida no desenvolvimento de medicamentos transdérmicos, descreve que no desenvolvimento de novos compostos para a terapia dermatológica tópica ou terapia sistêmica percutânea, o composto deve ter menos de 500 Dalton (LIM; HÖNIGSMANN; HAWK, 2007). Por outro lado, no caso dos filtros solares, cujo objetivo é a não penetração cutânea e a redução de efeitos adversos, pode-se postular o oposto, com o objetivo sendo a construção de moléculas com mais de 500 Dalton (LIM; HÖNIGSMANN; HAWK, 2007).

Os derivados de triazina estão entre as moléculas com mais que 500 Dalton, sendo que os principais representantes dessa classe são o bemotrizinol (629 Dalton) e a octil triazona (823 Dalton) (SHAATH, 2010). O bemotrizinol (Figura 6) também é utilizado para estabilizar ou mesmo substituir a avobenzona, devido à sua alta fotoestabilidade (BENEVENUTO; GUERRA; GASPAR, 2015; FREITAS; LOPES; GASPAR, 2015).

Figura 6. Fórmula estrutural do bemotrizinol.

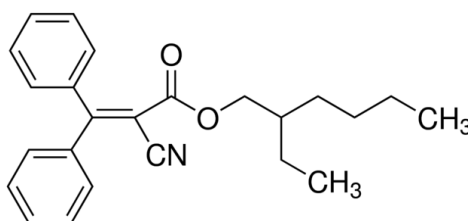


Fonte: WANG; LIM, 2016.

Os derivados de benzotriazóis são compostos heterocíclicos contendo átomos de nitrogênio, que são bons absorvedores em UVB e UVA, com comprimento de onda máximo de absorção próximo de 305 nm (CHEMICAL BOOK, 2016). Um dos principais representantes é o benzotriazolil dodecil p-cresol. Estudos indicam que o benzotriazolil dodecil p-cresol têm mostrado bons resultados devido ao seu alto desempenho em grande parte do UVA (MERCCKEL; ROHWER, 2001).

Dentre os cianoacrilatos, o octocrileno é o principal representante desta classe (Figura 7) (SALVADOR; CHISVERT, 2007). Esse filtro é frequentemente combinado com a avobenzona em formulações fotoprotetoras para promover sua fotoestabilização (NASH, 2006). Alguns estudos têm descrito, entretanto, o potencial fotoalergênico do octocrileno (AVENEL-AUDRAN et al., 2010; DE GROOT; ROBERTS, 2014; KARLSSON et al., 2011).

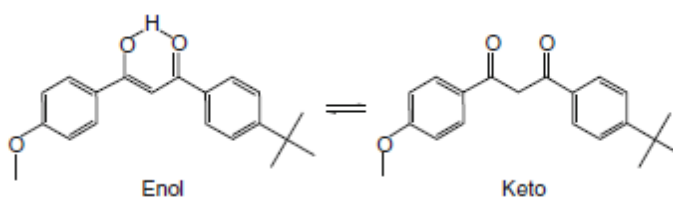
Figura 7. Fórmula estrutural do octocrileno.



Fonte: SIGMA-ALDRICH, 2017.

Embora muitos filtros solares UVB estejam disponíveis no mercado, há poucas moléculas capazes de absorver no espectro do UVA, sendo que a avobenzona, da classe dos dibenzoilmetanos (Figura 8), é o representante mais importante, devido à sua habilidade de absorção no UVA (LHIAUBET-VALLET et al, 2010) e sua disponibilidade comercial.

Figura 8: O tautomerismo ceto-enólico da avobenzona.

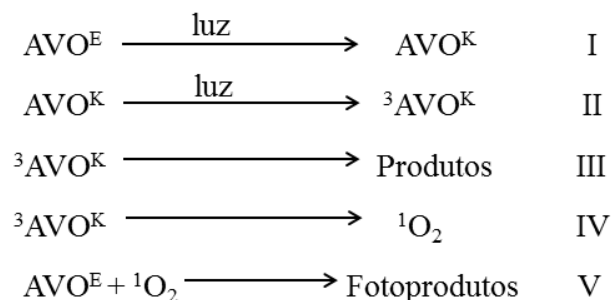


Fonte: WANG; LIM, 2016.

Segundo a base de dados de produtos cosméticos do *Environmental Working Group* (2017), a avobenzona, também chamada de butil metoxidibenzoilmetano (BMDBM), está presente em mais de 745 produtos americanos com FPS maior que 30 e em 527 com FPS 15-30, o que está intimamente ligado à sua alta absorção no UVA.

Já é amplamente conhecido que a avobenzona sofre tautomerização ceto-enólica (AVO^E - AVO^K) (MTURI; MARTINCIGH, 2008; LHIAUBET-VALLET et al, 2010). Em solução, há um equilíbrio entre AVO^E - AVO^K presentes e a quantidade relativa dos dois tautômeros encontra-se na direção da formação do tautômero AVO^E , o que é muito vantajoso, uma vez que AVO^E apresenta boa absorção no UVA, enquanto AVO^K apresenta um espectro de absorção no UVC, em 260-280 nm (MTURI; MARTINCIGH, 2008).

Após exposição à radiação UV, o equilíbrio é deslocado a favor de AVO^K (Processo I – Figura 9), que, por sua vez, absorve a luz e atinge o estado excitado tripleto ($^3AVO^K$), (Processo II - Figura 9) (LHIAUBET-VALLET, 2010). Embora a AVO^K exiba absorção máxima no UVC, seu espectro de absorção apresenta uma cauda que alcança a faixa UVB, permitindo que AVO^K seja excitada em um comprimento de onda maior que 290 nm (LHIAUBET-VALLET, 2010). Isso faz com que esta espécie excitada seja responsável pela maioria dos efeitos prejudiciais da AVO (LHIAUBET-VALLET, 2010). A fotodegradação irreversível da AVO está relacionada ao processo que ocorre com a $^3AVO^K$ (LHIAUBET-VALLET, 2010). Além disso, a $^3AVO^K$ pode formar oxigênio singlete (Processo IV - Figura 9), que reage com a forma enólica (AVO^E), levando à formação de produtos de oxidação (Processo V - Figura 9) (LHIAUBET-VALLET, 2010).

Figura 9. Diferentes processos envolvidos na fotoestabilidade da avobenzona.

Fonte: Adaptado de LHIAUBET-VALLET, 2010.

Nash e Tanner (2014) revisaram dados sobre segurança de filtros solares sugerindo que após a exposição à radiação UV, um dos principais fotoprodutos de degradação dos dibenzoilmetanos é o arilglioxal, o qual foi considerado um sensibilizante forte no ensaio *in vivo* de LLNA (KARLSSON et al., 2009). Além disso, foi observado que o uso da avobenzona tem aumentado (WANG et al., 2013) e que esse filtro tem gerado resultados positivos em teste em humanos *photopatch* (NASH; TANNER, 2014; VICTOR; COHEN; SOTER, 2010; SHAW et al., 2010; KERR et al., 2012).

2.3 Avaliação da performance de fotoprotetores

2.3.1 Estabilidade

Os produtos cosméticos apresentam complexidade em termos de formulação, na medida em que há ingredientes diferentes com funções e características específicas, tais como estabilidade físico-química, estabilidade microbiológica e presença de impurezas (BRASIL, 2012a). Dessa forma, quaisquer variações nesses parâmetros podem afetar a segurança do produto (BRASIL, 2012a) e devem ser criteriosamente estudadas no desenvolvimento de produtos cosméticos.

Além dos ensaios preconizados de prazo de validade e dos testes de estabilidade físico-química, estabilidade microbiológica e presença de impurezas, outro método relevante na avaliação da estabilidade de fotoprotetores é o estudo do comportamento reológico, por meio da análise de alterações da viscosidade, índice de fluxo e tixotropia (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003).

Esses parâmetros permitem monitorar a estabilidade, bem como fornecem informações importantes em relação à performance dos produtos durante sua aplicação na pele (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003). Além disso, as características reológicas do produto podem interferir

no escoamento do produto durante o processo de fabricação do mesmo (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003).

Especificamente no caso dos filtros solares, a avaliação da estabilidade após a exposição à luz UV, ou seja, a fotoestabilidade, também é de grande relevância na garantia da segurança do produto. Além disso, os produtos de degradação produzidos pela fotoinstabilidade podem levar a efeitos tóxicos ou alérgicos na pele (GRANGER; BROWN, 2001).

O estudo da fotoestabilidade fornece informações relevantes para prever e prevenir os efeitos de filtros solares fotoinstáveis, tais como a necessidade de fotoestabilizadores, as condições ideais de estocagem e de embalagem, além de possíveis interações entre os fotoprodutos e outros componentes da formulação.

Além disso, considerando que os fotoprodutos, como o caso da avobenzona, podem causar fotoalergia (KARLSSON et al., 2009) ou fototoxicidade (GASPAR et al., 2013; BENEVENUTO; GUERRA; GASPAR, 2015), a realização destes testes torna-se de fundamental importância durante a escolha dos componentes e do tipo de formulação para garantir a segurança do consumidor (RIEGER, 1997; SCHRADER; JAKUPOVIC; BALTES, 1994; GERHARD; NOHYNEK; SCHAEFERY, 2001).

Com o intuito de prevenir tais reações, diversos estudos sobre a fotoestabilidade têm sido realizados, empregando-se técnicas *in vitro*, tais como a espectrofotometria (DEFLANDRE; LANG, 1988; BERSET et al., 1996; MARGINEAN LAZAR et al., 1997), as técnicas de separação, tais como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (KAWAKAMI et al., 2016; BENEVENUTO; GUERRA; GASPAR, 2015; KAWAKAMI; GASPAR, 2015; FREITAS; LOPES; GASPAR, 2015; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2007; DEFLANDRE; LANG, 1988; BERSET et al., 1996; MARGINEAN LAZAR et al., 1997); a cromatografia gasosa (KAWAKAMI et al., 2016; ROSCHER et al., 1994) e até mesmo a espectrometria de massas (FREITAS; LOPES; GASPAR, 2015), nos quais se avaliam, por exemplo, a porcentagem remanescente dos filtros solares frente à exposição ao UVA, a produção de fotoprodutos, bem como a influência e a necessidade do uso de fotoestabilizadores em formulações cosméticas (KAWAKAMI et al., 2016; BENEVENUTO; GUERRA; GASPAR, 2015; KAWAKAMI; GASPAR, 2015; FREITAS; LOPES; GASPAR, 2015).

Além disso, a avaliação da estabilidade e da fotoestabilidade dos filtros solares pode influenciar também a eficácia e principalmente a segurança dos produtos, as quais serão discutidas a seguir.

2.3.2 Eficácia

A avaliação da eficácia dos filtros solares é essencial para determinar a sua efetividade na prevenção do dano solar e pode ser dividida em métodos *in vivo*, em métodos espectrofotométricos e em métodos *in vitro* (SCHALKA et al., 2014). Com os métodos *in vivo*, observa-se se o filtro solar é capaz de suprimir ou reduzir um evento causado pela radiação solar, como por exemplo o eritema ou a pigmentação; os métodos espectrofotométricos são baseados na capacidade dos filtros solares em absorver ou refletir a radiação (SCHALKA et al., 2014). Já os métodos *in vitro* representam uma alternativa para a avaliação de alterações moleculares e celulares induzidas pela radiação (SCHALKA et al., 2014).

A medida do fator de proteção solar (FPS) é internacionalmente aceita para a avaliação da eficácia de filtros solares, tendo sido descrita pela *US Food and Drug Administration* (FDA) nos EUA e pela *The European Cosmetic and Perfumery Association* (Colipa, atualmente chamada de *Cosmetics Europe*) na Europa (SCHALKA et al., 2014). O método internacional para a determinação do FPS foi introduzido em 2003 pela Colipa, pela Associação da Indústria Cosmética Japonesa (JCIA) e pela Associação da Indústria Cosmética da África do Sul (DRAELLOS, 2012). Anteriormente, a FDA já havia publicado em 1999 uma monografia com o tema e em 2007 apresentou uma emenda (DRAELLOS, 2012; FDA, 2007).

No Brasil, a ANVISA preconiza, através da RDC 30 (BRASIL, 2012b), que a determinação do FPS deve ser feita seguindo a metodologia proposta pela FDA ou pela Colipa (BRASIL, 2012b). Apesar de algumas diferenças, os métodos propostos pela FDA e pela Colipa geram resultados similares e valores equivalentes de FPS (SCHALKA et al., 2011).

O FPS é definido como o “valor obtido pela razão entre a dose mínima eritematosa em uma pele protegida por um protetor solar (DMEp) e a dose mínima eritematosa na mesma pele quando desprotegida (DMEnp)” (BRASIL, 2012b, p. 4), sendo que dose mínima eritematosa (DME) é a “dose mínima de radiação ultravioleta requerida para produzir a primeira reação eritematosa perceptível com bordas claramente definidas, observadas entre 16 e 24 horas após a exposição à radiação ultravioleta” (BRASIL, 2012b, p. 4).

A ANVISA definiu na RDC 30 (BRASIL, 2012b) alguns parâmetros a serem seguidos para os novos protetores solares, tais como: os produtos devem apresentar FPS mínimo de 6 e apresentar fator de proteção UVA com valor de, no mínimo, 1/3 do valor do FPS declarado na rotulagem além do comprimento de onda crítico de no mínimo 370 nm e o termo “bloqueador solar” não é mais permitido (BRASIL, 2012b).

Para a determinação da proteção UVA, deve-se medir o FPUVA (fator de proteção UVA), o qual é definido como “o valor obtido pela razão entre a dose mínima pigmentária em uma pele protegida por um protetor solar (DMPp) e a dose mínima pigmentária na mesma pele,

quando desprotegida (DMPnp)” (BRASIL, 2012b, p. 4). O método *in vivo* de Pigmentação Persistente (PPD - *Persistent Pigment Darkening*) mede a pigmentação da pele de voluntários após a irradiação por UVA. Entretanto as altas doses de radiação UVA necessárias para o teste (maior que 10 J/cm^2) também desafia a fotoestabilidade dos filtros solares (DRAELLOS, 2012).

Dentre outros métodos utilizados para a triagem de eficácia das formulações estão a determinação da razão UVA/UVB e do comprimento de onda crítico o qual é definido como “o comprimento de onda para o qual a área sob a curva integrada de densidade ótica que começa em 290 nanômetros é igual a 90 % da área integrada entre 290 e 400 nanômetros” (BRASIL, 2012b, p. 4).

A razão UVA/UVB também pode ser utilizada para a avaliação da fotoestabilidade, já que se trata de um método simples, rápido, reprodutível e de baixo custo (CHATELAIN; GABARD, 2001; HERZOG, 2002). Entretanto, para o registro dos fotoprotetores, somente são aceitos os métodos de avaliação de FPS e PPD em humanos (BRASIL, 2012b).

2.3.3 Segurança

A ANVISA (BRASIL, 2012a), bem como o Comitê Científico Europeu para a Segurança do Consumidor (Scientific Committee on Consumer Safety - ligado à European Commission) (SCCS, 2016), recomenda que alguns estudos toxicológicos sejam apresentados no dossiê de cosméticos, tais como a avaliação da toxicidade sistêmica aguda (se disponível), corrosividade e irritação (cutânea e ocular), sensibilização cutânea, absorção/penetração cutânea, doses repetidas e mutagenicidade/genotoxicidade (BRASIL, 2012a). Se a substância for utilizada em uma formulação que será exposta ao sol, então deve ser feita a avaliação dos efeitos tóxicos induzidos pelo UV (BRASIL, 2012a).

O ICH (*International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use*, 2013) desenvolveu um guia para a avaliação da fotossegurança de produtos farmacêuticos, o qual é imprescindível na avaliação de substâncias expostas à radiação, tais como filtros solares. O guia apresenta quatro diferentes desfechos que têm sido amplamente discutidos na avaliação de fotossegurança: fototoxicidade, fotoalergia, fotogenotoxicidade e fotocarcinogenicidade (ICH; 2013). Entretanto, a fotogenotoxicidade e a fotocarcinogenicidade não são consideradas relevantes em termos de produtos farmacêuticos humanos (ICH; 2013).

Dessa forma, os desfechos mais relevantes e que têm sido mais estudados para a avaliação da segurança dos filtros solares serão descritos a seguir e podem ser divididos em

processos induzidos ou não pela radiação UV e dependentes ou não da ativação do sistema imunológico.

2.3.3.1 Processos não dependentes do sistema imunológico e não induzidos pela radiação UV: Irritação cutânea

A irritação cutânea é definida como a produção reversível de dano à pele após a aplicação de uma substância por até 4 h (OECD TG 439 2015c).

Segundo a ANVISA, a irritação cutânea é um “processo inflamatório que ocorre na área de contato com o produto, podendo ocorrer após a primeira aplicação (irritação primária) ou com a continuidade do uso (irritação acumulada)” (BRASIL 2012a, p. 11).

O ensaio *in vitro* validado internacionalmente para esse desfecho é o TG 439 (OECD TG 439 2015c), o qual é realizado em modelo de epiderme humana reconstituída. Nesse ensaio, a substância é aplicada topicamente em um modelo de epiderme humana reconstituída, constituída por queratinócitos epidérmicos humanos não transformados (OECD TG 439 2015c). A viabilidade celular é medida pela conversão enzimática do corante vital MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio) em formazan, o qual é quantificado após a extração dos tecidos (OECD TG 439 2015c).

Substâncias irritantes são identificadas pela sua habilidade de diminuir a viabilidade celular abaixo dos valores limites, ou seja, $\leq 50\%$ para a Categoria 2 da UN GHS (*United Nations – UN - Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals - GHS*) (OECD TG 439 2015c).

Outra aplicação do ensaio de irritação cutânea *in vitro* de irritação cutânea é para auxiliar a compreensão de outros desfechos, tais como a sensibilização cutânea, uma vez que alguns autores têm pontuado o papel claro da irritação cutânea na sensibilização cutânea, devido à propriedade irritante de muitos alérgenos (AGNER et al., 2002; MCLELLAND; SHUSTER; MATTHEWS, 1991; PEDERSEN et al., 2004; DOS SANTOS et al., 2011; SPIEKSTRA; BREETVELD; RUSTEMEYER, 2007). Além disso, esses estudos podem ajudar na discriminação da potência do alérgeno estudado (DOS SANTOS et al., 2011; SPIEKSTRA; BREETVELD; RUSTEMEYER, 2007).

Em relação aos ensaios em humanos, a ISO (*International Organization for Standardization*) normatizou o ensaio de irritação cutânea (ISO, 2010), no qual uma dose única da substância é aplicada na pele de voluntários humanos, sob oclusão, normalmente em períodos curtos de exposição (ISO, 2010) A avaliação é feita através da determinação da

proporção de voluntários humanos que desenvolvem irritação da pele, comparando-se a uma reação concomitante ao controle positivo (ISO, 2010).

De acordo com a ANVISA (BRASIL, 2012a), a avaliação clínica tem o objetivo de comprovar a ausência das reações de irritação primária e acumulada, sendo que esses “estudos não são recomendados para produtos primariamente irritantes” (ANVISA 2012a, p. 37).

2.3.3.2 Processos não dependentes do sistema imunológico, mas induzidos pela radiação UV: Fototoxicidade (fotoirritação)

A fototoxicidade é uma reação aguda que pode ser induzida por um único tratamento com a substância química e a radiação UV ou visível, sendo que *in vivo*, a reação pode ocorrer em todos os indivíduos, desde que a concentração da substância química e a dose de radiação sejam apropriadas (LIEBSCH et al., 2005).

Segundo a OECD (OECD TG 432, 2004), a fototoxicidade é definida como a resposta tóxica de uma substância aplicada no corpo, a qual é ou induzida ou aumentada após a subsequente exposição à luz, ou que é induzida pela irradiação da pele após a administração sistêmica da substância.

Para a avaliação da fototoxicidade, o guia proposto pelo ICH (2013) apresenta uma estratégia internacionalmente padronizada, a qual está incluída na avaliação da fotossegurança de substâncias que serão utilizadas em pele exposta à luz solar (ICH, 2013), tais como os filtros solares.

A primeira etapa na estratégia é a avaliação da fototoxicidade por meio de ensaios não biológicos, tais como o espectro de absorção no UV/VIS, bem como a avaliação do coeficiente de extinção molar, o qual deve ser maior que $1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para que a substância possa ser considerada fotorreativa (ICH, 2013).

Considerando que a geração de espécies reativas do oxigênio (EROs) é um dos mecanismos mais importantes para a indução da fototoxicidade, o ensaio do ROS foi recentemente incluído nessa estratégia como segunda etapa não biológica (CERIDONO et al., 2012; JaCVAM, 2013; ONOUE et al., 2013).

O ensaio mede a produção de EROs após a exposição ao UV/VIS, baseado em duas vias principais, a transferência de hidrogênio/elétron (reação Tipo I), que produz o ânion superóxido e a transferência de energia para o oxigênio (reação Tipo II), que produz o oxigênio singlete (ONOUE et al., 2013; ICH, 2013; JaCVAM, 2013). Substâncias negativas nesse ensaio apresentam uma baixa probabilidade de serem fototóxicas (ICH, 2013).

Na próxima etapa se iniciam os ensaios biológicos, na qual é descrito o ensaio de fototoxicidade em fibroblastos 3T3 através da captação do vermelho neutro (3T3 NRU PT) (ICH, 2013).

O ensaio de fototoxicidade 3T3 NRU é baseado na comparação da citotoxicidade de uma substância quando testada na presença e na ausência da exposição a uma dose não citotóxica de radiação (OECD, 2004; LIEBSCH; SPIELMANN, 2002). Para o cálculo da citotoxicidade, a viabilidade celular é quantificada pela captação do corante vermelho neutro (OECD, 2004).

O ensaio 3T3 NRU PT apresentou 100% de sensibilidade (ausência de resultados falsos negativos) e 98% de especificidade (ausência de resultados falsos positivos) no final dos estudos de validação, realizado com 46 substâncias fototóxicas e 24 substâncias não fototóxicas, indicando que esse é normalmente o único teste necessário de fototoxicidade quando a substância é considerada não fototóxica (LIEBSCH et al., 2005; CERIDONO et al., 2012).

Apesar de extremamente sensível, o 3T3 NRU PT apresenta limitações como o uso de substâncias lipossolúveis, bem como não considerar a biodisponibilidade cutânea, uma vez que o ensaio é realizado em cultura de células em monocamadas (OECD, 2004).

Além disso, a detecção da fototoxicidade de substâncias induzida por UVB também representa uma limitação do ensaio, embora as fototoxinas (que normalmente são substâncias muito fototóxicas) sejam detectadas por esse método, pois uma baixa quantidade de UVB pode atingir as células (CERIDONO et al., 2012; LIEBSCH et al., 2005).

O 3T3 NRU PT foi validado com sucesso entre 1992 e 1998 (SPIELMANN et al., 1994; SPIELMANN et al., 1998), foi aceito para fins regulatórios por parte da União Europeia no ano de 2000, pela OECD em 2002, e pela FDA dos EUA em 2003 (LIEBSCH et al., 2005). A fototoxicidade induzida por UVB raramente é um problema para drogas sistêmicas, pois o UVB raramente penetra além da epiderme. Entretanto, essa fototoxicidade é mais relevante para produtos tópicos e, nesse caso, o ICH recomenda o uso do 3T3 NRU PT com condições modificadas de irradiação ou até mesmo outros modelos *in vitro* (ICH, 2013).

Se um resultado positivo é obtido, a próxima etapa é o ensaio de fototoxicidade em modelos de pele tridimensionais (H3D-PT; ICH, 2013), os quais mimetizam de forma satisfatória a pele humana, uma vez que contêm estrato córneo (*stratum corneum*), que atua como barreira à penetração cutânea, levando em consideração a biodisponibilidade das substâncias cujo resultado foi positivo no 3T3 NRU-PT (KEJLOVÁ et al., 2007; ICH, 2013; SCCS, 2016).

Realizado de maneira semelhante ao 3T3 NRU-PT, o ensaio baseia-se na comparação da citotoxicidade de uma substância testada na exposição ou não de uma dose não tóxica de UVA/VIS. A citotoxicidade é expressa como a redução da conversão mitocondrial do MTT em cristais de formazan, após um dia do tratamento e exposição ao UVA (KEJLOVÁ et al., 2007).

As vantagens incluem a semelhança com a pele humana, com suas complexidades e função barreira, além de permitir que substâncias com baixa solubilidade sejam testadas, tais como óleos e até mesmo pós e formulações (ICH, 2013).

As limitações incluem a alta permeabilidade em comparação com o tecido humano (KANDÁROVÁ, 2006), o que leva ao uso de um fator de precaução de 10 x, quando as substâncias testadas nos modelos de pele são subsequentemente submetidas a ensaios clínicos (KEJLOVÁ et al., 2007).

A validação do H3D-PT não foi completada, mas esse ensaio apresenta sensibilidade de 87 %, especificidade de 93 % e precisão de 93 % em relação às fototoxinas conhecidas (LIEBSCH; 1999).

Finalmente, o último passo da estratégia é o *photopatch* teste confirmatório em voluntários humanos, utilizando a primeira concentração não fototóxica determinada por H3D-PT (KEJLOVÁ et al., 2007; ICH, 2013).

Os ensaios clínicos ainda precisam ser padronizados internacionalmente, entretanto, de forma geral, a substância é aplicada no dorso de voluntários. O *patch* é removido após 24 h e o local é irradiado com UVA. As reações são medidas comparando a área da substância teste e os controles, imediatamente após a irradiação e após 24, 48 e 72 h, se uma reação positiva é observada (BRUYNZEEL et al., 2004).

De acordo com a ANVISA (BRASIL, 2012a), o estudo consiste em uma única aplicação (aberta, semioclusiva ou oclusiva) por 24 h em pelo menos 25 voluntários, seguido de irradiação e leitura.

2.3.3.3 Processos dependentes do sistema imunológico, mas não influenciados pela radiação UV: Sensibilização cutânea

A dermatite de contato alérgica (DCA) é uma reação de hipersensibilidade tardia (tipo IV) (JOHANSEN; FROSCHE; LEPOITTEVIN, 2011) e é primariamente dependente da ativação de linfócitos T alérgeno-específicos (BERGSTRESSER, 1989). A DCA também pode ser descrita como uma resposta inflamatória adaptativa após a exposição ao alérgeno químico (SMITH; HOTCHKISS, 2001; MOED et al., 2004; RUSTEMEYER et al., 2004).

É possível dividir a DCA em duas fases: a fase de indução, ou de sensibilização, e a fase efetora, ou de elicitação (SAINT-MEZARD et al., 2003). Na fase de sensibilização ocorrem os eventos iniciados com o primeiro contato com o alérgeno até a completa sensibilização do indivíduo (JOHANSEN; FROSCH; LEPOITTEVIN, 2011).

A primeira fase é marcada pelos eventos: penetração cutânea das substâncias sensibilizantes, ligação com proteínas da pele, estímulo dos queratinócitos e células de Langerhans, captura e apresentação das substâncias sensibilizantes pelas células de Langerhans e apresentação aos linfócitos T, diferenciação e proliferação de linfócitos T alérgeno-específicos (OECD, 2012).

Os sensibilizantes de contato são normalmente muito pequenos, menos de 500 Da (BOS; MEINARDI, 2000), para serem antigênicos por si próprios, sendo então considerados haptenos. Esses haptenos são geralmente substâncias eletrofílicas e contêm grupos funcionais como aldeídos, cetonas, amidas ou ligações polarizadas (BÜDINGER; HERTL, 2000), os quais podem, após penetrarem na pele, se ligar covalentemente a grupos nucleofílicos, tais como tióis, aminas e hidroxilas, presentes em aminoácidos como cisteína, lisina e histidina (GERBERICK et al., 2008).

Além disso, os haptenos também estão sujeitos à biotransformação, o que pode tanto aumentar, quanto diminuir seu potencial alergênico (OECD, 2012).

Após a ligação com as proteínas da pele, o complexo hapteno-proteína pode ser processado por células dendríticas da epiderme (células de Langerhans) ou células dendríticas da derme, estimulando sua maturação e migração até os linfonodos locais, bem como reagir e ativar os queratinócitos, os quais podem interagir com as células dendríticas (OECD, 2012).

Nos linfonodos, as células dendríticas apresentam o complexo hapteno-proteína aos linfócitos T *naive*, induzindo a diferenciação e a proliferação de linfócitos T de memória específicos aos alérgeno, algumas das quais recirculam através do corpo (OECD, 2012).

A segunda fase, a elicitação, começa após o desafio (JOHANSEN; FROSCH; LEPOITTEVIN, 2011), ou seja, após o contato subsequente com o mesmo alérgeno (OECD, 2012). Novamente, é formado o complexo hapteno-proteína, com subsequente captura pelas células dendríticas (OECD, 2012). Ainda na pele, as células dendríticas e os linfócitos T alérgeno-específicos de memória e circulantes (OECD, 2012) podem se encontrar, levando à liberação abundante de citocinas e quimiocinas, causando a chegada de mais células inflamatórias e, então, amplificando a liberação de mediadores locais (JOHANSEN; FROSCH; LEPOITTEVIN, 2011; OECD, 2012). Essas células podem migrar para a epiderme e induzir

resposta inflamatória local de erupção cutânea, bolhas, prurido e queimadura da pele (OECD, 2012), os quais são sinais da DCA, ou seja, a manifestação clínica.

Em relação aos primeiros métodos descritos para a avaliação da DCA, utilizava-se ensaios baseados em cobaias (*guinea pig*). Em 1965, Buehler descreveu um patch teste de oclusão, em 1969, Magnusson e Kligman descreveram o ensaio de sensibilização cutânea maximizada (*guinea pig maximization test* - GPMT) (MEHLING et al., 2012). Ambos os métodos foram adotados pela OECD como TG 406 em 1981 e revisados em 1992 (MEHLING et al., 2012; OECD TG 406 1992).

Nesse ensaio, os animais são expostos às substâncias químicas por injeção intradérmica e/ou por aplicação epidérmica (indução) (OECD TG 406 1992). Após 10-14 dias de descanso, os animais são expostos à dose de desafio. São analisados a extensão e o grau da reação cutânea em relação aos animais controle (OECD TG 406 1992). O GPMT requer 10 ou 20 animais para os grupos das substâncias e 5 ou 10 para os grupos controle, e possui duração de 24 dias, enquanto o ensaio de Buehler requer 30 animais e possui duração de 32 dias (MEHLING et al., 2012; OECD TG 406 1992).

As limitações desses testes são os resultados subjetivos, resposta sim-ou-não (não determina potência de sensibilização cutânea), além do alto número de animais utilizado e do longo tempo do ensaio (MEHLING et al., 2012). Entretanto, esse ensaio conta com casos raros de falsos positivos ou falsos negativos (BASKETTER; KIMBER 2010). O ensaio abrange a fase de elicitação, o que reflete à alergia em si, mas o que também leva a maior sofrimento animal (MEHLING et al., 2012).

Como uma alternativa aos ensaios em cobaias para a identificação de sensibilizantes cutâneos, em 1992, Kimber e Basketter publicaram o ensaio do linfonodo local murino (*Local Lymph Node Assay* – LLNA, OECD TG 429, 2010a).

O teste é baseado no fato que os sensibilizantes cutâneos induzem a proliferação de linfócitos nos linfonodos drenantes do local de aplicação da substância teste (OECD TG 429, 2010a). Esta proliferação é proporcional à dose e à potência do alérgeno e é uma maneira simples de obter a medida quantitativa de sensibilização (OECD TG 429, 2010a).

A razão entre a proliferação do grupo tratado e o controle (veículo) determina o índice de estimulação (*Stimulation Index* - SI) que deve ser maior que 3 para uma substância ser classificada como sensibilizante (OECD TG 429, 2010a). Através do SI, é possível calcular a concentração efetiva (*effective concentration* – EC) de uma substância, necessária para que o aumento de 3x no SI, ou seja, o EC3 (OECD TG 429, 2010a). O valor de EC3 possibilita a categorização das substâncias de acordo com a potência, ou seja, EC3 de 0,1 % corresponde a

um sensibilizante extremo, 0,1-1 % a um sensibilizante forte, 1,0-10 % a um sensibilizante moderado e valores maiores que 10 % a sensibilizante fracos (ICCVAM, 2011). O ensaio conta com o uso de 20 a 25 camundongos (OECD TG 429, 2010a).

As vantagens do LLNA em relação aos ensaios de cobaias são o resultado objetivo e quantitativo, o tempo reduzido para 7 dias, o ensaio é mais robusto a avaliação não é prejudicada pelo uso de substâncias coloridas, reduz-se o sofrimento animal, uma vez que o ensaio não alcança a etapa de inflamação cutânea (ICCVAM, 2011).

Ao longo dos anos, algumas mudanças foram incorporadas no LLNA para minimizar as suas desvantagens, tais como a atualização em 2010, com a redução do número de animais em certos casos (*Reduced LLNA*) e o uso de substâncias não radioativas (OECD TG 442A, 2010b; TG 442B, 2010c).

Outras limitações do LLNA incluem a presença de falsos positivos, especialmente para algumas classes de substâncias, como tensoativos (MEHLING et al., 2012; BALL et al. 2011), substâncias semelhantes a ácidos graxos (KREILING et al. 2008; BASKETTER et al. 2008), além de irritantes fortes, uma vez que estas substâncias podem induzir proliferação inespecífica de linfócitos (MEHLING et al., 2012).

Entretanto, o LLNA ainda é considerado o padrão ouro na avaliação da sensibilização cutânea, uma vez que é preciso no que diz respeito à relevância (capacidade preditiva) e à confiabilidade (reprodutibilidade dentro e entre laboratórios) em distinguir uma substância sensibilizante de uma substância não sensibilizante (KIMBER et al., 2002; BASKETTER; CADBY, 2004; GERBERICK et al., 2004).

Há um grande empenho tanto dos órgãos governamentais de saúde quanto da comunidade científica para a redução do uso de animais de experimentação baseado no conceito dos 3R's, que representam o refinamento, redução e substituição (*Refine, Reduction and Replacement*), que tem como estratégia uma pesquisa racional minimizando o uso de animais e o seu sofrimento, sem comprometer a qualidade do trabalho científico que está sendo executado.

Em 2012, a OECD lançou o programa para o desenvolvimento de estudos baseados nas vias de eventos adversos (*Adverse Outcome Pathways - AOP*), o qual tem como objetivo a descrição dos eventos chave responsáveis pelo evento adverso. A descrição das AOPs é essencial para a construção de estratégias integradas para a avaliação de risco em diferentes níveis de organização biológica, o que é descrito pela OECD como *Integrated Approach on Testing and Assessment* (IATA; OECD, 2012). Além disso, o conhecimento das etapas

envolvidas em um determinado evento adverso impulsiona o desenvolvimento de métodos para cada evento.

As AOPs da sensibilização cutânea envolvem os eventos da sensibilização cutânea descritos anteriormente, ou seja, a penetração do hapteno na pele, a ligação com proteínas da pele, a estimulação de queratinócitos, a estimulação e migração de células de Langerhans, a ativação de linfócitos T *naive* e na fase de elicitação, a inflamação dérmica, mediada por linfócitos T previamente ativados (MEHLING *et al.*, 2012). Nesse sentido, sistemas complexos de teste são necessários para mimetizar as diversas etapas envolvidas na sensibilização cutânea.

Na União Europeia está em vigor, desde 2013 o banimento dos ensaios em animais para a determinação da sensibilização cutânea de ingredientes e produtos cosméticos, o que ocorreu gradativamente e foi impulsionado com a sétima emenda da diretiva europeia (Diretiva 2003/15/CE, EUROPEAN UNION, 2003). Isso levou ao desenvolvimento de diversos métodos para esse desfecho, sendo que três deles foram aceitos pela OECD, o Ensaio de Depleção de Peptídeos (DPRA - OECD TG 442C, 2015a), o ensaio ARE-Nrf2 luciferase na linhagem KeratinoSens, derivada de queratinócitos HaCaT humanos (OECD TG 442D, 2015b) e o ensaio de ativação de linhagem celular humana (*human Cell Line Activation Test* h-CLAT – OECD TG 442E, 2016).

O DPRA (*Direct Peptide Reactivity Assay*) (GERBERICK *et al.*, 2004; 2007; OECD TG 442C, 2015a) tem o objetivo de mimetizar o modelo de haptização proteica *in vitro*, quantificando a depleção de dois heptapeptídeos sintéticos (uma cadeia lateral contendo uma cisteína ou uma lisina, como alvo da reação) usando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (GERBERICK *et al.*, 2004; 2007; OECD TG 442C, 2015a). Esse ensaio baseia-se no fato de uma das características de um alérgeno químico (hapteno) é a sua capacidade de reagir com proteínas previamente à indução da sensibilização cutânea, sendo que a maioria dos alérgenos químicos apresenta caráter eletrofílico, podendo reagir com aminoácidos nucleofílicos, tais como cisteína e lisina (GERBERICK *et al.*, 2004; 2007; OECD TG 442C, 2015a).

O ensaio do DPRA pode alcançar 80 % de sensibilidade e 77% de especificidade, quando comparado ao LLNA (OECD TG 442C, 2015a).

O ensaio ARE-Nrf2 luciferase na linhagem KeratinoSens, derivada de queratinócitos HaCaT humanos (OECD TG, 442D, 2015b) se baseia no fato de que as células contêm o gene luciferase sob o controle transcricional de um promotor constitutivo fundido com um elemento ARE de um gene conhecido por ser *up-regulated* por sensibilizante de contato (OECD TG 442D, 2015b). O sinal da luciferase reflete a ativação por sensibilizante de genes endógenos

dependentes do fator transcripcional Nrf2, o que permite a quantificação da indução da luciferase por luminescência (OECD TG, 442D, 2015b). Esse ensaio apresenta precisão de 77 %, sensibilidade de 78 %, especificidade de 76 % em relação ao LLNA (OECD TG 442D, 2015b).

O ensaio de ativação de linhagem celular humana (*human Cell Line Activation Test* h-CLAT – OECD TG 442E, 2016) é baseado na quantificação de mudanças na expressão de marcadores de superfície celular (CD86 e CD54) na linhagem celular de leucemia monocítica humana, células THP-1, após 24h da exposição à substância química (OECD TG 442E, 2016). Esses marcadores são típicos da ativação dessas células e mimetizam a ativação de células dendríticas, sendo que as mudanças nesses marcadores são medidas por citometria de fluxo (OECD TG 442E, 2016). Esse ensaio apresenta precisão de 85%, sensibilidade de 93%, especificidade de 66% em relação ao LLNA, além de reprodutibilidade intra e interlaboratorial de 80% (OECD TG 442E, 2016).

Embora validados, os métodos descritos anteriormente apresentam algumas limitações, tais como a dificuldade em avaliar substâncias lipofílicas. Nesse sentido, diversos grupos de pesquisa têm se dedicado ao desenvolvimento de modelos de pele reconstituída ou de modelos comerciais de epiderme equivalente para a avaliação de diversos desfechos, inclusive a sensibilização cutânea, uma vez que esses modelos levam em consideração a penetração cutânea e a biodisponibilidade da substância em estudo (LIEBSCH et al., 2005, LELIÈVRE et al., 2007; CERIDONO et al., 2012, ICH, 2013).

Entretanto, no Brasil a importação dos modelos de epiderme equivalente ainda não é possível, devido ao alto custo e a necessidade de um sistema eficiente de importação, o que tem impulsionado o desenvolvimento de modelos de pele reconstituída por pesquisadores brasileiros. Nesse sentido, o desenvolvimento e a padronização de modelos *in house* têm sido essencial para alavancar a pesquisa nacional.

Um estudo relacionou o papel da irritação na dermatite de contato alérgica, utilizando modelos de epiderme equivalente devido à propriedade irritante de muitos alérgenos (AGNER et al., 2002; MCLELLAND; SHUSTER; MATTHEWS, 1991; PEDERSEN et al., 2004). Esse ensaio faz uso do modelo de epiderme equivalente e avalia o metabolismo / viabilidade da epiderme por ensaio de MTT e por liberação de IL-1 α , sendo que quanto mais irritante for uma substância, menor será a sua atividade metabólica, menor será a viabilidade celular e maior será a quantidade de IL-1 α liberada (DOS SANTOS et al., 2011).

Além disso, alguns autores têm sugerido modelos de predição para a sensibilização cutânea correlacionando a produção de citocinas com a viabilidade celular e até mesmo

propondo modelos preditivos. Alguns exemplos são a quantificação de IL-6 em cultura de queratinócitos imortalizados HaCat (JUNG, 2016), a quantificação de IL-8 em cultura queratinócitos normais humanos (NHK, BAE et al., 2015) e a quantificação de IL-18 em cultura de queratinócitos NCTC 2544 (GALBIATI et al., 2014) e em modelos de epiderme equivalente (ANDRES et al., 2016; GIBBS et al., 2013), entre outros.

Nesse contexto, a avaliação da produção de IL-18 por queratinócitos em modelos de epiderme equivalente é considerada adequada (mas ainda não é considerada evidência forte) para a predição da sensibilização cutânea (OECD, 2012), o que indica a necessidade de mais estudos para confirmar a força de evidência da dosagem de IL-18, especialmente em modelos de pele reconstituída (contendo epiderme + derme), uma vez que a maioria dos estudos foi realizada em modelos de epiderme equivalente ou em cultura de queratinócitos em monocamadas, como descrito anteriormente.

Em um estudo recente, ANDRES *et al.* (2016) avaliaram a sensibilização cutânea pela quantificação de IL-18 em modelos de epiderme equivalente e chegaram a valores de sensibilidade (ausência de resultados falsos negativos), de 83-100% em relação ao ensaio de compatibilidade em humanos (HRIPT– *Human repeated insult patch test*) e 33-50% de especificidade (ausência de resultados falsos positivos). Tendo em vista que a ausência de resultados falsos negativos é essencial para a avaliação de segurança, esses resultados demonstraram a grande relevância desse ensaio quando comparado aos estudos realizados em seres humanos, tais como o ensaio de compatibilidade cutânea, bem como a grande perspectiva desse teste (ANDRES *et al.* 2016).

Além dos modelos convencionais de pele reconstituída, alguns grupos de pesquisa estão envolvidos no desenvolvimento de um modelo de pele contendo um componente do sistema imunológico, o qual poderia mimetizar mais eficientemente a pele humana (MEHLING et al., 2012) e, conseqüentemente, abranger mais passos das AOPs da sensibilização cutânea. Entretanto, esses modelos (FACY et al., 2005; GUIRONNET et al., 2001) normalmente contêm células de Langerhans, o que apresenta algumas limitações, tais como a dificuldade de manter estas células nas camadas da pele, sem a migração para o meio de cultura, e de induzir sua migração ao longo das camadas da pele.

Van den Bogaard et al. (2014) descreveram a importância da interação entre queratinócitos e linfócitos T usando um modelo de pele, no qual linfócitos T CD4+ *naive*, purificados de células mononucleares de sangue periférico foram adicionadas em modelos de pele. Foi observado que essa interação tem um papel fundamental no desenvolvimento de doenças inflamatórias da pele (VAN DEN BOGAARD et al., 2014). A importância dessa

interação também foi observada em um modelo de pele proposto por Wallmeyer et al. (submetido) para dermatite atópica.

Além dos testes *in vitro* e *in vivo* realizados, os produtos cosméticos devem também ser avaliados por ensaios clínicos, uma vez que se deve assegurar o menor risco quanto ao uso do produto, garantindo as melhores condições de uso (BRASIL, 2012a). Partindo das informações e resultados pré-clínicos obtidos e coletados, deve haver a comprovação da segurança de uso por humanos (BRASIL, 2012a).

O teste de contato (*patch test*), realizado em humanos, está entre as principais ferramentas utilizadas no diagnóstico de reações induzidas por cosmético, além da pesquisa de alergenicidade realizada nesse teste (KLIGMAN; WOODING, 1967; FISHER, 1995).

O ensaio humano de insulto repetido em *patch* (*human repeated insult patch test – HRIPT*) é o mais utilizado internacionalmente (THYSSEN et al., 2012). Durante 3 semanas, com cerca de 3 aplicações por semana, os voluntários são expostos à substância química, seguido de um período de 2 semanas de descanso (THYSSEN et al., 2012). A fase de desafio é realizada com o *patch* teste por 24 ou 48 h e a reação resultante é classificada pelos sinais clínicos (THYSSEN et al., 2012). O teste pode ser realizado de diversas maneiras, com mudanças nos tempos de exposição e métodos de oclusão, mas normalmente é realizado com um número grande de voluntários, geralmente cerca de 100 (THYSSEN et al., 2012).

O SCCFNP (*Scientific Committee on Cosmetic Products and non-Food Products Intended For Consumers*, 2000) recomenda o uso de 150-200 voluntários para o ensaio HRIPT, exceto para o ensaio humano de maximização, o qual necessita de 25 voluntários, mas que ainda não é aceito, por causar dano à pele dos voluntários, devido à etapa de maximização, utilizando um agente irritante (SCCFNP, 2000).

Em termos regulatórios, a ANVISA requer o ensaio clínico de sensibilização como parte dos ensaios de compatibilidade do produto (BRASIL, 2012a). O ensaio de sensibilização é composto das etapas de indução, repouso e desafio, realizadas com apósitos oclusivos ou semi-occlusivos, em antebraço ou dorso, em no mínimo 50 voluntários e deve ser realizado segundo a escala do ICDRG (*International Contact Dermatitis Research Group*) (BRASIL, 2012a) a qual varia de 0 a 4 (0, sem reação; 1: eritema ligeiro ou fraco; 2: eritema claro; 3: eritema + edema + pápula; 4: eritema + edema + pápula + bolha) (MARZULLI; MAIBACH, 1976; FISHER, 1995).

2.3.3.4 Processos dependentes do sistema imunológico e influenciados pela radiação UV: Fotossensibilização cutânea

A fotoalergia é uma reação imunologicamente mediada a uma substância e iniciada pela formação de um fotoproduto, após uma reação fotoquímica (ICH, 2013). A manifestação clínica da fotossensibilização cutânea é a dermatite de contato fotoalérgica (LIEBSCH et al., 2005).

Existem dois mecanismos propostos para a conversão de uma substância química (hapteno) em uma substância imunologicamente ativa, um fotoalérgeno e, conseqüentemente, o desenvolvimento da fotossensibilização cutânea (DEAN et al., 1994).

No primeiro, o fotossensibilizante absorve a luz e atinge o estado excitado. Quando o elétron volta para o estado fundamental, ele libera energia suficiente para se conjugar com uma proteína, gerando um antígeno (DEAN et al., 1994). No segundo, o fotossensibilizante absorve a luz, atinge o estado excitado e libera energia, formando um fotoproduto estável, o hapteno (DEAN et al., 1994). Quando esse hapteno é conjugado com uma proteína, ele forma um antígeno completo (DEAN et al., 1994). A partir de então, a reação imunológica subsequente é a mesma que ocorre na DCA (ONOUÉ et al., 2017).

Embora o processo fotoalérgico seja muito semelhante ao observado o processo alérgico (DCA), há também a dificuldade na discriminação entre as reações fotoalérgicas e fototóxicas, uma vez que muitas drogas são capazes de causar ambas as reações, além de ambas as reações apresentarem características clínicas e histológicas muito parecidas (DEAN et al., 1994).

Em relação às diferenças entre a fotoalergia e a fototoxicidade, destaca-se que a fotoalergia tem uma incidência menor que a fototoxicidade, além de requerer quantidade menor de substância e de luz para ocasionar a reação, mais tempo e mais de um contato com a substância para ser desenvolvida (SPIELMANN et al., 2000).

O método alternativo mais promissor para a fotossensibilização cutânea seria o foto-LLNA (*Photo-Local Lymph Node Assay*). Considerando que a versão sem luz do ensaio (LLNA) já é considerada o padrão ouro para sensibilização cutânea, a adaptação para a inclusão da irradiação é considerada possível (LIEBSCH et al., 2005; ULRICH; HOMEY; VOHR, 1998; HOMEY et al., 1998). Entretanto, este método ainda é apenas baseado no refinamento de testes em animais.

Em relação aos métodos *in vitro*, a triagem dos fotossensibilizantes pode ser feita utilizando os métodos propostos pelo ICH (2013) descritos anteriormente para a fototoxicidade, ou seja, a avaliação do coeficiente de absorvidade molar, o ensaio do ROS e o 3T3 NRU PT, os quais não são capazes de discriminar o mecanismo da fototoxicidade (LIEBSCH et al., 2005), ou seja, se o evento ocorreu devido à uma substância fototóxica ou fotoalérgica.

Em termos de substituição animal, alguns artigos revisaram e descreveram testes *in vitro* descritos na literatura para fotossensibilização cutânea (ONOUÉ et al., 2017; OEDA et al. 2016), tais como a modificação do teste h-CLAT e o ensaio de ativação de células dendríticas (HINO et al., 2008; HOYA et al., 2009; KARSCHUK et al., 2010); apresentaram ainda ensaios ligados à produção de IL-18 por cultura de queratinócitos (GALBIATI *et al.*, 2014), o ensaio de apoptose utilizando queratinócitos HaCaT (KURITA et al., 2007), o ensaio *in vitro* de fotoligação à albumina sérica humana (LOVELL; JONES, 2000), além do ensaio baseado em mudanças de grupamentos tiol e amina de superfície celular de células THP-1 (OEDA et al. 2016). Entretanto, nenhum desses testes é realizado em modelo de pele, o que não permite a mimetização da função barreira da pele, bem como limita a utilização de substâncias lipofílicas, tais como filtros solares.

Em relação aos ensaios clínicos, ainda não existe uma metodologia padronizada para a realização do *fotopatch* teste para a fotoalergia, embora alguns grupos tenham se esforçado para a padronização, tais como as diretrizes emitidas pelo *British Photodermatology Group* (BPG, 1997) (BRYDEN et al., 2006).

Segundo o BPG (1997), as técnicas de *patch* teste são usadas, exceto pelo fato que os alérgenos são aplicados em duplicata (irradiado e não irradiado). É realizada a irradiação com dose de UVA suficiente para ativar a resposta fotoalérgica, sem induzir o eritema ou a resposta fototóxica, ou seja, geralmente 5-10 J/cm² (BPG, 1997).

No protocolo de maximização descrito por Kaidbey e Kligman (1980), as substâncias são aplicadas por 24 h, seguido pela exposição à irradiação correspondente a 3 DME, duas vezes por semana, por 3 semanas, em 25 voluntários. Os voluntários são desafiados 2 semanas depois com 4 J/cm² de UVA. As reações são avaliadas 48 e 72 h depois (KAIDBEY; KLIGMAN, 1980).

O ensaio de fotoalergia também faz parte dos ensaios de compatibilidade recomendados pela ANVISA (BRASIL, 2012a). O ensaio de fotoalergia visa comprovar a ausência do potencial alergênico e deve ser realizado com uma série de aplicações em, no mínimo 25 voluntários, seguindo a interpretação do ICDRG (*International Contact Dermatitis Research Group*). O local deve ser irradiado e o ensaio deve contemplar as fases de indução, repouso e desafio (BRASIL, 2012a).

3. Objetivo

3.1. Objetivo geral

O objetivo desse estudo foi avaliar a sensibilização cutânea de filtros solares por métodos *in vitro*.

3.2. Objetivos específicos

- Realizar os ensaios *in vitro* em modelos de pele para a avaliação da irritação cutânea;
- Realizar o ensaio *in chemico* DPRA para avaliação da sensibilização cutânea;
- Realizar os ensaios *in vitro* em modelos de pele contendo ou não linfócitos T para a avaliação de sensibilização cutânea;
- Realizar os ensaios *in vitro* em modelos de pele para a avaliação da fototoxicidade;
- Realizar os ensaios *in vitro* em modelos de pele para a avaliação da fotossensibilização cutânea.

4. Material e Métodos

4.1 Material

4.1.1 Matérias-primas e reagentes

Abaixo estão listadas as matérias-primas utilizadas e o fornecedor e, quando necessário, o nome comercial.

- 1-butanol – Sigma–Aldrich (Saint Louis, EUA);
- 2,3-butanodiona – Sigma–Aldrich (Saint Louis, EUA);
- 2,4-dinitroclorobenzeno - Sigma–Aldrich (Saint Louis, EUA);
- 4-metoxiacetofenona – Sigma–Aldrich (Saint Louis, EUA);
- 6-metilcumarina – Sigma–Aldrich (Saint Louis, EUA);
- Acetato de amônio - Synth (Diadema, Brasil);
- Acetonitrila, grau HPLC JT Baker (Center Valley, EUA).
- Ácido láctico – Sigma–Aldrich (Saint Louis, EUA);
- Ácido trifluoroacético (TFA, 99%) Sigma–Aldrich (Saint Louis, EUA);
- Água destilada e deionizada;
- Álcool etílico (etanol) PA - Synth (Diadema, Brasil);
- Álcool isopropílico (isopropanol) PA - Synth (Diadema, Brasil);
- Aldeído cinâmico – Sigma–Aldrich (Saint Louis, EUA);
- Anticorpos de captura e de detecção para IL-1 α R&D Systems (Minneapolis, EUA);
- Avobenzona (butyl methoxydibenzoylmethane) - Neo heliopan 357 - Symrise (Holzminden, Alemanha);
- Beads anti-CD3/CD28 (Life Technologies, Darmstadt, Alemanha);
- Benzilidenoacetona – Sigma–Aldrich (Saint Louis, EUA);
- Benzoato de alquila C12-15 – Crodamol AB – Croda (Snaith, Reino Unido);
- Benzofenona-3 (benzophenone-3) - Neo heliopan BB- Symrise (Holzminden, Alemanha);
- Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio - Sigma–Aldrich (Saint Louis, EUA).
- Cloreto de cálcio - Synth (Diadema, Brasil);
- Cloreto de magnésio - Synth (Diadema, Brasil);
- Cloreto de potássio - Synth (Diadema, Brasil);
- Cloreto de sódio - Synth (Diadema, Brasil);
- Colagenase - Gibco - Life Technologies (Grand Carlsbad, EUA)
- Colágeno tipo I – Corning (Tewksbury, EUA)

- Dimetilsulfóxido (DMSO) - Sigma–Aldrich (Saint Louis, EUA);
- Dispase II - Roche Life Sciences (Branford, EUA)
- Dodecil sulfato de sódio Synth (Diadema, Brasil).
- Farnesal – Sigma–Aldrich (Saint Louis, EUA);
- Formaldeído – Sigma–Aldrich (Saint Louis, EUA);
- Formaldeído (37 %) – Synth (Diadema, Brasil);
- Fosfato de sódio dibásico heptaidratado - Synth (Diadema, Brasil);
- Fosfato de sódio monobásico monoidratado - Synth (Diadema, Brasil);
- Heptapeptídeo contendo cisteína (Ac-RFAACAA-COOH, CIS) - RS Synthesis (Louisville, EUA);
- Heptapeptídeo contendo lisina (Ac-RFAAKAACOOH, LIS) RS Synthesis (Louisville, EUA);
- Hidróxido de amônio - Synth (Diadema, Brasil);
- Kit de ELISA para IL-18 RayBiotech (Norcross, EUA);
- Kit de ELISA para IL-6 eBioscience (San Diego, EUA);
- Kit de ELISA para IL-8 eBioscience (San Diego, EUA);
- L-Glutamina - Sigma–Aldrich (Saint Louis, EUA);
- Meio de cultura DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium), LGC Biotecnologia (Cotia, Brasil);
- Meio de cultura KGM (*Keratinocyte growth medium*) Gold BulletKit - Lonza (Walkersville, EUA);
- Meio de cultura MGM-4 (*Melanocyte growth medium-4*) BulletKit - Lonza (Walkersville, EUA);
- Octocrileno (octocrylene) - Neo heliopan 303 - Symrise (Holzminden, Alemanha);
- Oxazolona – Sigma–Aldrich (Saint Louis, EUA);
- Penicilina/Streptomicina - Sigma–Aldrich (Saint Louis, EUA);
- Soro bovino fetal – Gibco (Gibco, Life Technologies, Grand Carlsbad, EUA);
- Tripsina - Sigma–Aldrich (Saint Louis, EUA).

4.1.2 Equipamentos e acessórios

- Agitador de microplacas, MTS 4 IKA, Schuttler;
- Balança analítica OHAUS, modelo PA214CP;
- Balança semi analítica Marte, modelo BL3200H;

- Banho Ultrassônico Unique USC-750;
- Banho-maria Solab SL-150;
- Cabine de Segurança Biológica Classe II, PA 410, Pachane;
- Centrífuga Hermle Z383K;
- Centrífuga Solab SL-700;
- Coluna cromatográfica de fase reversa Agilent Eclipse Plus C18 (3.5 μm , 100 x 2.1 mm);
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu SCL-20A, acoplado a um sistema de bombas LC-20AT, detector UV Vis SPD-20A e auto-injetor SIL-20A HT;
- Grade de aço inoxidável;
- Incubadora de CO₂ Thermo, Forma Series II Water Jacket;
- Incubadora de CO₂, Thermo Scientific, Forma Series II Water-Jacket;
- Insertos de 12 poços Corning;
- Insertos de 6 poços Corning;
- Leitor de microplacas FLUOstar OPTIMA BMG Labtech;
- Leitor de microplacas SilvyaByotech Synergy HT;
- Leitor de microplacas SpectraMax Plus 384, Molecular Devices;
- Leitor de microplacas, μ Quant, Bio-Tec Instruments;
- Materiais descartáveis em geral para cultura de células;
- Microscópio invertido Carl Zeiss Axiovert 135;
- Microscópio invertido Carl Zeiss Primovert;
- Papel de filtro 15 cm de diâmetro e 25 μm de porosidade;
- Peagômetro MS Tecnopan, modelo mPA-210;
- Pipetador automático Kasvi;
- Pipetas automáticas;
- Radiômetro Dr. Hönle AG UV Technology;
- Simulador Solar SOL-500 Dr. Hönle AG;
- Vidrarias em geral.

4.2 Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP (CAAE: 38843314.3.0000.5403). A carta de aprovação do Comitê de Ética, bem como os termos de

consentimento livre e esclarecido, os termos de armazenamento de amostras biológicas e o termo de assentimento encontram-se nos anexos 1-7 do presente trabalho.

4.3 Métodos

Os métodos estão divididos em quatro etapas (Tabela 2). Na primeira, os filtros solares foram submetidos ao ensaio de irritação cutânea, com a quantificação da viabilidade celular e liberação de IL-1 α . A seguir, foi realizada a avaliação da sensibilização cutânea, com o ensaio *in chemico* DPRA, seguido pelo ensaio *in vitro* de sensibilização cutânea em modelos de pele contendo ou não linfócitos T, com a quantificação de viabilidade celular e liberação de IL-6, IL-8 e IL-18. Foram então realizadas as etapas de avaliação *in vitro* da fototoxicidade, com a quantificação de viabilidade celular, e da fotossensibilização cutânea, com a quantificação de viabilidade celular e liberação de IL-18, ambas as etapas após a exposição dos modelos à radiação UVA.

Tabela 2: Descrição das etapas realizadas no presente projeto. AC: aldeído cinâmico; SDS: dodecil sulfato de sódio; DNCB: dinitroclorobenzeno; CETO: Cetoprofeno; BERG: Óleo de bergamota; AVO: avobenzona; BZF-3: benzofenona-3; OCT: octocrileno.

(Etapa) Desfecho	Métodos	Substâncias analisadas								
		Controles					Filtros solares			
		AC	SDS	DNCB	CETO	BERG	AVO	BZF-3	OCT	
(1) Irritação cutânea	Modelos de pele reconstituída: viabilidade celular e dosagem da liberação de IL-1 α		X	X				X	X	
	DPR: depleção de cisteína e lisina	X	X	X				X	X	X
(2) Sensibilização cutânea	Modelos de pele reconstituída contendo ou não linfócitos T: viabilidade celular e dosagem da liberação de IL-6, IL-8 e IL-18		X	X				X	X	X
(3) Fototoxicidade	Modelos de pele reconstituída: viabilidade celular				X	X		X		
(4) Fotossensibilização cutânea	Modelos de pele reconstituída: viabilidade celular e dosagem da liberação de IL-18				X	X		X		

4.3.1 Ensaio de irritação cutânea *in vitro* utilizando modelo tridimensional de pele reconstituída

O ensaio de irritação cutânea *in vitro* utilizando modelo tridimensional de pele reconstituída foi baseado no estudo de Dos Santos et al. (2011), o qual pontua o papel claro da irritação cutânea na dermatite de contato alérgica, uma vez que existe uma correlação entre a força de um sensibilizante e seu potencial irritante (DOS SANTOS et al., 2011; SPIEKSTRA et al., 2009).

Esse teste avalia a viabilidade da epiderme por ensaio de MTT e por liberação de IL-1 α , sendo que quanto mais irritante for uma substância, menor será a sua atividade metabólica, menor será a viabilidade celular e maior será a quantidade de IL-1 α liberada.

4.3.1.1 Modelo de pele reconstituída

O modelo de pele reconstituída desta etapa foi desenvolvido segundo Pennacchi et al. (2015), em colaboração com a Profa. Dra. Silvyta Stuchi Maria-Engler, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Queratinócitos, fibroblastos e melanócitos humanos isolados de prepúcio foram mantidos em cultura utilizando meio DMEM/Ham F12 (3:1) suplementado com fatores de crescimento e com Amp/Strep (ampicilina/estreptomicina).

O modelo de pele reconstituída foi desenvolvido segundo Pennacchi et al. (2015), no qual equivalentes dérmicos foram preparados com fibroblastos e matriz de colágeno tipo I. Após a polimerização do equivalente dérmico, queratinócitos e melanócitos foram adicionados acima da camada dérmica. Após a contração da matriz de colágeno, a estrutura foi transferida para uma grelha de aço em uma placa de 6 poços e mantida com o meio para o crescimento de queratinócitos preparado no laboratório. Posteriormente, esses modelos foram cultivados com meio RAFT (contendo DMEM, HAM F12, insulina, hidrocortisona, apo-transferrina, toxina colérica e fator de crescimento epidérmico) em uma interface ar-líquido por duas semanas para a formação do estrato córneo (PENNACCHI et al., 2015).

Todas as culturas de queratinócitos foram mantidas à 37°C, em atmosfera de 7,5% de CO₂ (BROHEM et al., 2012).

4.3.1.2 Histologia

Secções de 5 µm da epiderme reconstituída tratadas ou não com as substâncias em estudo foram coradas com Hematoxilina/Eosina e analisadas histologicamente quanto à sua morfologia, esperando-se observar uma morfologia semelhante à pele humana, com uma epiderme estratificada e diferenciada.

4.3.1.3 Ensaio de irritação cutânea

4.3.1.3.1 Exposição às substâncias teste

Os modelos de pele foram expostos aos filtros solares avobenzona ou benzonfenona-3, solubilizados em benzoato de alquila (10% p/v) (GASPAR et al., 2013). Discos de papel de filtro de 7 mm foram impregnados com as substâncias químicas ou com o veículo e foram aplicados topicamente no estrato córneo. Os modelos foram incubados durante 1 h.

Foram utilizados como controle irritante dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10 % em PBS e como controle sensibilizante o dinitroclorobenzeno (DNCB) a 10 % em benzoato de alquila.

Após 1 h de exposição química, os modelos de pele reconstituída foram lavados com PBS e secados com um *swab* estéril, em seguida foram incubados por 24 h. Após esse período, foi coletado o sobrenadante para a análise de IL-1 α e foi realizado o ensaio com MTT.

4.3.1.3.2 Ensaio de viabilidade celular por MTT ((brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio)

O ensaio MTT baseia-se na capacidade de uma enzima desidrogenase mitocondrial das células viáveis em decompor os anéis de tetrazólio da solução amarela de reagente MTT e formar cristais de formazan, de cor azul escura (MOSMANN, 1983). Portanto, o ensaio de MTT mede a atividade mitocondrial, que é representativo para a viabilidade celular, por meio da quantificação da atividade de desidrogenase.

Após as 24 h de incubação, 7 mL de uma solução de MTT em PBS (1 mg/mL) foi adicionada em cada poço de uma placa de 6 poços. Os modelos de pele foram então transferidos para a placa com a solução de MTT e essas placas foram incubadas por 3 horas, em estufa de 5% de CO₂ e ao abrigo da luz, para permitir a formação dos cristais de formazan (precipitado). Esses cristais foram dissolvidos em isopropanol à temperatura ambiente (GASPAR et al., 2013). A absorbância de cada poço foi lida por um leitor de microplaca em 450 nm.

4.3.1.3.3 Quantificação de IL-1 α por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

A concentração de IL-1 α presente no sobrenadante foi determinada por ELISA, segundo o procedimento descrito por Spiekstra, Breetveld e Rustemeyer (2007). O sobrenadante das culturas (1,0 mL / cultura) foi recolhido após 24 horas da exposição às substâncias químicas e armazenado a -80°C até posterior análise por ELISA, segundo o procedimento: Placas de 96 poços foram incubadas com 100 μ L da solução de anticorpo de captura por poço, 2 μ g/mL, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz durante a noite. Após lavagem, as placas foram bloqueadas com 300 μ L de uma solução 1% de soroalbumina bovina em PBS. Após 1h, as placas foram lavadas e incubadas por 2 h com 100 μ L da solução padrão ou da amostra por poço. Após a incubação, as placas foram lavadas e incubadas com 100 μ L da solução do anticorpo de detecção a 0,4 μ g/mL em cada poço. A seguir, as placas foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente e depois novamente lavadas. Foram adicionados mais 100 μ L da solução de Estreptavidina-HRP a cada poço, com incubação por 20 minutos e depois novamente lavadas. Após lavagem, foram adicionados 100 μ L da solução de substrato a cada poço e as placas foram incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente. Foram, então, adicionados 50 μ L solução de parada (STOP) em cada poço. As placas foram agitadas a 100

rpm para assegurar uma mistura completa. A densidade óptica de cada poço foi determinada imediatamente, usando um leitor de microplacas fixado para 450 nm.

4.3.2 Avaliação da sensibilização cutânea

4.3.2.1 Substâncias

Uma vez que é descrito na literatura que os filtros solares podem causar reações alérgicas à população (SCHAUDER; IPPEN, 1997; NASH, 2006; SARASWAT, 2012), além dos dois filtros selecionados anteriormente no ensaio de irritação cutânea, foi utilizado também o filtro solar octocrileno, devido à sua relevância clínica como alérgeno emergente (AVENEL-AUDRAN, 2010).

4.3.2.2 Ensaio *in chemico* de depleção de peptídeos (Direct Peptide Reactivity Assay - DPRA)

4.3.2.2.1 Curva de padronização

O ensaio foi realizado de acordo com o TG 442C (OECD, 2015a). As curvas de padronização foram elaboradas a partir dos dados obtidos pela análise das soluções de uso, obtidas a partir da solução estoque das substâncias, na faixa de 0,0167 mM a 0,534 mM dos peptídeos. As diluições foram realizadas em triplicata e foram preparadas usando o tampão de diluição, que continha 8 mL de tampão (pH 7,5 para a cisteína e pH 10,2 para a lisina) e 2 mL de acetonitrila (OECD, 2015a).

Todas as diluições utilizadas para ambas as curvas foram centrifugadas por 40 min a 400 xg.

4.3.2.2.2 Soluções de reação

As soluções foram preparadas em triplicata conforme descrito por Gerberick et al. (2004, 2007) e pela OECD TG 442C (2015a). Foi preparada uma solução estoque das substâncias teste em acetonitrila : DMSO (50 : 50) para os filtros solares em estudo (100 mM), além de uma solução estoque de peptídeos (0,667 mM), preparada em tampão fosfato (100 mM, pH 7,5) para a cisteína e em tampão acetato de amônio (100 mM, pH 10,2) para a lisina.

As soluções de reação foram preparadas usando 750 µL de solução estoque de cisteína, 200 µL de acetonitrila e 50 µL da solução estoque das substâncias teste (razão 1:10; 0,5 mM peptídeo cisteína : 5 mM substância teste) e 750 µL de solução estoque de lisina e 250 µL de solução estoque das substâncias teste (razão 1:50, 0,5 mM peptídeo lisina : 25 mM substância teste).

4.3.2.2.3 Análise cromatográfica

As soluções de reação foram preparadas em frascos de vidro e incubadas por 24 h a temperatura ambiente e protegidas da luz. Após 24 h de reação, as soluções de reação centrifugadas por 40 min a 400 xg. A seguir, as soluções de reação foram quantificadas por análise em cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) com detecção a 220 nm, usando uma coluna C18 (3,5 µm, 100 x 2,1 mm) como fase estacionária. A fase móvel usada foi 0,1% de ácido trifluoroacético em água (solvente A) e 0,085% de ácido trifluoroacético em acetonitrila (solvente B). Foi utilizado um gradiente de 90% a 10% (solvente A), desenvolvido por 20 min, a um fluxo de 0,35 mL/min (OECD, 2015a).

4.3.2.2.4 Análise da depleção dos peptídeos

A porcentagem de depleção dos peptídeos foi determinada pela redução da concentração dos peptídeos nas amostras, em relação aos respectivos controles (amostras contendo peptídeos, mas não as substâncias testes). Os resultados foram analisados de acordo com os modelos de predição recomendados pela OECD TG 442C (2015a), os quais levam em consideração a média da depleção da cisteína e lisina (Modelo 1 - Tabela 3) e apenas a depleção de cisteína (Modelo 2 - Tabela 4).

Tabela 3: Modelo de predição baseado na depleção dos peptídeos cisteína (CIS) e lisina (LIS) (OECD, 2015a).

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

Fonte: OECD, 2015a.

Tabela 4: Modelo de predição baseado na depleção do peptídeo cisteína (CIS) (OECD, 2015a).

Depleção de Cisteína (CIS) (%)	Classe de reatividade	Predição do teste
$0\% \leq \% \text{ Depleção CIS} \leq 13,89\%$	Nenhuma ou mínima reatividade	Negativo
$13,89\% \leq \text{Depleção CIS} \leq 23,09\%$	Baixa reatividade	
$23,09\% \leq \text{Depleção CIS} \leq 98,24\%$	Moderada reatividade	Positivo
$98,24\% \leq \text{Depleção CIS} \leq 100\%$	Alta reatividade	

Fonte: OECD, 2015a.

4.3.2.2.5 Ensaio de proficiência da técnica do DPRA

De acordo com o protocolo descrito pela OECD (2015a), foi realizado um ensaio de proficiência com 10 substâncias, necessário para garantir a qualidade do método. As substâncias estão descritas na Tabela 5, com os valores de predição esperados para o DPRA para cisteína e lisina. Na realização do ensaio, deve-se obter resultados dentro dos previstos para pelo menos 8 das 10 substâncias da Tabela 5. Essas substâncias foram selecionadas pela OECD TG 442C (2015a) uma vez que representam toda a faixa de respostas para a sensibilização cutânea. Além disso, são comercialmente disponíveis e apresentam dados de referência *in vivo* de alta qualidade, bem como dados disponíveis *in vitro* de alta qualidade, gerados pelo DPRA. Essas substâncias também foram usadas no estudo de validação da ECVAM-EURL (*European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing* - OECD, 2015a).

O ensaio foi realizado conforme descrito nos itens **4.3.2.2.2** a **4.3.2.2.4**.

Tabela 5: Substâncias de proficiência recomendadas para a demonstração da proficiência técnica do DPRA (OECD 2015a).

Substância de proficiência	Predição <i>in vivo</i> ¹	Predição em DPRA ²	Faixa de depleção de cisteína ³	Faixa de depleção de lisina ³
2,4-dinitroclorobenzeno	Sensibilizante (extremo)	Positivo	90-100	15-45
Oxazolona	Sensibilizante (extremo)	Positivo	60-80	10-55
Formaldeído	Sensibilizante (forte)	Positivo	30-60	0-24
Benzilidenoacetona	Sensibilizante (moderado)	Positivo	80-100	0-7
Farnesal	Sensibilizante (fraco)	Positivo	15-55	0-25
2,3-butanodiona	Sensibilizante (fraco)	Positivo	60-100	10-45
1-butanol	Não sensibilizante	Negativo	0-7	0-5,5
6-metilcumarina	Não sensibilizante	Negativo	0-7	0-5,5
Ácido láctico	Não sensibilizante	Negativo	0-7	0-5,5
4-metoxiacetofenona	Não sensibilizante	Negativo	0-7	0-5,5

Fonte: OECD, 2015a.

¹Dados fornecidos pela OECD, nos quais a predição foi baseada pelo LLNA (NATSCH et al., 2013). A potência *in vivo* foi derivada usando os critérios propostos pelo ECETOC (2003).

²A predição pelo DPRA deve ser considerada no âmbito da IATA, conforme descrito pela OECD (2015a).

³Faixas determinadas pela OECD (2015a) em pelo menos 10 valores de depleção gerados por 6 laboratórios independentes.

4.3.2.3 Avaliação da sensibilização cutânea nos modelos de pele reconstituída contendo ou não linfócitos T

4.3.2.3.1 Modelos de pele reconstituída

Os modelos de pele reconstituída foram desenvolvidos conforme descrito por Wallmeyer et al. (2015) e Kùchler et al. (2011), em colaboração com a Profa Sarah Hedtrich, do Institute for Pharmacy da Freie Universität, Berlin, após a aprovação do respectivo Comitê de Ética. Os fibroblastos e queratinócitos foram obtidos de cirurgia de fimose e cultivados por cinco dias com meio para crescimento de fibroblastos (DMEM) e meio para crescimento de queratinócitos (KGM), respectivamente.

Após as placas de cultura atingirem 80 % de confluência, foi preparada uma suspensão de fibroblastos em colágeno tipo I, a qual foi incubada em insertos de 24 mm para placas de 6 poços em 37°C por 2 h, para a formação do equivalente dérmico. Os queratinócitos foram adicionados no equivalente dérmico e mantidos com o meio para o crescimento de queratinócitos preparado no laboratório por 24 h (WALLMEYER et al., 2015; KÜCHLER et al., 2011). A seguir, o sistema foi tratado com meio para diferenciação dos queratinócitos e exposto a uma interface ar-líquido por um período de 7 dias, para a formação do estrato córneo.

- a) **histologia:** Secções dos modelos de pele de 8 µm foram coradas hematoxilina-eosina e a morfologia foi analisada, a qual deveria ser similar à pele humana, contendo uma epiderme diferenciada e estratificada;
- b) **exposição às substâncias teste:** Os modelos de pele foram expostos aos filtros solares avobenzona, benzofenona-3 e octocrileno, solubilizados em benzoato de alquila (veículo; 10% p/v) (GASPAR et al., 2013). Discos de papel filtro de 16 mm foram impregnados com 50 µL das soluções das substâncias teste ou com o veículo e aplicados no estrato córneo dos modelos de pele. Vinte e quatro horas após a exposição, 1 mL do meio de cultura de cada modelo foi colhido e armazenado em -80°C até posterior análise da liberação das citocinas IL-8, IL-6, e IL-18 por ELISA. Os modelos então foram lavados com PBS, secos com swab estéril e o meio de cultura foi trocado. Após 42 h de incubação os modelos foram submetidos a análise da viabilidade celular por ensaio de captação do MTT. Os controles utilizados foram SDS (irritante) a 1% (em PBS) e dinitroclorobenzeno (DNCB - sensibilizante) a 1% (em benzoato de alquila);
- c) **ensaio de viabilidade celular por MTT ((brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio):** Quarenta e duas horas após a exposição, os modelos de pele foram incubados a 37°C com 4 mL do meio contendo MTT (1 mg/mL) por 3 h. Os cristais de formazan foram extraídos por 2 h com 4 mL de isopropanol e as placas foram então lidas a 570 nm (GASPAR et al., 2013). A porcentagem de viabilidade celular foi calculada comparando os modelos contendo substâncias teste em relação aos modelos não tratados (controle negativo).
- d) **quantificação das citocinas por ELISA:** Alguns autores têm sugerido modelos de predição para a sensibilização cutânea correlacionando a produção de certas citocinas com a viabilidade celular, tais como IL-6 (JUNG, 2016), IL-8 (BAE et al., 2015) e IL-18 (GALBIATI et al., 2014; ANDRES et al., 2016; GIBBS et al., 2013). Assim, foi coletado 1 mL de sobrenadante de cada modelo 24 h após a exposição do modelo às substâncias para detectar a quantidade de IL-8, IL-6 e IL-18 pelo ensaio de ELISA

(*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), como descrito por Spiekstra, Breetveld e Rustemeyer (2007) e Van den Bogaard et al. (2014), de acordo com as instruções do fabricante. Os seguintes reagentes foram adicionados a cada poço, após lavagem da placa, a qual, após cada aplicação, foi incubada à temperatura ambiente e ao abrigo da luz: amostra ou dos padrões (2 horas), anticorpo de detecção diluído (2 horas), solução de trabalho de Estreptavidina-HRP (20 minutos), solução de substrato (20 minutos), solução de parada (STOP). As placas foram agitadas suavemente para assegurar uma mistura completa. A densidade óptica de cada poço foi determinada imediatamente, usando um leitor de microplacas fixado para 450 nm e os resultados foram calculados de acordo com a curva padrão e apresentados em pg/mL. Além disso, os dados obtidos para a liberação das citocinas foram relacionados à viabilidade celular, conforme descrito anteriormente.

4.3.2.3.2 Modelos de pele reconstituída contendo linfócitos T

De acordo com Van den Bogaard et al. (2014), linfócitos T naïve foram purificados do sangue humano periférico por seleção negativa. Após esse procedimento, as células foram ativadas com anti-CD3/CD28-beads e incubadas a 37° C com 5% de CO₂. Após 24 h, os linfócitos T foram adicionadas aos modelos de pele, os quais estavam no 6° dia, sendo então cultivados por mais dois dias. No primeiro dia subsequente foi realizada a exposição às substâncias químicas e no segundo dia foi realizado o ensaio de viabilidade celular por MTT.

- a) **histologia:** Secções dos modelos de pele de 8 µm foram coradas hematoxilina-eosina e a morfologia foi analisada, a qual deveria ser similar à pele humana, contendo uma epiderme diferenciada e estratificada, bem como deveria conter os linfócitos T;
- b) **exposição às substâncias teste:** Vinte e quatro horas após a incorporação dos linfócitos T nos modelos de pele, os modelos foram expostos aos filtros UV avobenzona, benzofenona-3 e octocrileno, solubilizados em benzoato de alquila (veículo; 10% p/v). Discos de papel filtro de 16 mm foram impregnados com 50 µL das soluções das substâncias teste ou com o veículo e aplicados no estrato córneo dos modelos de pele. Vinte e quatro horas após a exposição às substâncias, o meio de cultura de cada modelo foi coletado e armazenado em -80°C até posterior análise da liberação das citocinas IL-8, IL-6, e IL-18 por ELISA. Os modelos então foram lavados com PBS, secos com swab estéril e o meio de cultura foi trocado. A seguir, os modelos foram submetidos a análise da viabilidade celular por ensaio de captação do MTT. Os controles utilizados foram

SDS (irritante) a 1% em PBS e dinitroclorobenzeno (DNCB - sensibilizante), a 1% em benzoato de alquila. O ensaio de viabilidade celular por MTT foi realizado conforme descrito no item **4.3.2.3.1.c** e a quantificação das citocinas por ELISA foi realizado conforme descrito no item **4.3.2.3.1.d**.

4.3.3 Ensaio *in vitro* de fototoxicidade e fotossensibilização cutânea nos modelos de pele reconstituída

4.3.3.1 Modelos de pele reconstituída

Os modelos de pele reconstituída foram desenvolvidos conforme descrito por Wallmeyer et al. (2015) e KÜCHLER et al. (2011). Os fibroblastos e queratinócitos foram obtidos de cirurgia de fimose e cultivados por cinco dias com meio para crescimento de fibroblastos e meio para crescimento de queratinócitos, respectivamente.

Após as placas de cultura atingirem 80 % de confluência, foi preparada uma suspensão de fibroblastos em colágeno tipo I, a qual foi incubada em insertos de 24 mm para placas de 6 poços em 37°C por 2 h, para a formação do equivalente dérmico. Os queratinócitos foram adicionados no equivalente dérmico e mantidos com o meio para o crescimento de queratinócitos preparado no laboratório por 24 h (WALLMEYER et al., 2015; KÜCHLER et al., 2011). A seguir, o sistema foi tratado com meio para diferenciação dos queratinócitos, RAFT (contendo DMEM, HAM F12, insulina, hidrocortisona, apo-transferrina, toxina colérica e fator de crescimento epidérmico) e exposto a uma interface ar-líquido, o qual foi mantido em cultivo por 12 dias, para a formação do estrato córneo.

4.3.3.2 Avaliação da fototoxicidade nos modelos de pele reconstituída: exposição às substâncias teste e irradiação

Os modelos de pele foram expostos aos controles positivos óleo de bergamota (10%), cetoprofeno (3%), ao veículo benzoato de alquila C12-15, ou ao filtro solar avobenzona solubilizados no veículo. Discos de papel filtro de 16 mm foram impregnados com 50 µL das soluções das substâncias teste ou com o veículo e aplicados no estrato córneo dos modelos de pele.

Vinte e quatro horas após a exposição dos modelos às substâncias em estudo, estes foram lavados com PBS, secos com swab estéril e irradiados com 6 J/cm² (7 mW/ cm² por aproximadamente 14 min) (GASPAR et al., 2013; KEJLOVÁ et al., 2007). A seguir, os tecidos foram novamente lavados e secos, sendo então incubados por 24 h a 37°C.

No dia seguinte, foi realizado o ensaio de MTT para avaliação da viabilidade celular, conforme descrito no item **4.3.2.3.1.c**.

A porcentagem de viabilidade celular dos modelos submetidos à irradiação (+UV) foi comparada com os protegidos da irradiação (-UV). Os resultados de viabilidade foram utilizados no item a seguir para o cálculo da fotossensibilização cutânea.

4.3.3.3 Avaliação da fotossensibilização nos modelos de pele reconstituída: exposição às substâncias teste, irradiação e ensaio de viabilidade celular

Antes da análise da viabilidade celular descrita no item **4.3.3.2**, foi colhido o meio de cultura de cada tecido exposto às substâncias em estudo e à radiação UV, conforme protocolo descrito no item **4.3.2.3.1.c**. para posterior análise da liberação de IL-18 por ELISA, conforme descrito no item **4.3.2.3.1.d**.

Além disso foi calculada, para cada substância (+UV), a porcentagem de produção de IL-18 em relação ao modelo não irradiado (-UV). Foi calculada a razão entre a porcentagem de produção de IL-18 e a porcentagem de viabilidade celular (IL-18/viabilidade celular).

5. Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaio de irritação cutânea *in vitro* utilizando modelo de pele reconstituída

5.1.1 Controle de qualidade histológico modelos de pele reconstituída

O modelo de pele reconstituída desenvolvido no presente projeto, em tamanho real e os cortes histológicos com diferentes aumentos, está apresentado na Figura 10. Os modelos expostos aos controles positivos SDS e DNCB estão apresentados na Figura 11 e os modelos expostos às substâncias em estudo, na Figura 12.

Figura 10. Modelo de pele reconstituída utilizada no ensaio de irritação cutânea: tamanho real; corte histológico com aumento de 10x; aumento de 20x; aumento de 40x.

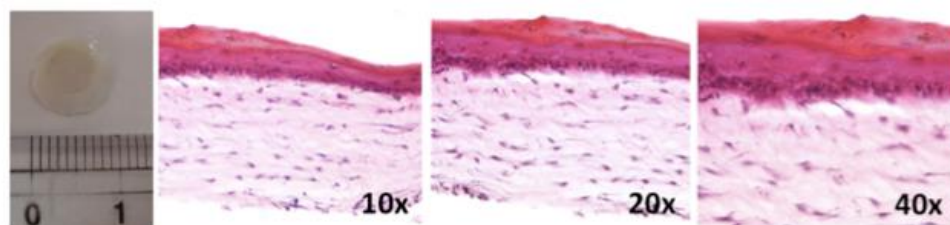


Figura 11. Modelo de pele reconstituída utilizada no ensaio de irritação cutânea: tamanho real, corte histológico com aumento de 10x, aumento de 20x e aumento de 40x. Modelos tratados com (A) dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% e (B) dinitroclorobenzeno (DNCB) 10%.

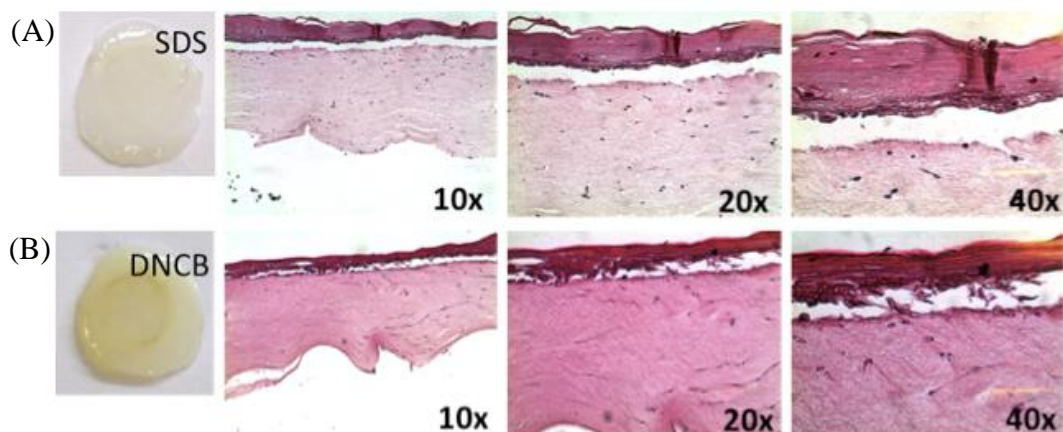
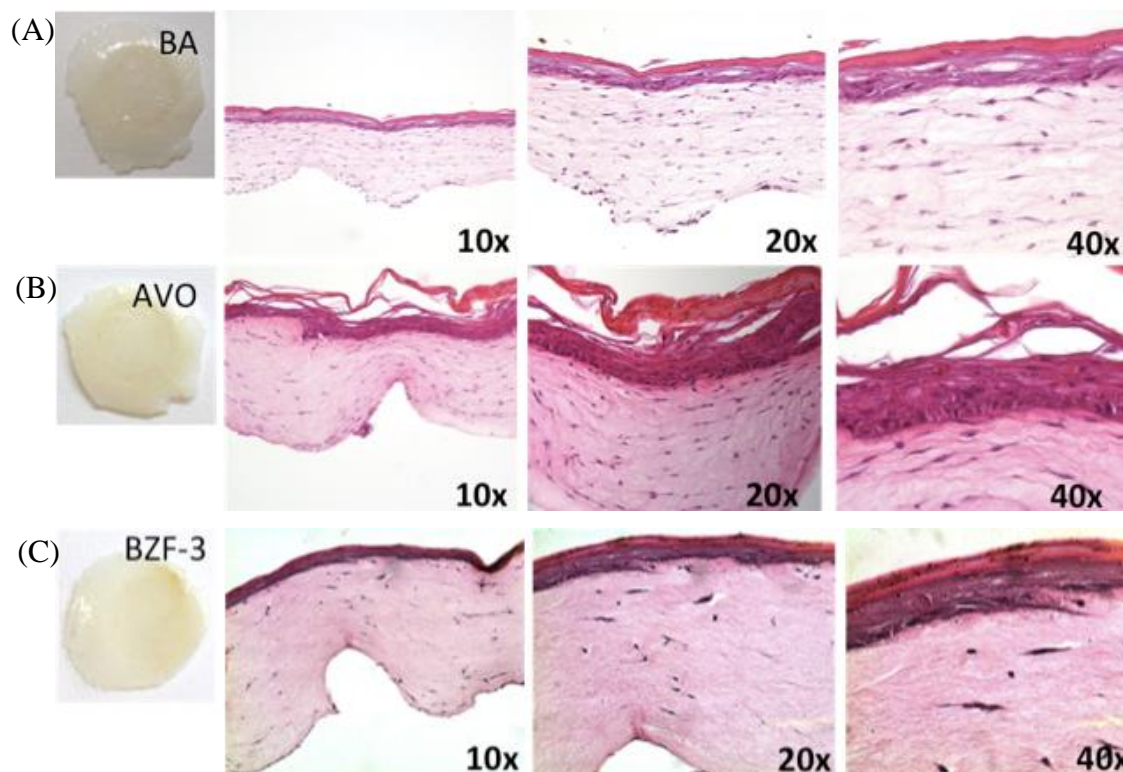


Figura 12. Modelo de pele reconstituída utilizada no ensaio de irritação cutânea: tamanho real, corte histológico com aumento de 10x, aumento de 20x e aumento de 40x. Modelos tratados com (A) veículo benzoato de alquila (BA); (B) avobenzona (AVO) 10% e (C) benzofenona-3 (BZF-3) 10%.



Por meio da análise histológica dos modelos de pele, foi possível observar que houve dano à epiderme em ambos os modelos expostos aos controles irritante, SDS e sensibilizante, DNCB (Figura 11). Os modelos de pele expostos ao veículo e aos filtros solares em estudo foram satisfatórios quanto à qualidade de formação e estratificação da epiderme, sendo que a epiderme viável destes modelos estava mais preservada que a dos controles positivos.

5.1.2 Ensaio de viabilidade celular por MTT ((brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio)

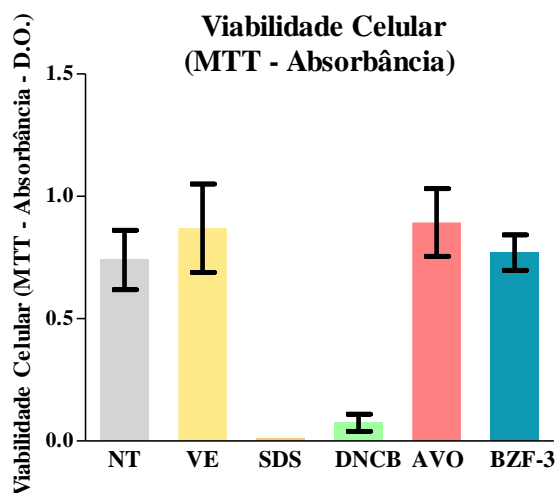
Os resultados obtidos em relação à viabilidade celular por meio do ensaio de MTT estão apresentados na Tabela 6 e na Figura 13. O ensaio foi realizado em pelo menos duplicata (n=2-3).

Tabela 6: Viabilidade Celular pelo ensaio de MTT (Absorbância) – Modelo de pele sem tratamento (NT) ou tratado com: o veículo benzoato de alquila (VE), dodecil sulfato de sódio (SDS), dinitroclorobenzeno (DNCB), avobenzona (AVO), benzofenona-3 (BZF-3). Resultados de absorbância absolutos e a porcentagem em relação ao modelo sem tratamento. (n=2-3).

	NT	VE	SDS	DNCB	AVO	BZF-3
1	0,98	1,23			1,17	0,63
2	0,65	0,69	0,01	0,04	0,76	0,87
3	0,59	0,69	0,01	0,11	0,75	0,81
Média	0,74	0,87	0,01	0,07	0,89	0,77
% em relação ao veículo		100,0	1,4^a	8,3^a	103,1	89,0

a: viabilidade celular menor que 50%, em relação ao veículo.

Figura 13. Viabilidade celular por meio do método de MTT (valores absolutos de absorbância). NT: não tratado ou tratado com: veículo benzoato de alquila (VE), dodecil sulfato de sódio (SDS - irritante), dinitroclorobenzeno (DNCB - sensibilizante), avobenzona (AVO) e benzofenona-3 (BZF-3). Barras: média \pm SEM (n=2-3).



Ambos os controles irritante SDS e sensibilizante DNCB apresentaram redução da viabilidade celular em mais de 50% (Tabela 6), o que está de acordo com modelos internacionais de pele ou epiderme equivalente, tais como o da MatTek Corporation, no qual uma substância é considerada irritante se apresenta a viabilidade celular do tecido exposto a essa substância menor que 50% da em relação aos controles negativos (KANDÁROVÁ et al., 2004; EPISKIN™ SOP, 2005). Além disso, uma substância sensibilizante tem potencial em

causar irritação cutânea, como é o caso do DNCB (DOS SANTOS et al., 2011). Os filtros solares reduziram, no máximo 11 % a viabilidade celular, como foi o caso da benzofenona-3, o que está abaixo do *cut-off* estabelecido de redução de 50 % a viabilidade celular, dessa forma, os filtros solares não foram considerados irritantes.

5.1.3 Quantificação de IL-1 α por ELISA

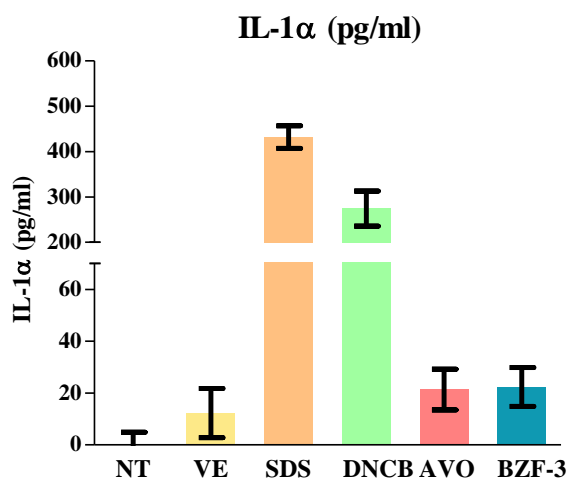
Os resultados obtidos em relação à quantificação de IL-1 α estão apresentados na Tabela 7 e na Figura 14.

Tabela 7: Liberação de IL-1 α (pg/mL). Modelo de pele sem tratamento (NT) ou tratado com: o veículo benzoato de alquila (VE), dodecil sulfato de sódio (SDS), dinitroclorobenzeno (DNCB), avobenzona (AVO) e benzofenona-3 (BZF-3). *Os valores negativos foram considerados como “zero” para o cálculo da média.

	NT	VE	SDS	DNCB	AVO	BZF-3
1	10,8	31,0			18,2	36,4
2	-8,7*	-0,2*	457,1	235,6	9,5	10,8
3	-5,5*	6,1	407,5	313,2	36,2	19,8
Média	3,6	12,4	432,3	274,4	21,3	22,3
Aumento em relação ao VE (x)			35,0^b	22,2^b	1,7	1,8

b: aumento da liberação de IL-1 α em mais que 10x em relação ao veículo.

Figura 14: Liberação de IL-1 α (pg/mL) em modelos de pele. NT: não tratado ou tratado com: veículo benzoato de alquila (VE), dodecil sulfato de sódio (SDS - irritante), dinitroclorobenzeno (DNCB - sensibilizante), avobenzona (AVO) e benzofenona-3 (BZF-3) Barras: média \pm SEM (n=2-3).



Os resultados obtidos mostraram que os controles positivos SDS e DNCB provocaram aumento de mais de 10x na liberação de IL-1 α em relação ao veículo (35 vezes para o SDS e 20 vezes para o DNCB, Tabela 7), o que está de acordo com o modelo proposto por DOS SANTOS et al. (2011), que mostra que substâncias irritantes são capazes de induzir aumento dessa interleucina, sendo que houve maior produção dessa citocina pela exposição ao irritante SDS (Figura 14), do que com o DNCB, considerado alérgeno.

Além disso, esses resultados estão de acordo com estudos similares realizados em modelos de epiderme comerciais, nos quais foi observado que as substâncias consideradas irritantes cutâneas provocaram maior liberação de IL-1 α do que as substâncias consideradas alérgenas (COQUETTE et al., 2003). Assim, podemos considerar que o modelo proposto está alinhado com os modelos comerciais existentes no mercado, sendo uma ferramenta essencial na avaliação de segurança de produtos cosméticos.

Nas condições do estudo, os filtros solares não levaram ao aumento da liberação de IL-1 α em relação ao veículo de mais de 10x, desta forma não apresentaram potencial em promover irritação cutânea.

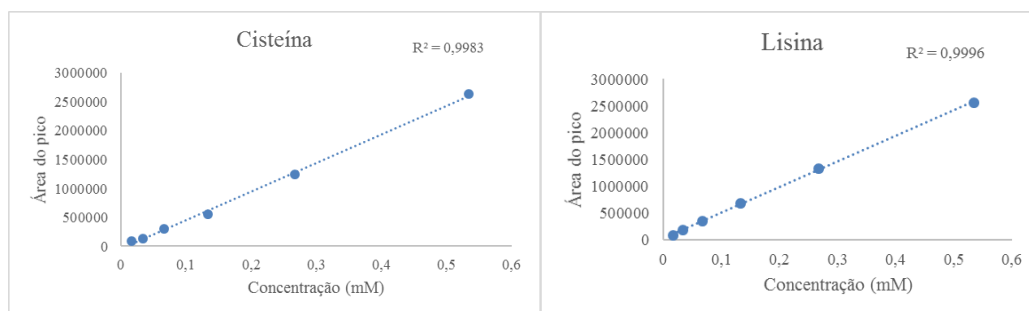
Embora o veículo tenha levado ao aumento da liberação de IL-1 α em relação ao controle não tratado, isso pode ser esperado com o uso de diferentes veículos utilizados em modelos de pele e pode ser minimizado com o uso de modelos de predição, os quais estabelecem valores de *cut-off* que eliminem estas pequenas variações. Um exemplo é um modelo de predição utilizado no ensaio de validação para irritação cutânea o qual considera que no caso de uma substância apresentar viabilidade celular maior que 50 %, ela só será considerada irritante se levar ao aumento de liberação de IL-1 α de mais de 50 pg/mL de IL-1 α (EPISKINTM SOP, 2005). Utilizando esse modelo de predição, o SDS e o DNCB ainda seriam considerados irritantes por levarem a uma viabilidade celular menor que 50 %, como descrito anteriormente.

5.2 Avaliação da sensibilização cutânea

5.2.1 Ensaio *in chemico* para a avaliação da sensibilização cutânea por depleção de peptídeos (DPRA)

5.2.1.1 Ensaio de proficiência da técnica do DPRA

As curvas de padronização para CIS e LIS para o ensaio de proficiência estão apresentadas na Figura 15, as quais estão de acordo com o recomendado pela OECD (2015a), pois apresentam um $R^2 > 0,99$.

Figura 15: Curvas padrão para os peptídeos cisteína (A) e lisina (B).

O ensaio de proficiência está apresentado na Tabela 8 para a CIS e na Tabela 9 para LIS, as quais apresentam oito das 10 substâncias de proficiência, que mostraram correlação adequada com a faixa de reatividade apresentada pela OECD (2015a). Os cromatogramas das substâncias de proficiência em combinação com os peptídeos CIS e LIS, estão apresentados no apêndice 1 e 2, respectivamente.

Tabela 8: Substâncias de proficiência testadas para o DPRA para CIS (n=3).

Substâncias	Cisteína		
	Média ¹	DP	Faixa de depleção de cisteína ²
2,4-dinitroclorobenzeno	100	0	90-100
Oxazolona	75,2	0,3	60-80
Formaldeído	33,7	3,9	30-60
Benzilidenoacetona	93,7	1,0	80-100
Farnesal	45,2	3,0	15-55
1-butanol	0 ¹	0	0-7
Ácido láctico	3,4 ¹	3,3	0-7
4-metoxiacetofenona	2,4 ¹	2,5	0-7

¹De acordo com a OECD TG 442C (2015a), valores negativos para a depleção foram considerados “0” para o cálculo da média.

²Dados fornecidos pela OECD TG 442C (2015a).

Tabela 9: Substâncias de proficiência testadas para o DPRA para LIS (n=3).

Substâncias	Lisina		
	Média ¹	DP	Faixa de depleção de lisina ²
2,4-dinitroclorobenzeno	15,5	10,7	15-45
Oxazolona	29,3	3,2	10-55
Formaldeído	3,1	1,6	0-24
Benzilidenoacetona	2,6	0,5	0-7
1-butanol	2,1	0,3	0-5.5
Ácido láctico	1,4	0,9	0-5.5
4-metoxiacetofenona	1,8 ¹	1,6	0-5.5
Metil cumarina	1,6 ¹	1,4	0-5.5

¹De acordo com a OECD TG 442C (2015a), valores negativos para a depleção foram considerados “0” para o cálculo da média.

²Dados fornecidos pela OECD TG 442C (2015a).

5.2.1.2 Ensaio de sensibilização cutânea das substâncias em estudo por DPRA

O controle positivo aldeído cinâmico apresentou depleção na faixa de 42,47 a 100 % (alta) para a média de CIS e LIS e na faixa de 23,09 a 98,24 % (moderada) para o modelo de CIS, como requerido pela OECD TG 442C (2015a) (Tabela 10).

Como esperado, o controle positivo forte DNCB apresentou alta reatividade em ambos os modelos de predição, na faixa de 98,24 a 100% para a depleção de CIS e na faixa de 42,47% a 100% para a média de CIS e LIS, o que está de acordo com dados prévios (OECD, 2015a; GERBERICK et al., 2004; 2007).

O controle negativo SDS não apresentou reatividade para o modelo de CIS, mas apresentou reatividade no modelo de predição baseado na média de CIS/LIS. Entretanto, já é conhecido que o SDS é um falso positivo no LLNA (HOFFMANN, 2015), além de haver evidência do SDS ser um falso positivo também no DPRA (STOKES et al., 2012).

Tabela 10: Avaliação da sensibilização cutânea de filtros solares por meio do ensaio de depleção de peptídeos. Peptídeo contendo cisteína (CIS) e lisina (LIS). AC: aldeído cinâmico; DNCB: dinitroclorobenzeno; SDS: dodecil sulfato de sódio; AVO: avobenzona; BZF-3: benzofenona-3, OCT: octocrileno. DP: desvio padrão. Depleção negativa foi considerada como “0” no cálculo da média (OECD, 2015a) (n=3).

Substância	Depleção de CIS 1:10 (0.5 mM: 5 mM) Média±DP	Depleção de LIS 1:50 (0.5 mM: 25 mM) Média±DP	Média de CIS e LIS	Reatividade baseada na média de CIS e LIS/Reatividade baseada apenas em CIS	Modelo de predição de DPRA
AC	63,1±3,5	63,9±1,2	63,5	Moderado/Alto	+/+
DNCB	99,9±0,0	20,6±2,7	60,3	Alto/Alto	+/+
SDS	0,0 ^A ±0,0	98,9±0,1	49,4	Não reativo ou mínimo/Alto	Inconclusivo
AVO	1,9 ^A ±3,3	0,0 ^A ±0,0	0,9	Não reativo ou mínimo/Não reativo ou mínimo	-/-
BZF-3	7,9±8,1	1,6 ^A ±1,5	4,7	Não reativo ou mínimo/Não reativo ou mínimo	-/-
OCT	10,5 ^A ±9,1	0,0 ^A ±0,0	5,2	Não reativo ou mínimo/Não reativo ou mínimo	-/-

^A Depleção negativa foi considerada como “0” no cálculo da média (OECD, 2015a).

Os filtros solares não apresentaram reatividade ou apresentaram reatividade mínima aos peptídeos (na faixa de 0% a 13,89% para a depleção de CIS e na faixa de 0 a 6,38% para a média de CIS e LIS).

Apesar de haver evidências já descritas para a sensibilização cutânea de filtros solares (AVENEL-AUDRAN et al., 2010; NASH et al., 2006; KARLSSON et al., 2011; DELPLACE; BLONDEEL; 2006; PIGGATO et al., 2008; DURBIZE et al., 2003), nenhuma reação foi observada no DPRA, a qual pode estar relacionada com a baixa solubilidade das substâncias em análise. A dificuldade na análise de substâncias com baixa solubilidade já foi descrita também em relação ao ensaio que é considerado o padrão ouro para sensibilização cutânea, o

LLNA (HOFFMANN, 2015). A maioria dos ensaios disponíveis para sensibilização cutânea são melhores para substâncias hidrofílicas. Entretanto, muitas substâncias lipofílicas são frequentemente usadas em cosméticos ou formulações dermatológicas, o que tornam necessárias algumas melhorias nesse campo, tais como o uso de modelos de pele, os quais permitem a avaliação de substâncias de baixa solubilidade e até mesmo a utilização das próprias formulações cosméticas, as quais podem ser aplicadas na superfície dos modelos de pele reconstituída (KEJLOVÁ et al., 2007).

5.2.2 Ensaios *in vitro* para a avaliação da sensibilização cutânea nos modelos de pele reconstituída contendo ou não linfócitos T

5.2.2.1 Histologia

Todas as camadas da epiderme, tais como estrato basal, estrato espinhoso e estrato córneo foram bem diferenciadas nos modelos de pele (Figuras 16 e 17). A exposição aos linfócitos T CD4⁺ (setas) induziu a hiperproliferação, como indicado pelo ligeiro espessamento epidérmico (Figura 17). Também é possível notar o dano causado por ambos os controles SDS e DNCB nos modelos de pele, contendo ou não linfócitos T CD4⁺ (Figuras 16C e D e 17C e D). Foi também possível observar que o modelo contendo linfócitos T exposto ao DNCB foi o que apresentou a maior quantidade de linfócitos T (Figura 17D).

Figura 16: Cortes histológicos para os modelos de pele sem linfócitos T (A) NT: não tratado e tratado com (B) VE: veículo, (C) SDS: dodecil sulfato de sódio, (D) DNCB: dinitroclorobenzeno, (E) AVO: avobenzona, (F) BZF-3: benzofenona-3 e (G) OCT: octocrileno. Aumento de 100x.

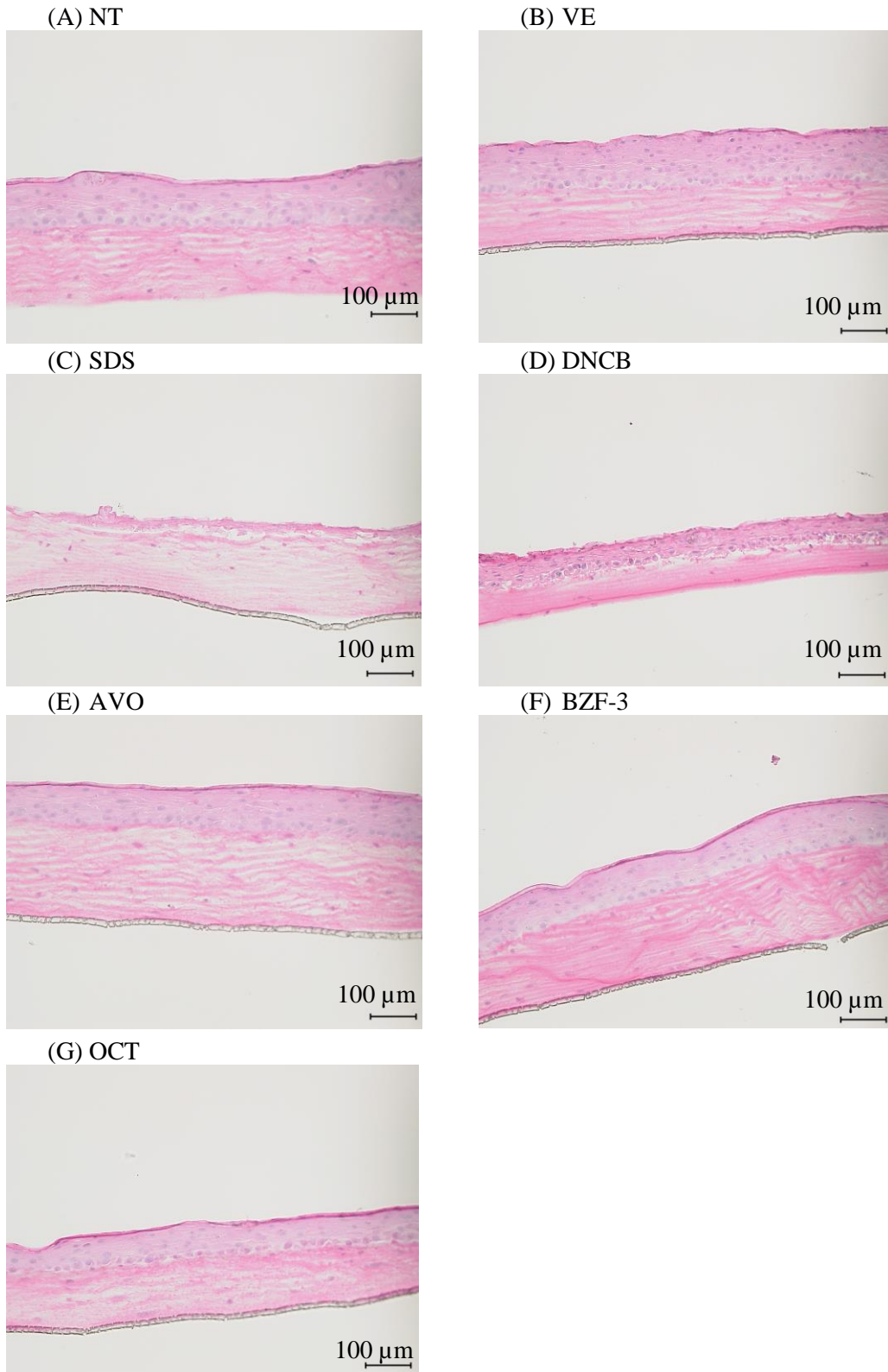
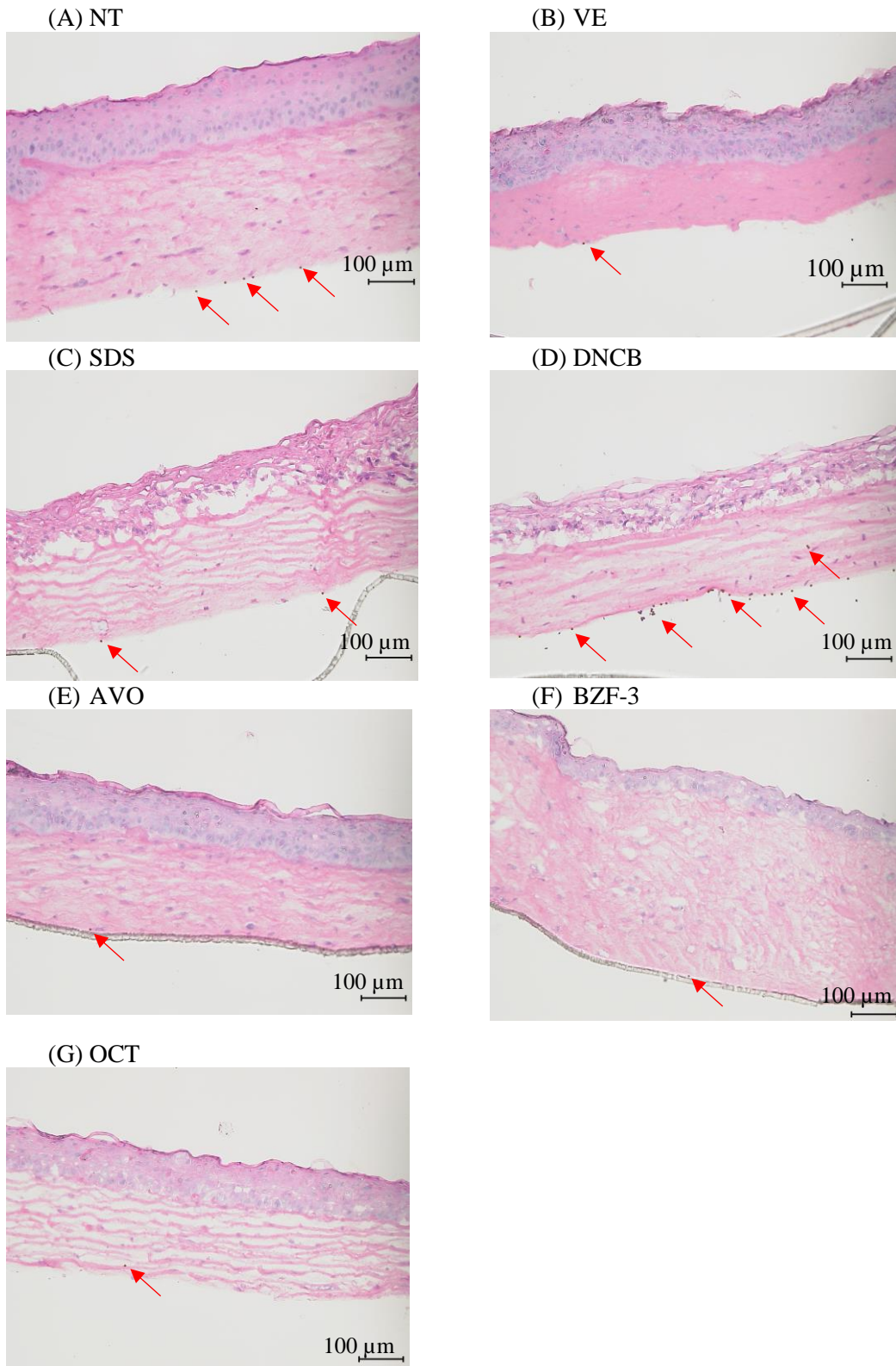


Figura 17: Cortes histológicos para os modelos de pele contendo linfócitos T (A) NT: não tratado e tratado com (B) VE: veículo, (C) SDS: dodecil sulfato de sódio, (D) DNCB: dinitroclorobenzeno, (E) AVO: avobenzona, (F) BZF-3: benzofenona-3 e (G) OCT: octocrileno. As setas indicam os linfócitos T. Aumento de 100x.



5.2.2.2 Quantificação de IL-6, IL-8 e IL-18 após exposição dos modelos de pele aos filtros solares

Ambos os controles SDS e DNCB levaram ao aumento da liberação de IL-6 e IL-8 nos modelos de pele contendo ou não linfócitos T (Tabelas 11, 12, 13 e 14 e Figuras 18 e 19). Entretanto, não foi possível diferenciar o sensibilizante forte DNCB do irritante SDS pela análise dessas citocinas. Assim, estas duas citocinas não foram consideradas relevantes para a predição de sensibilização cutânea utilizando os modelos de pele reconstituída. Além disso, a aplicação tópica dos filtros solares não influenciou a liberação de IL-6 ou IL-8 em relação ao veículo (Tabelas 11, 12, 13 e 14 e Figuras 18 e 19).

Tabela 11: Liberação de IL-6 em modelos de pele. NT: não tratado ou tratado com: veículo benzoato de alquila (VE), dodecil sulfato de sódio (SDS - controle negativo: irritante), dinitroclorobenzeno (DNCB - controle positivo: sensibilizante), avobenzona (AVO), benzofenona-3 (BZF-3) e octocrileno (OCT) (n=3).

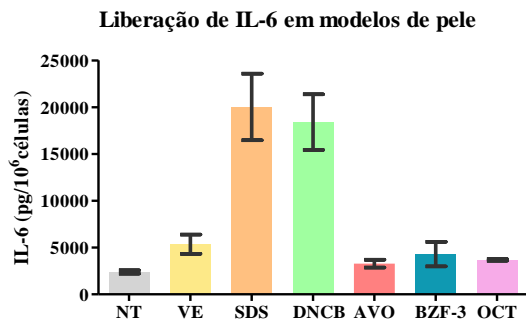
	n	NT	VE	SDS	DNCB	AVO	BZF-3	OCT
MTT (%)	1	100,0	34,1	9,0	3,5	117,6	127,0	120,1
	2	100,0	116,5	11,0	3,1	118,1	101,4	102,8
	3	100,0	97,1	4,0	1,3	102,1	89,0	92,1
x10⁶ células/mL	1	2,1	0,7	0,2	0,1	2,5	2,7	2,5
	2	2,1	2,4	0,2	0,1	2,5	2,1	2,2
	3	2,1	2,0	0,1	0,0	2,1	1,9	1,9
IL-6 (pg/mL)	1	5890,4	6417,5	3703,9	1185,8	5698,1	6235,7	8585,9
		5613,8	5865,0	4128,0	1093,8	6205,6	6582,7	8987,4
	2	5510,3	8153,3	2333,5	768,1	7193,5	4359,5	8252,3
		5300,3	7857,4	2274,6	792,5	7178,5	4476,8	8400,3
	3	3816,5	8427,0	2506,9	750,2	10520,2	15578,9	7420,3
		4032,8	8895,8	2436,6	732,3	8948,3	15916,7	6870,9
IL-6 (pg/10⁶ células)	1	2805,0	8960,1	19641,1	16087,1	2307,3	2338,3	3404,0
		2673,2	8188,8	21889,9	14838,6	2512,8	2468,4	3563,1
	2	2623,9	3331,5	10092,4	11991,6	2900,7	2046,5	3824,5
		2524,0	3210,6	9837,9	12373,0	2894,7	2101,6	3893,1
	3	1817,4	4133,1	29769,5	27910,3	4905,1	8339,2	3837,0
		1920,4	4363,1	28934,4	27243,7	4172,2	8520,0	3552,9

Tabela 12: Liberação de IL-6 em modelos de pele contendo linfócitos T. NT: não tratado ou tratado com: veículo benzoato de alquila (VE), dodecil sulfato de sódio (SDS - controle negativo: irritante), dinitroclorobenzeno (DNCB - controle positivo: sensibilizante), avobenzona (AVO), benzofenona-3 (BZF-3) e octocrileno OCT (n=2).

	n	NT	VE	SDS	DNCB	AVO	BZF-3	OCT
MTT (%)	1	100,0	182,4	28,6	10,3	231,6	167,0	192,1
	2	100,0	90,3	19,5	6,6	120,8	77,2	106,6
x10⁶ células/mL	1	2,1	3,8	0,6	0,2	4,9	3,5	4,0
	2	2,1	1,9	0,4	0,1	2,5	1,6	2,2
IL-6 (pg/mL)	1	1398,8	1861,3	1149,3	620,3	1988,5	2353,8	2633,7
		1382,3	1732,6	1135,5	626,0	1959,2	2062,8	2589,2
	2	2054,0	2167,1	1562,6	542,2	2156,1	2151,8	2770,0
		2009,7	2162,5	1435,7	570,4	2205,0	2226,5	2980,8
IL-6 (pg/10⁶ células)	1	666,1	486,0	1912,9	2867,8	408,8	671,3	652,8
		658,2	452,4	1890,0	2894,2	402,8	588,3	641,8
	2	978,1	1142,7	3819,8	3929,6	849,8	1327,1	1237,0
		957,0	1140,2	3509,6	4134,2	869,1	1373,2	1331,2

Figura 18: Liberação de IL-6 em modelos de pele (A) e em modelos de pele contendo linfócitos T (B). NT: não tratado ou tratado com: veículo benzoato de alquila (VE), dodecil sulfato de sódio (SDS - controle negativo: irritante), dinitroclorobenzeno (DNCB - controle positivo: sensibilizante), avobenzona (AVO), benzofenona-3 (BZF-3) e octocrileno OCT. Barras: média \pm SEM (n=2-3).

(A)



(B)

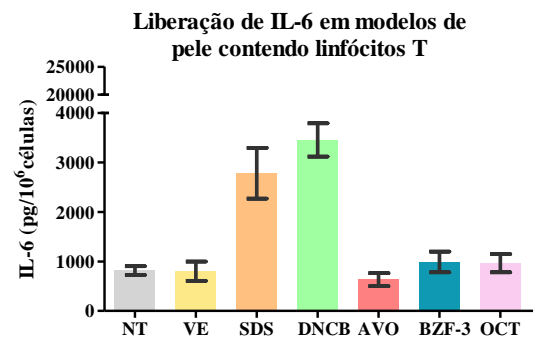


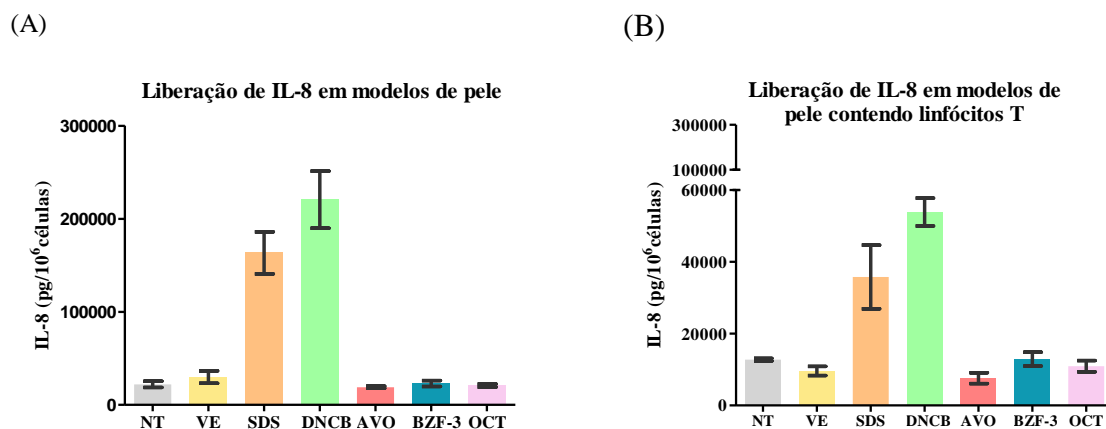
Tabela 13: Liberação de IL-8 em modelos de pele. NT: não tratado ou tratado com: veículo benzoato de alquila (VE), dodecil sulfato de sódio (SDS - controle negativo: irritante), dinitroclorobenzeno (DNCB - controle positivo: sensibilizante), avobenzona (AVO), benzofenona-3 (BZF-3) e octocrileno OCT (n=3).

	n	NT	VE	SDS	DNCB	AVO	BZF-3	OCT
MTT (%)	1	100,0	34,1	9,0	3,5	117,6	127,0	120,1
	2	100,0	116,5	11,0	3,1	118,1	101,4	102,8
	3	100,0	97,1	4,0	1,3	102,1	89,0	92,1
x10⁶ células/mL	1	2,1	0,7	0,2	0,1	2,5	2,7	2,5
	2	2,1	2,4	0,2	0,1	2,5	2,1	2,2
	3	2,1	2,0	0,1	0,0	2,1	1,9	1,9
IL-8 (pg/mL)	1	47867,5	36296,4	26368,5	11852,3	38252,4	36063,5	51601,1
		49352,8	35914,7	27056,1	11053,0	38881,3	33420,1	48606,7
	2	64002,5	53545,1	26458,5	11942,5	54847,4	60291,3	34492,3
		64195,0	53045,6	26837,6	12586,2	54709,2	57595,5	38686,8
	3	26182,2	34078,8	19324,2	8483,5	41036,6	50951,7	48639,4
		26060,1	36775,4	19978,0	8444,5	41764,6	53959,3	49968,5
IL-8 (pg/10⁶ células)	1	22794,1	50677,4	139826,7	160796,4	15489,3	13523,2	20457,9
		23501,4	50144,4	143473,0	149952,2	15744,0	12532,0	19270,7
	2	30477,4	21878,9	114434,8	186455,4	22116,9	28302,6	15985,3
		30569,0	21674,8	116074,6	196505,9	22061,1	27037,1	17929,2
	3	12467,7	16714,4	229476,1	315605,8	19133,7	27273,7	25151,1
		12409,6	18037,0	237240,5	314155,1	19473,1	28883,6	25838,3

Tabela 14: Liberação de IL-8 em modelos de pele contendo linfócitos T. NT: não tratado ou tratado com: veículo benzoato de alquila (VE), dodecil sulfato de sódio (SDS - controle negativo: irritante), dinitroclorobenzeno (DNCB - controle positivo: sensibilizante), avobenzona (AVO), benzofenona-3 (BZF-3) e octocrileno OCT (n=2).

	n	NT	VE	SDS	DNCB	AVO	BZF-3	OCT
MTT (%)	1	100,0	182,4	28,6	10,3	231,6	167,0	192,1
	2	100,0	90,3	19,5	6,6	120,8	77,2	106,6
x10⁶ células/mL	1	2,1	3,8	0,6	0,2	4,9	3,5	4,0
	2	2,1	1,9	0,4	0,1	2,5	1,6	2,2
IL-8 (pg/mL)	1	27988,4	27756,9	11878,1	10310,5	23819,4	33200,6	33000,5
		28220,0	28876,2	12650,5	10194,2	24865,7	34020,7	33646,1
	2	25225,2	22132,3	20497,3	7995,6	25816,0	25649,1	30318,3
		25694,0	22773,7	21369,2	8665,4	26079,4	27146,1	30659,7
IL-8 (pg/10⁶ células)	1	13327,8	7248,1	19770,1	47667,6	4896,9	9469,2	8180,0
		13438,1	7540,3	21055,8	47129,8	5111,9	9703,1	8340,0
	2	12012,0	11670,0	50105,8	57951,9	10174,9	15819,0	13539,6
		12235,2	12008,2	52237,2	62806,3	10278,7	16742,3	13692,1

Figura 19: Liberação de IL-8 em modelos de pele (A) e em modelos de pele contendo linfócitos T (B). NT: não tratado ou tratado com: veículo benzoato de alquila (VE), dodecil sulfato de sódio (SDS - controle negativo: irritante), dinitroclorobenzeno (DNCB - controle positivo: sensibilizante), avobenzona (AVO), benzofenona-3 (BZF-3) e octocrileno OCT. Barras: média \pm SEM (n=2-3).



Bae et al. (2015) analisaram a liberação de IL-8 em monocamadas de queratinócitos após a incubação com 10 e 50 μ M de avobenzona, mostrando aumento na produção de IL-8 (BAE et al., 2015). Entretanto, estudos prévios do nosso grupo mostraram que uma baixa quantidade de avobenzona foi absorvida pela pele (epiderme viável + derme) em formulações fotoprotetoras, sendo que o mesmo foi observado para o octocrileno e outros filtros solares (FREITAS et al., 2015). Conseqüentemente, conforme observado nos resultados obtidos para IL-8 (Figura 19), a biodisponibilidade destes filtros solares nos modelos de pele reconstituída é muito menor comparada com cultura de células em monocamada.

Em relação à liberação de IL-18, Gibbs et al. (2013) propuseram um modelo de predição para o modelo de epiderme equivalente EpiDermTM para a sensibilização cutânea, com um *cut-off* de 5-50% da viabilidade celular e aumento de 1,6x na produção de IL-18 em relação ao veículo. No presente estudo, foi possível aplicar esse modelo de predição proposto por Gibbs et al. (2013) no modelo de pele contendo linfócitos T, uma vez que o sensibilizante DNCB se enquadrou ao *cut-off* de viabilidade celular e liberação de IL-18, enquanto o irritante SDS apenas reduziu a viabilidade celular, mas não foi capaz de aumentar a liberação de IL-18 (Tabela 16). O mesmo resultado não foi observado nos modelos de pele sem linfócitos T (Tabela 15), evidenciando a importância da comunicação entre queratinócitos e linfócitos T nos modelos de pele para a avaliação da sensibilização cutânea.

Entretanto, quando utilizamos a relação entre a produção de IL-18 e a viabilidade celular (IL-18/viabilidade celular), é possível notar que a quantificação da liberação de IL-

18/viabilidade forneceu resultados relevantes para a diferenciação entre o irritante SDS e o controle positivo DNCB em ambos os modelos (Figura 20, Tabelas 15 e 16).

Nos modelos de pele sem linfócitos, o DNCB induziu ao aumento de 28,6 vezes na liberação de IL-18/viabilidade celular em relação ao veículo, enquanto que o SDS levou ao aumento de apenas 1,5 vezes (Tabela 15). Já nos modelos de pele contendo linfócitos T, o DNCB induziu ao aumento de 24,6 vezes na liberação de IL-18/viabilidade celular em relação ao veículo, enquanto que o irritante SDS levou ao aumento de apenas 3,6 vezes (Tabela 16), evidenciando a diferenciação entre o irritante SDS e o controle positivo DNCB. Entretanto, a variação entre os resultados foi muito menor nos modelos de pele contendo linfócitos T (Figura 20), o que evidencia uma grande vantagem em utilizar o esse modelo para a avaliação da sensibilização cutânea.

Os filtros solares não aumentaram a liberação de IL-18/viabilidade celular em nenhum dos modelos, entretanto, os modelos de pele foram considerados adequados para avaliar o potencial de sensibilização cutânea, inclusive para substâncias com baixa solubilidade.

Tabela 15: Liberação de IL-18 em modelos de pele. NT: não tratado ou tratado com: veículo benzoato de alquila (VE), dodecil sulfato de sódio (SDS - controle negativo: irritante), dinitroclorobenzeno (DNCB - controle positivo: sensibilizante), avobenzona (AVO), benzofenona-3 (BZF-3) e octocrileno OCT (n=3).

	n	NT	VE	SDS	DNCB	AVO	BZF-3	OCT
MTT (%)	1	100,0	34,1	9,0	3,5	117,6	127,0	120,1
	2	100,0	116,5	11,0	3,1	118,1	101,4	102,8
	3	100,0	97,1	4,0	1,3	102,1	89,0	92,1
Média		100,0	82,6	8,0	2,6	112,6	105,8	105,0
Relação ao VE (%)				9,7^a	3,2	136,4	128,1	127,2
x10⁶ células/mL	1	2,1	0,7	0,2	0,1	2,5	2,7	2,5
	2	2,1	2,4	0,2	0,1	2,5	2,1	2,2
	3	2,1	2,0	0,1	0,0	2,1	1,9	1,9
IL-18 (pg/mL)	1	42,7	676,8	89,5	414,0	312,1	205,8	302,4
	2	51,9	248,4	52,2	735,6	584,3	709,8	439,3
	3	106,2	1666,0	179,4	972,5	939,6	958,1	1031,7
Média		66,9	863,7	107,0	707,4	612,0	624,6	591,1
Relação ao VE (x)				0,1	0,8	0,7	0,7	0,7
IL-18 (pg/10⁶ células)	1	20,3	945,0	474,6	5616,1	126,4	77,2	119,9
	2	24,7	101,5	225,6	11485,2	235,6	333,2	203,6
	3	50,6	817,1	2129,8	36180,7	438,1	512,9	533,5
Média		31,9	621,2	943,3	17760,7	266,7	307,8	285,7
Relação ao VE (x)				1,5	28,6	0,4	0,5	0,5

a: viabilidade celular entre 5-50% relação ao veículo.

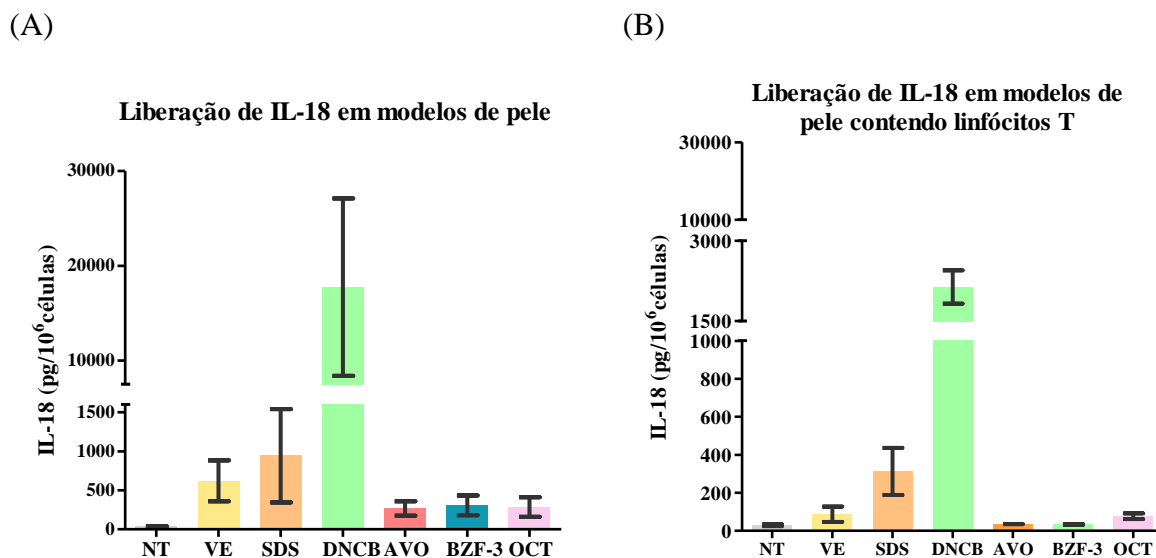
Tabela 16: Liberação de IL-18 em modelos de pele contendo linfócitos T. NT: não tratado ou tratado com: veículo benzoato de alquila (VE), dodecil sulfato de sódio (SDS - controle negativo: irritante), dinitroclorobenzeno (DNCB - controle positivo: sensibilizante), avobenzona (AVO), benzofenona-3 (BZF-3) e octocrileno OCT (n=2).

	n	NT	VE	SDS	DNCB	AVO	BZF-3	OCT
MTT (%)	1	100,0	182,4	28,6	10,3	231,6	167,0	192,1
	2	100,0	90,3	19,5	6,6	120,8	77,2	106,6
Média		100,0	136,4	24,1	8,5	176,2	122,1	149,4
Relação ao VE (%)				17,6^a	6,2^a	129,2	89,5	109,5
x10⁶ células/mL	1	2,1	3,8	0,6	0,2	4,9	3,5	4,0
	2	2,1	1,9	0,4	0,1	2,5	1,6	2,2
IL-18 (pg/mL)	1	52,4	179,2	113,6	394,6	169,6	125,8	249,0
	2	71,9	240,8	178,4	337,7	92,0	48,9	205,8
Média		62,2	210,0	146,0	366,2	130,8	87,4	227,4
Relação ao VE (x)				0,7	1,7^b	0,6	0,4	1,1
IL-18 (pg/10⁶ células)	1	25,0	46,8	189,0	1824,4	34,9	35,9	61,7
	2	34,3	127,0	436,0	2447,6	36,3	30,2	91,9
Média		29,7	86,9	312,5	2136,0	35,6	33,1	76,8
Relação ao VE (x)				3,6	24,6	0,4	0,4	0,9

a: viabilidade celular entre 5-50% relação ao veículo.

b: aumento maior que 1,6 vezes na produção de IL-18 em relação ao veículo.

Figura 20: Liberação de IL-18 em modelos de pele (A) e em modelos de pele contendo linfócitos T (B). NT: não tratado ou tratado com: veículo benzoato de alquila (VE), dodecil sulfato de sódio (SDS - controle negativo: irritante), dinitroclorobenzeno (DNCB - controle positivo: sensibilizante), avobenzona (AVO), benzofenona-3 (BZF-3) e octocrileno OCT. Barras: média \pm SEM (n=2-3).



Em conformidade com os nossos modelos, outros grupos de pesquisa estão envolvidos no desenvolvimento de um modelo de pele reconstituída contendo um componente imunológico para abranger melhor os passos das AOP da sensibilização cutânea. Entretanto, a introdução dos linfócitos T é uma abordagem mais fácil e direta do que incluir células dendríticas ou de Langerhans nos modelos de pele, os quais não têm demonstrado resultados satisfatórios até o momento (MEHLING et al., 2012; FACY et al., 2005; GUIRONNET et al., 2001). A significância biológica da interação entre queratinócitos e linfócitos T foi demonstrada previamente em modelos de pele reconstituída para o estudo de doenças inflamatórias de pele (VAN DEN BOGAARD et al., 2014). Além disso, Banerjee et al. (2004) observou que cultura de queratinócitos A431 respondeu a alérgenos comuns e irritantes induzindo a expressão de HLA-DR (*human leukocyte antigen D related*) na superfície celular, o qual é um receptor MHC II receptor (*molecular histocompatibility complex*) (BANERJEE et al., 2004). Eles também observaram a indução da proliferação de linfócitos T alérgeno-específicos em co-culturas e a polarização de linfócitos T ao fenótipo Th1, o que sugere que os queratinócitos podem ter agido apresentando antígenos aos linfócitos T (BANERJEE et al., 2004).

Nesse sentido, considerando os resultados obtidos, combinados à correta discriminação entre um sensibilizante e um irritante e à baixa variação dos dados, a quantificação da liberação

de IL-18 nos modelos de pele contendo linfócitos T pode representar uma nova abordagem na avaliação da sensibilização cutânea *in vitro*. Entretanto, nenhum aumento da liberação de IL-18 foi observado após a aplicação tópica dos filtros solares em comparação ao veículo e, dessa forma, eles não foram considerados sensibilizantes nesse ensaio. Isto pode ter ocorrido devido a dificuldades em discriminar substâncias com baixo e moderado potencial de causar sensibilização cutânea, bem como à falta de aplicações repetidas das substâncias, como normalmente é realizado em humanos, como por exemplo no ensaio clínico de *patch test* (*human repeated insult patch test* – HRIPT) (BASKETTER, 2009).

Cabe ressaltar que ensaios epidemiológicos têm incluído alguns relatos de alergia aos filtros solares (KARLSSON et al., 2011; DELPLACE; BLONDEEL; 2006; PIGATTO et al., 2008; DURBIZE et al., 2003; AVENEL-AUDRAN et a., 2010; NASH, 2006); entretanto, mesmo ensaios de compatibilidade realizados em humanos e requeridos por agências regulatórias (SCCS, 2016) não são capazes de prever a incidência exata de reações alérgicas em humanos, devido às predisposições individuais.

Em termos de risco, a avaliação dos processos fotoinduzidos, tais como a fotossensibilização cutânea e a fototoxicidade, também tem alta relevância na avaliação de segurança os filtros solares, devido à exposição solar dessas substâncias, a qual será discutida a seguir.

5.3 Avaliação da fototoxicidade nos modelos de pele reconstituída

Os resultados obtidos em relação à viabilidade celular dos modelos de pele estão apresentados na Figura 21 e na Tabela 17. A radiação UV não influenciou a viabilidade celular do controle não tratado (Figura 21, Tabela 17) (GASPAR et al., 2013). O controle positivo cetoprofeno (fototóxico) apresentou redução maior que 30 % quando comparado ao tecido não irradiado (Figura 21, Tabela 17) e foi considerado fototóxico, o que está de acordo com estudos prévios (GALBIATI et al., 2014; LELIÈVRE et al., 2007).

O filtro solar avobenzona não apresentou potencial fototóxico no modelo de pele reconstituída, o que está de acordo com dados obtidos por Gaspar et al. (2013) e Kandárová (2006) para modelos de epiderme equivalente (contendo apenas epiderme). Apesar da avobenzona apresentar potencial fototóxico em cultura celular em monocamadas (3T3 NRU PT) (MPE: 0,340/0,422, acima do estabelecido como *cut-off* para substâncias com potencial fototóxico) (BENEVENUTO; GUERRA; GASPAR, 2015), esse potencial fototóxico não é confirmado em modelos de pele reconstituída, que possuem estrato córneo como barreira de

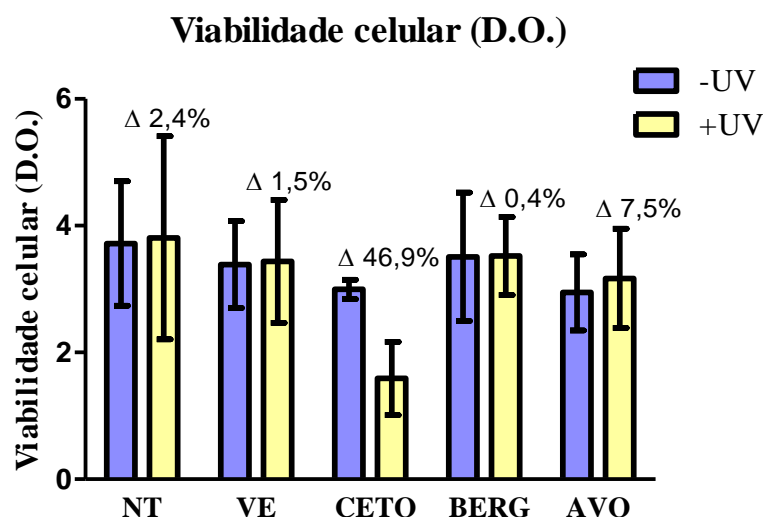
penetração cutânea, provavelmente devido à sua baixa penetração cutânea, uma vez que há penetração de apenas $4 \mu\text{g cm}^{-2}$ na epiderme viável (FREITAS et al., 2015).

Tabela 17: Viabilidade celular por meio do método de MTT (valores absolutos de absorbância) para o ensaio de fototoxicidade em modelo de pele. NT: não tratado ou tratado com: VE: veículo benzoato de alquila, CETO: cetoprofeno (controle positivo: fototóxico e fotossensibilizante), BERG: óleo de bergamota (controle positivo: fototóxico) e AVO: avobenzona (n=2).

n	NT		VE		CETO 3%		BERG 10%		AVO 10%	
	-UV	+UV	-UV	+UV	-UV	+UV	-UV	+UV	-UV	+UV
1	4,7	5,4	4,1	4,4	2,8	1,0	4,5	4,1	3,5	4,0
2	2,7	2,2	2,7	2,5	3,1	2,2	2,5	2,9	2,3	2,4
Média	3,7	3,8	3,4	3,4	3,0	1,6	3,5	3,5	2,9	3,2
Varição (Δ) (%) relação ao -UV		2,4		1,5		46,9^a		0,4		7,5

^aRedução maior que 30 % em relação ao controle não irradiado.

Figura 21: Fototoxicidade no modelo de pele reconstituída. NT: não tratado ou tratado com: VE: veículo benzoato de alquila, CETO: cetoprofeno (controle positivo: fototóxico e fotossensibilizante), BERG: óleo de bergamota (controle positivo: fototóxico) e AVO: avobenzona. Barras: média \pm SEM (n = 2). De acordo com o modelo de predição, uma redução na viabilidade maior que 30% (Δ) indica fototoxicidade.



O controle fototóxico óleo de bergamota (10%) não apresentou fototoxicidade em modelo de pele reconstituída. Uma vez que os resultados foram diferentes dos relatados por Kejlová et al. (2007), foram realizadas análises complementares do óleo de bergamota para

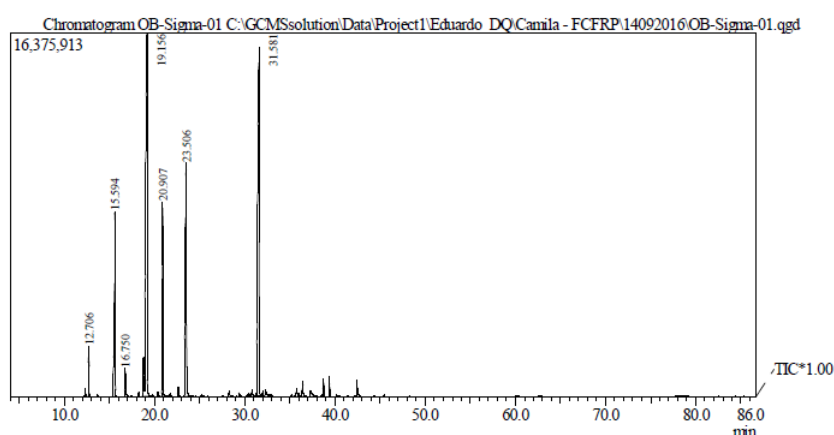
avaliação de sua composição, por cromatografia gasosa, com o intuito de comparar a composição dos óleos utilizados no presente estudo e no estudo realizado por Kejlová et al. (2007). Os resultados estão apresentados no item **5.3.1**.

5.3.1 Avaliações complementares do óleo de bergamota

Em um estudo prévio realizado por nosso grupo de pesquisa (GASPAR et al., 2016), observou-se que o óleo de bergamota Sigma–Aldrich em estudo apresentou potencial fototóxico no teste 3T3 NRU PT, pois apresentou MPE: 0,609, sendo que, de acordo com o guia OECD TG 432 (2004), valores de MPE maiores que 0,15 classificam a substância como fototóxica.

Dessa forma, os estudos de cromatografia gasosa para identificação dos componentes do óleo estão apresentados a seguir, na Figura 22 e na Tabela 18.

Figura 22: Cromatografia gasosa do óleo de bergamota Sigma–Aldrich.



Para análise da composição do óleo essencial de bergamota, o mesmo foi diluído na proporção de 1:10 (v/v) em hexano. A amostra diluída foi submetida à análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS) em cromatógrafo a gás Shimadzu composto por detector GC-MS QP 2010 Plus, autoinjeter AOC-20i e coluna RTX 5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). As condições cromatográficas estão descritas a seguir:

- Programação do forno: 50°C à 250°C, 3°C/min
- Volume de injeção: 1 µL/mL_[SEP]
- Pressão: 102 kPa_[SEP]
- Fluxo do gás de arraste: Helio a 30 cm/s
- Temperatura do detector: 280°C
- Razão de split: 1:100_[SEP]

Os dados foram adquiridos do Software GC-MS solution.

Tabela 18. Caracterização do óleo de bergamota Sigma–Aldrich por CG/MS. Conteúdo dos componentes fotoativos majoritários (%), MM = massa molecular (g/mol).

	bergapteno	citropteno	bergamoteno	geranial	neral
Óleo de bergamota	MM: 216	MM: 206	MM: 204	MM: 152	MM: 152
	g/mol	g/mol	g/mol	g/mol	g/mol
Sigma–Aldrich 2007					
(KEJLOVÁ et al. 2007)	0,13	0,13	0,86	0,04	0,48
Sigma–Aldrich 2016	0,03	0,05	-	0,18	0,26

No presente estudo, foram identificados cinco compostos fotoativos presentes no óleo de bergamota Sigma–Aldrich. Observou-se que o óleo de bergamota atualmente comercializado pela Sigma–Aldrich possui menor concentração dos compostos de maior massa molecular (bergapteno, citropteno e bergamoteno) e de um composto de menor massa molecular (neral) quando comparado ao óleo de bergamota utilizado por Kejlová et al. (2007). Esses compostos fotoativos, cujas massas moleculares são inferiores à da avobenzona (MM = 310,39), provavelmente possuem maior penetração cutânea que a avobenzona. Dessa forma quando o óleo de bergamota contendo maior concentração das substâncias fotoativas foi avaliado por Kejlová et al. (2007) em modelo de epiderme equivalente, houve a comprovação do potencial fototóxico, o qual foi também observado nos estudos prévios em monocamadas (3T3 NRU PT, GASPAR et al., 2016). Já o óleo de bergamota atualmente comercializado pela Sigma–Aldrich, apesar de possuir menor concentração de bergapteno, citropteno, bergamoteno e neral, ainda possui geranial e neral em concentrações que ainda apresentaram potencial fototóxico no modelo em monocamadas (3T3 NRU PT, GASPAR et al., 2016), modelo considerado mais sensível que o de pele reconstituída. Entretanto, no presente estudo, este potencial fototóxico não foi comprovado no modelo de pele, o que provavelmente ocorreu devido à redução da disponibilização do geranial e neral para a epiderme viável, reduzindo, dessa forma, seu potencial fototóxico.

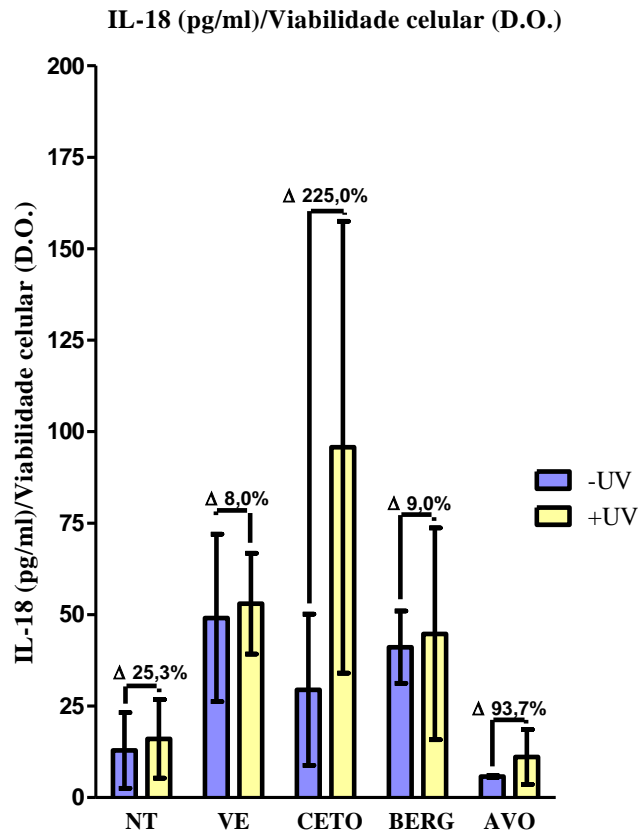
5.4 Avaliação da fotossensibilização cutânea nos modelos de pele reconstituída

Os resultados obtidos em relação à viabilidade celular e à produção de IL-18 estão apresentados na Tabela 19 e na Figura 23 a seguir.

Tabela 19: Viabilidade celular e liberação de IL-18 obtidos no ensaio de fotossensibilização cutânea em modelos de pele (n=2-3).

		NT			VE			CETO 3%			BERG 10%			AVO 10%		
		-UV	+UV	%	-UV	+UV	%	-UV	+UV	%	-UV	+UV	%	-UV	+UV	%
Viab. celular (D.O.)	1	2,7	2,2	80,6	2,7	2,5	91,3	3,1	2,2	68,9	2,5	2,9	116,5	2,3	2,4	101,6
	2	4,7	5,4	115,1	4,1	4,4	108,3	2,8	1,0	35,6	4,5	4,1	91,6	3,5	4,0	111,3
	3							2,6	1,1	41,1						
IL-18 (pg/mL)	1	63,4	59,0	93,1	70,6	96,8	137,0	37,2	99,7	267,6	77,9	46,0	59,0	14,0	44,5	317,6
	2	11,6	28,9	249,7	293,1	294,5	100,5	201,1	221,1	110,0	230,4	305,1	132,4	19,6	14,3	72,8
	3							15,6	24,9	159,9						
IL-18 (%) / Viab. celular (%)	1			1,2			1,5			3,9			0,5			3,1
	2			2,2			0,9			3,1			1,4			0,7
	3									3,9						

Figura 23: Ensaio de fotossensibilização cutânea em modelos de pele: razão entre a produção de IL-18 e a viabilidade celular (n=2-3). Os valores (%) indicados no gráfico são referentes à variação entre o tecido não irradiado e irradiado.



Observou-se que o controle não tratado e o veículo não apresentaram aumento da liberação de IL-18/viabilidade celular relevante, enquanto o controle fotossensibilizante cetoprofeno e a avobenzona apresentaram aumento de IL-18/viabilidade celular em relação ao tecido não irradiado de 225,0% e 93,7%, respectivamente (Figura 23).

Os resultados indicam que o modelo de pele reconstituída para a fotossensibilização cutânea pode ser considerado promissor, uma vez que são semelhantes à classificação descrita por Galbiati et al. (2014) para cultura de queratinócitos e relatos em humanos (VICTOR; COHEN; SOTER, 2010), a qual observou que fotoalérgenos levavam ao aumento de IL-18. Já o óleo de bergamota não provocou aumento relevante de liberação de IL-18, uma vez que essa substância tem sido descrita apenas como fototóxica (KEJLOVÁ et al., 2007; LELIÈVRE et al., 2007).

Em relação aos modelos de pele propostos nesse trabalho como um todo, observou-se que os modelos de pele representam uma estratégia promissora para a avaliação da fotossensibilização cutânea, inclusive para substâncias lipofílicas.

Entre os modelos de pele propostos nesse trabalho se destacam os utilizados na avaliação da sensibilização cutânea, principalmente o modelo contendo linfócitos T, e o modelo para a avaliação da fotossensibilização cutânea, uma vez que ambos apresentam resultados promissores na avaliação desses dois desfechos.

Os modelos de pele reconstituída (contendo epiderme + derme) têm sido utilizados com sucesso na construção de modelos de predição para irritação, fototoxicidade, entre outros, pois apresentam as estruturas biomecânicas necessárias para mimetizar o comportamento natural da pele humana (LIEBSCH et al., 2005). Nesse sentido, o desenvolvimento de modelos de pele reconstituída robustos representa uma fronteira para avaliação da sensibilização e da fotossensibilização cutânea, uma vez que abrange as principais etapas envolvidas nas AOPs da desses desfechos.

Assim, o presente estudo apresenta grande relevância, uma vez que, principalmente no ensaio de sensibilização cutânea no modelo de pele contendo linfócitos T, conseguiu distinguir o controle sensibilizante DNCB do controle irritante SDS, substância que é conhecidamente relatada como falso positivo para sensibilização cutânea até mesmo no ensaio considerado o padrão ouro da sensibilização cutânea, o LLNA (HOFFMANN, 2015). Dessa forma, esses modelos confrontaram desafios considerados limítrofes no campo da sensibilização e da fotossensibilização cutânea, bem como da substituição animal, levantando novas possibilidades para o campo dos ensaios *in vitro*.

Dessa forma, as perspectivas futuras para o reconhecimento e implementação dos modelos levam em consideração a submissão dos modelos propostos a diversas classes de moléculas (ácidos, bases, substâncias lipofílicas, hidrofílicas, etc.) sensibilizantes, fotossensibilizantes, irritantes e fototóxicas de forma que o ensaio consiga distinguir as moléculas de diferentes classes e comprove a relevância do modelo de predição proposto e confirmação do *cut-off* sugerido, ou seja, tenha capacidade de distinguir entre um resultado positivo e um negativo o mais próximo possível do que ocorre em seres humanos.

Como já abordado anteriormente, no Brasil, a importação dos modelos de epiderme equivalente ainda é um desafio. Entretanto, o desenvolvimento e a implementação de modelos de pele reconstituída representam o rompimento dessa limitação e traz a possibilidade da realização desses estudos em nosso país, sendo que esse modelo pode servir para diversos desfechos, como demonstrado anteriormente, como irritação cutânea, sensibilização cutânea, fototoxicidade e fotossensibilização cutânea.

Finalizando, o presente trabalho possui grande relevância e inovação, pois reúne diversos resultados obtidos com modelos alternativos ao uso de animais para a avaliação da

sensibilização cutânea, bem como de desfechos que estão interligados a ela, como a irritação cutânea e os processos fotoinduzidos, a fototoxicidade e a fotossensibilização cutânea, por meio de métodos *in vitro* e *in chemico*. Foram apresentadas, ainda, duas novas ferramentas: a inclusão dos linfócitos T em modelos de pele na avaliação da sensibilização cutânea, o qual rompe a barreira da dificuldade em incluir células imunes nos modelos de pele reconstituída para esse desfecho, bem como o uso de modelos de pele na avaliação da fotossensibilização cutânea, o qual foi pouco explorado e está frequentemente associado a ensaios em monocamadas.

6. Conclusão

- O modelo proposto para irritação cutânea foi considerado adequado para avaliação desse desfecho, uma vez que houve redução de viabilidade celular e aumento da produção de IL-1 α pelo irritante SDS, bem como pelo sensibilizante DNCB, corroborando com a literatura, que mostra a capacidade irritante dos alérgenos.
- Os controles positivos sensibilizantes, aldeído cinâmico e DNCB, apresentaram reatividade aos peptídeos no ensaio do DPRA, entretanto, o SDS apresentou um resultado inconclusivo nesse ensaio, novamente corroborando com dados da literatura.
- Nos modelos pele contendo ou não linfócitos T para a avaliação da sensibilização cutânea, o uso das interleucinas IL-6 e IL-8 não levou à discriminação dos controles irritante SDS e sensibilizante DNCB.
- A avaliação da IL-18 em modelos de pele contendo ou não linfócitos T conseguiu distinguir o controle sensibilizante DNCB do controle irritante SDS, que é considerado falso positivo em muitos ensaios. Entretanto, o modelo com linfócitos T apresentou uma variação muito menor nos resultados.
- Os modelos propostos para a avaliação da fototoxicidade e da fotossensibilização em modelos de pele foram considerados promissores para a avaliação desses desfechos, uma vez que o controle positivo (fototóxico e fotossensibilizante) cetoprofeno reduziu a viabilidade celular no ensaio de fototoxicidade e aumentou a liberação de IL-18/viabilidade celular no ensaio de fotossensibilização cutânea.
- O óleo de bergamota não foi considerado fototóxico, provavelmente devido à sua menor concentração de componentes fototóxicos do que o descrito na literatura.
- Os filtros solares estudados (AVO e BZF-3) não foram considerados irritantes nos modelos de pele. Em relação ao ensaio de sensibilização, os filtros solares estudados (AVO, BZF-3 e OCT) não foram considerados sensibilizantes no DPRA e nos modelos de pele. A avobenzona não foi considerada fototóxica, mas foi considerada fotossensibilizante.
- Os modelos de pele foram considerados adequados para avaliação de substâncias lipofílicas e para a avaliação dos desfechos propostos, entretanto os modelos mais promissores, que representam novas ferramentas na análise toxicológica *in vitro* são a inclusão dos linfócitos T em modelos de pele na avaliação da sensibilização cutânea e o uso de modelos de pele na avaliação da fotossensibilização cutânea, o

qual ainda é pouco explorado e está frequentemente associado a ensaios em monocamadas.

- As pesquisas futuras, advindas deste trabalho, poderão levar à realização de novos ensaios com os modelos propostos, para a avaliação de outras classes de moléculas com o intuito de construir modelos de predição que mais se aproximem dos resultados em humanos.

7. Referências

AGNER, T. et al. Combined effects of irritants and allergens. Synergistic effects of nickel and sodium lauryl sulfate in nickel-sensitized individuals. **Contact Dermatitis**, v. 47, n. 1, p. 21–26, 2002.

ALÉPÉE, N. et al. State-of-the-art of 3D cultures (organs-on-a-chip) in safety testing and pathophysiology. **Altex**, v. 31, n. 4, p. 441-77, 2014.

ALI, N. et al. Skin equivalents: skin from reconstructions as models to study skin development and diseases. **Br J Dermatol**, v. 173, n. 2, p. 391-403, 2015.

ALLEN, J.M.; GOSSETT, C.J. ALLEN, S.F. Photochemical formation of singlet molecular oxygen ($^1O^2$) in illuminated aqueous solutions of p-aminobenzoic acid (PABA). **J Photoch Photobio B**, v. 32, p. 33–37, 1996.

ANDRES, E. et al. Preliminary performance data of the RHE/IL-18 assay performed on SkinEthic™ RHE for the identification of contact sensitizers. **Int J Cosmet Sci**, p. 1-12, 2016.

ARMSTRONG. B.K. KRICKER, A. How much melanoma is caused by sun exposure? **Melanoma Res**, v. 3, p. 395–401, 1993.

AVENEL-AUDRAN, M. et al. Octocrylene, an emerging photoallergen. **Arch Dermatol**, v. 146, n. 7, p. 753-7, 2010.

BAE, O.N. et al. Chemical allergens stimulate human epidermal keratinocytes to produce lymphangiogenic vascular endothelial growth factor. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 283, n. 2, p. 147-55, 2015.

BALL, N. et al. Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 60, p. 389–400, 2011.

BANERJEE, G., et al. Role of keratinocytes in antigen presentation and polarization of human T lymphocytes. **Scand J Immunol**, v. 4, p. 385-94, 2004.

BASKETTER, D. A.; CADBY, P. Reproducible prediction of contact allergenic potency using the local lymph node assay. **Contact Dermatitis**, v. 50, n. 1, p. 15-7, 2004.

BASKETTER, D.A. et al. An evaluation of performance standards and non-radioactive endpoints for the local lymph node assay. The report and recommendations of ECVAM Workshop 65. **Altern Lab Anim**, v. 36, p. 243–257, 2008.

BASKETTER, D.A. et al. Nothing is perfect, not even the local lymph node assay: a commentary and the implications for REACH. **Contact Dermatitis**, v. 60, p. 65-9, 2009.

BASKETTER, D.A. The human repeated insult patch test in the 21st century: A commentary. **Cutan Ocul Toxicol**; v. 28: p. 49-53, 2009.

BASKETTER, D.A.; KIMBER, I. Skin sensitization, false positives and false negatives: experience with guinea pig assays. **J Appl Toxicol**, v. 30, p.381–386, 2010.

BENEVENUTO, C. G.; GUERRA, L. O.; GASPAR, L. R. Combination of retinyl palmitate and UV-filters: phototoxic risk assessment based on photostability and *in vitro* and *in vivo* phototoxicity assays. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, p. 127-36, 2015.

BENJAMIN, C.L.; ANANTHASWAMY, H.N. p53 and the pathogenesis of skin cancer. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 224, p. 241-8, 2007.

BERGSTRESSER, P.R. Sensitization and elicitation of inflammation in contact dermatitis. **Immunol Ser**, v. 46, p. 219-45, 1989.

BERSET, G. et al. Proposed protocol for determination of photostability Part I: cosmetic UV filters. **Int J Cosmetic Sci**, v. 18, n. 4, p. 167-77, 1996.

BOS, J.D.; MEINARDI, M.M. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. **Exp Dermatol**, v. 9, n.3, p.165-9, 2000.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos, second ed. Brasília: ANVISA, 2012a. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home>>. Acesso em: 10 jul. 2016.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 30, de 1 de junho de 2012. Fica aprovado o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos nos termos desta Resolução. Diário Oficial da União, Brasília, 4 de jun. 2012b. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0030_01_06_2012.html>. Acesso em: 10 jul. 2016.

BRASIL. Atos do Poder Legislativo. Lei nº- 11.794, de 8 de outubro de 2008. Estabelece procedimentos para o uso científico de animais. **Diário Oficial da União**, Brasília, 9 outubro de 2008.

BRITISH PHOTODERMATOLOGY GROUP. Photopatch testing--methods and indications. **Br J Dermatol** v. 136, n. 3, p. 371-6, 1997.

BROHEM, C. A. et al. Proteasome inhibition and ROS generation by 4-nerolidylcatechol induces melanoma cell death. **Pigment Cell and Melanoma Res**, v. 25, n. 3, p. 354- 369, 2012.

BRUYNZEEL, D.P. et al. Photopatch testing: a consensus methodology for Europe. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v.18, p. 679-682, 2004.

BRYDEN, A. M. et al. Photopatch testing of 1155 patients: results of the U.K. multicentre photopatch study group. **Br J Dermatol**, v. 155, n. 4, p. 737-47, 2006.

BÜDINGER, L.; HERTL, M. Immunologic mechanisms in hypersensitivity reactions to metal ions: an overview. **Allergy**, v. 55, n.2, p.108-15, 2000.

CERIDONO, M. et al. The 3T3 neutral red uptake phototoxicity test: practical experience and implications for phototoxicity testing - the report of an ECVAM-EFPIA workshop. **Regul Toxicol Pharm**, v. 63, n. 3, p. 480-488, 2012.

CHATELAIN, E.; GABARD, B. Photostabilization of butyl methoxydibenzoylmethane (avobenzene) and ethylhexylmethoxycinnamate by bis-ethylhexyloxyphenol

methoxyphenyltriazine (tinosorb S), a new UV broadband filter. **Photochem Photobiol**, v. 74, n. 3, p. 401-406, 2001.

CHATELAIN, E.; GABARD, B.; SURBER, C. Skin penetration and sun protection factor of five UV filters: effect of the vehicle. **Skin Pharmacol Appl Skin Physiol**, v. 16, n. 1, p. 28–35, 2003.

CHEMICAL BOOK, 2016 Disponível em: http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB5499652.htm. Acesso 24 jan. 2016.

CLANCY, S. DNA damage & repair: mechanisms for maintaining DNA integrity. **Nature Education**, v.1, n. 1, p. 103, 2008.

COQUETTE, A. et al. Analysis of interleukin-1a (IL-1a) and interleukin-8 (IL-8) expression and release in *in vitro* reconstructed human epidermis for the prediction of *in vivo* skin irritation and/or sensitization. **Toxicol in Vitro** v.17, p. 311–321, 2003.

COSMETIC INGREDIENT REVIEW EXPERT PANEL. Annual review of cosmetic ingredient safety assessments--2002/2003. **Int. J. toxicol.** v.24: p.1-102, 2005.

COSMETIC INGREDIENT REVIEW EXPERT PANEL. Final report on the safety assessment of benzophenones-1, -3, -4, -5, -9, and -11. **J Am College of toxicol.** v.2: p.35-77, 1983.

DANSO, M. O. et al. TNF-alpha and Th2 cytokines induce atopic dermatitis-like features on epidermal differentiation proteins and stratum corneum lipids in human skin equivalents. **J Invest Dermatol**, v. 134, n. 7, p. 1941-50, 2014.

DARVAY, A. et al Photoallergic contact dermatitis is uncommon. **Br J Dermatol**, v.145, n.4, p.597–601, 2001.

DE GROOT, A.C.; ROBERTS, D.W. Contact and photocontact allergy to octocrylene: a review. **Contact Dermatitis**, v.70, p.193-204, 2014.

DE LAAT. et al. Cell cycle kinetics following UVA irradiation in comparison to UVB and UVC irradiation. **Photochem Photobiol**, v. 63, p.492-7, 1996.

DEAN, J. H. et al. (eds) **Immunotoxicology and Immunopharmacology**. New York: Raven Press, 1994.

DEFLANDRE, A.; LANG, G. Photostability assessment of sunscreens. benzylidene camphor and dibenzoylmethanederivatives. **Int J Cosmet Sci**, v. 10, p. 53-62, 1988.

DELEO, V.A.; SUAREZ, S.M.; MASO, M.J. Photoallergic contact dermatitis. Results of photopatch testing in New York, 1985 to 1990. **Arch dermatol**, v. 128, p. 1513-8, 1992.

DELPLACE, D.; BLONDEEL, A. Octocrylene: really non-allergenic? **Contact Dermatitis**, v. 54, p. 295, 2006.

DIEPGEN, T.L.; MAHLER, V. The epidemiology of skin cancer. **Br J Dermatol**, v.61, p.1–6, 2002.

DIFFEY BL. Sunscreen and melanoma: The future looks bright. **Br J Dermatol**, v. 153, p. 378-81, 2005.

DOS SANTOS, G.G. et al. A potential *in vitro* epidermal equivalent assay to determine sensitizer potency. **Toxicol in Vitro**, v.25, p.347–357, 2011.

DRAELLOS, Z.D. **Dermatologia Cosmética** - Produtos e Procedimentos. São Paulo: Editora Santos Grupo Gen, 2012.

DROMGOOLE, S.H.; MAIBACH, H.I. Sunscreening agent intolerance: contact and photocontact sensitization and contact urticaria. **J Am Acad Dermatol**, v.22, p. 1068– 1078, 1990.

DURBIZE, E., et al. Spectrum of cross-photosensitization in 18 consecutive patients with contact photoallergy to ketoprofen: associated photoallergies to non-benzophenone-containing molecules. **Contact dermatitis**, v. 48, p. 144-9, 2003.

ECETOC. Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87), 2003.

ENVIRONMENTAL WORKING GROUP. 2017. Disponível em: <<http://www.ewg.org/skindeep/ingredient/700596/AVOBENZONE/>> Acesso em: 25 jan. 2017.

EPE, B. Genotoxicity of singlet oxygen. **Chem Biol Interact**, v. 80, n. 3, p.239–60, 1991.

EPISKIN™ SOP, Version 1.2. ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin irritation test^{-42 hours} assay for the prediction of acute skin irritation of chemicals, 2005. Disponível em: <<https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/validation-regulatory-acceptance/docs-skin-irritation-1/DOC12-SOP%20EpiSkin%20IL1a.pdf>>. Acesso em 19 abr. 2017.

EUROPEAN UNION. Directive 2003/15/EC of the european parliament and of the council of 27 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products. Official Journal of the European Union. 11.3.2003. Disponível em: <<http://www.ctfas.org.sg/Files/docs/EC-7th-Amendment.pdf>>. Acesso em: 25 jan. 2016.

FACY, V. et al. Reactivity of Langerhans cells in human reconstructed epidermis to known allergens and UV radiation. **Toxicol In Vitro**, v. 19, n. 6, p. 787-95, 2005.

FDA, Sunscreen drug products for over-the-counter human use; proposed amendment of Final Monograph; proposed rule. Federal Register/Vol. 72, No. 165, 2007. Disponível em: <<https://federalregister.gov/a/07-4131>>. Acesso em: 25 jan. 2017.

FISHER, A.A. **Contact Dermatitis**, 2nd ed., Philadelphia, 1995.

FISHER, AA. Sunscreen dermatitis: Part III--The benzophenones. **Cutis**, v. 50, p. 331-2, 1992.

FREITAS, J. V.; LOPES, N. P.; GASPARG, L. R. Photostability evaluation of five UV-filters, *trans*-resveratrol and beta-carotene in sunscreens. **Eur J Pharm Sci**, v. 78, p. 79-89, 2015.

FREITAS, J.V. et al. Trans-resveratrol and beta-carotene from sunscreens penetrate viable skin layers and reduce cutaneous penetration of UV-filters. **Int J Pharm**, v. 484, p. 131-137, 2015.

GALBIATI, V. et al. NCTC 2544 and IL-18 production: A tool for the *in vitro* identification of photoallergens. **Toxicol in Vitro**, v. 28, p.13-7, 2014.

GASPAR, L. R. et al. Skin phototoxicity of cosmetic formulations containing photounstable and photostable UV-filters and vitamin A palmitate. **Toxicol in Vitro**, v. 27, p. 418-425, 2013.

GASPAR, L.R. Reconstructed skin model for the evaluation of phototoxicity potential. 12-14 April, Pan-american conference for alternative methods. Baltimore, Maryland, USA, 2016.

GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Photostability and efficacy studies of topical formulations containing UV-filters combination and vitamins A, C and E. **Int J Pharm**, v. 343, n. 1-2, p. 181-189, 2007.

GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. **Int J Pharm**, v. 250, n. 1, p. 35-44, 2003.

GASPARRO, F.P. UV-induced photoproducts of paraaminobenzoid acid. **Photodermatol**, v. 2, n. 3, p. 151-7, 1985.

GERBERICK, F. et al. Chemical reactivity measurement and the predicitive identification of skin sensitizers. The report and recommendations of ECVAM Workshop 64. **Altern Lab Anim**, v. 36, n. 2, p. 215-42, 2008

GERBERICK, G.F. et al. Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. **Toxicol Sci**, v. 81, p. 332-43, 2004.

GERBERICK, G.F. et al. Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. **Toxicol Sciences**, v. 97, p. 417-27, 2007.

GERBERICK, G.F.; RYAN, C.A. Contact photoallergy testing of sunscreens in guinea pigs. **Contact Dermatitis**, v. 20, n. 4, p. 251-9, 1989.

GERHARD; NOHYNEK, G.J.; SCHAEFER, H. Benefit and risk of organic ultraviolet filters. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 33, p. 285-99, 2001.

GIBBS, S. et al. An epidermal equivalent assay for identification and ranking potency of contact sensitizers. **Toxicol Appl Pharm**, v. 272, p. 529-541, 2013.

GILCHREST, B.A. et al. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. **N Engl J Med**, v. 340, p. 1341-8, 1999.

GRANGER; K.L.; BROWN, P.R. the chemistry and HPLC analysis of chemical sunscreen filters in sunscreens and cosmetics. **J Liq Chromat Rel Technol**, v. 24, n. 19, p. 2894-924, 2001.

GREEN, A. C. et al. Reduced melanoma after regular sunscreen use: randomized trial follow-up. **J Clin Oncol**, v. 29, p. 257-63, 2011.

GUIRONNET, G. et al. Phenotypic and functional outcome of human monocytes or monocyte-derived dendritic cells in a dermal equivalent. **J Invest Dermatol**, v. 116, n. 6, p. 933-9, 2001.

HARTUNG, T. Look back in anger - what clinical studies tell us about preclinical work. **Altex**, v. 30, n. 3, p. 275-91, 2013.

HARTUNG, T.; CORSINI, E. Immunotoxicology: challenges in the 21st century and *in vitro* opportunities. **Altex**, v. 30, n. 4, p. 411-26, 2013.

HAYDEN, et al. *In vitro* skin equivalent models for toxicity testing MatTek Corporation, Ashland, MA, U.S.A. **Alternative Toxicological Methods**, p. 229-47, 2003.

HERZOG, B. Prediction of sun protection factors by calculation of transmissions with a calibrated step film model. **J Cosmet Sci**, v. 53, p. 11-26, 2002.

HINO, R. et al. Evaluation of photoallergic potential of chemicals using THP-1 cells. **J Dermatol Sci**, v. 52, n. 2, p. 140-143, 2008.

HOFFMANN, S. LLNA variability: An essential ingredient for a comprehensive assessment of non-animal skin sensitization test methods and strategies. **Altex**, v. 32, n. 4, p. 379-83, 2015.

HOMEY, B. et al. An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 153, p. 83-94, 1998.

HONZKE, S. et al. Influence of Th2 Cytokines on the Cornified Envelope, Tight Junction Proteins, and ss-Defensins in Filaggrin-Deficient Skin Equivalents. **J Invest Dermatol**, v. 136, n. 3, p. 631-9, 2016.

HORNUNG, R.L. **Photoprotection**. In: IRVINE, A.D.; HOEGER, P.H.; YAN, A.C. Harper's Textbook of Pediatric Dermatology, 3rd ed. Willey-Blackwell Publishing Ltd, 2011.

HOYA, M. et al. Development of an *in vitro* photosensitization assay using human monocyte-derived cells. **Toxicol In Vitro**, v. 23, n. 5, p. 911-8, 2009.

IANNACONE, M.R.; HUGHES, M.C.; GREEN, A.C. Effects of sunscreen on skin cancer and photoaging. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, v. 30, n. 2-3, p. 55-61, 2014.

ICCVAM. ICCVAM Test Method Evaluation Report: Usefulness and Limitations of the Murine Local Lymph Node Assay for Potency Categorization of Chemicals Causing Allergic Contact Dermatitis in Humans. NIH Publication No. 11-7709. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, 2011. Disponível em: <<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/LLNA-pot/TMER.htm>>. Acesso em: 25 jan. 2017.

ICHIHASHI, M. et al. UV-induced skin damage. **Toxicol**, v. 189, n. 1, p. 21-39, 2003.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA 2017. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>>. Acesso em: 25 jan. 2017.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. Photosafety evaluation of pharmaceuticals S10, 2013. Disponível em:

photochemical behavior and photostabilizing effect. **Eur J Pharm Sci**, v. 30, n. 99, p. 299-309, 2016.

KEJLOVÁ, K. et al. Phototoxicity of bergamot oil assessed by *in vitro* techniques in combination with human patch tests. **Toxicol in Vitro**, v. 21, p. 1298-303, 2007.

KERR, A.C. et al. A European multicentre photopatch test study. **Brit J Dermatol**, v. 166, p. 1002-9, 2012.

KIMBER, I. et al. The local lymph node assay: Past, present and future. **Contact Dermatitis**, v. 47, p. 315-28, 2002.

KLIGMAN, A.M.; WOODING, W.M. A method for the measurement and evaluation of irritants of human skin. **J Invest Derm**, v.49, p.78-94, 1967.

KNOBLER, E. et al. Photoallergy to benzophenone. **Arch dermatol**, v. 125, p. 801-4, 1989.

KOBAYASHI, N. et al. Quantitation and visualization of ultraviolet-induced DNA damage using specific antibodies: application to pigment cell biology. **Pigment Cell Res**, v. 14, n.2, p. 94-102, 2001.

KOZMA, B.; EIDE, M.J. Photocarcinogenesis: an epidemiologic perspective on ultraviolet light and skin cancer. **Dermatol Clin**, v. 32, n. 3, p. 301-13, 2014.

KRÄMER, M. et al. Radiation-induced activation of transcription factors in mammalian cells. **Radiat Environ Biophys**, v. 29, p. 303-13, 1990.

KREILING, R. et al. Comparison of the skin sensitizing potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). **Food Chem Toxicol**, v. 46, p. 1896-904, 2008.

KÜCHLER, S. et al. Hallmarks of atopic skin mimicked *in vitro* by means of a skin disease model based on flg knock-down. **Altern Lab Anim**, v. 39, p.471-80, 2011.

KUMLER, W.D.; DANIELS, T.C. Sunscreen compounds. **J Am Pharm Assoc Sci**, v. 37, p. 474-6, 1948.

KURITA, M. et al. Induction of keratinocyte apoptosis by photosensitizing chemicals plus UVA. **J Dermatol Sci**, v. 45, p.105-112, 2007.

LELIÈVRE, D. et al. The episkin phototoxicity assay (EPA): Development of an *in vitro* tiered strategy using 17 reference chemicals to predict phototoxic potency. **Toxicol in Vitro**, v. 21, p. 977-995, 2007.

LHIAUBET-VALLET, V. Filter-filter interactions. Photostabilization, triplet quenching and reactivity with singlet oxygen. **Photochem Photobiol Sci**, v. 9, p. 552-558, 2010.

LIEBSCH, M. et al. UV-induced effects. **Alternative to Laboratory Animals**, v. 33, p. 131-146, 2005.

LIEBSCH, M. INVITTOX Protocol No. 121: EpiDerm™ Phototoxicity Assay. European Commission DB-ALM, ECVAM, 1999. Disponível em: <<https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu>>.

Acesso em: 10 jul. 2016.

LIEBSCH, M.; SPIELMANN, H. INVITTOX Protocol No. 78: 3T3 NRU Phototoxicity Assay. European Commission DG-JRC, ECVAM, SIS Database, 1998. Last update October 2002. Disponível em: <<http://ecvamsis.jrc.it/invittox/static/index.html>>. Acesso em: 20 jul. 2016.

LIM, H.W. DRAELOS, Z.D. **Clinical Guide to Sunscreens and Photoprotection**. New York: Informa Healthcare, 322p., 2009.

LIM, H.W.; HÖNIGSMANN, H.; HAWK, J.L.M. **Photodermatology**. New York: Informa Healthcare, 2007.

LOVELL, W.W.; JONES, P.A. Evaluation of mechanistic in vitro tests for the discrimination of photoallergic and photoirritant potential. **Altern Lab Anim**, v. 28, p. 707-24, 2000.

MA, R. et al. UV filters with antagonistic action at androgen receptors in the MDA-kb2 cell transcriptional-activation assay. **Toxicol Sci**, v. 74, n. 1, p. 43 –50, 2003.

MacEACHERN, W.N.; JILLSON, O.F. A practical sunscreen 'Red Vet Pet'. **Arch Dermatol**, v. 89, p. 147–150, 1946.

MACKIE BS, MACKIE LE. The PABA story. **Australas J Dermatol**, v. 40, p. 41–53, 1999.

MAHMOUD, B.H. et al. Impact of long-wavelength UVA and visible light on melanocompetent skin. **J Invest Dermatol**, v. 130, p. 2092-7, 2010.

MARGINEAN LAZAR, G. et al. Sunscreens' photochemical behaviour: *in vivo* evaluation by the stripping method. **Int J Cosmet Sci**, v. 19, n. 2, p. 87-101, 1997.

MARZULLI, F.N.; MAIBACH, H.I. Contact allergy: predictive testing in man. **Contact Derm**, v. 2, p. 1–17, 1976.

MARROT, L.; MEUNIER, J.R. Skin DNA photodamage and its biological consequences. **J Am Acad Dermatol**, v. 58, p. 139-48, 2008.

MATTS, P.J. Solar Ultraviolet Radiation: Definitions and Terminology. **Dermatol Clin** v. 24, p. 1-8, 2006.

MCLELLAND, J.; SHUSTER, S.; MATTHEWS, J.N. 'Irritants' increase the response to an allergen in allergic contact dermatitis. **Arch. Dermatol**, v. 127, n. 7, p. 1016–9, 1991.

MEHLING, A. et al. Non-animal test methods for predicting skin sensitization potentials. **Arch toxicol**, v. 86, p. 1273-1295, 2012.

MERCKEL, G.; ROHWER, H. UV Protection – Care of Skin and Ingredients. **SÖFW Journal**, v.127, 2001.

MILLER, S.A. et al. An analysis of UVA emissions from sunlamps and the potential importance for melanoma. **Photochem Photobiol**, v. 68, p. 63–70, 1998.

MOED, H. et al. Nickel-responding T cells are CD4+ CLA+ CD45RO+ and express chemokine receptors CXCR3, CCR4 and CCR10. **Br J Dermatol**, v. 151, p. 32–41, 2004.

MOROHOSHI, K. et al. Estrogenic activity of 37 components of commercial sunscreen lotions evaluated by *in vitro* assays. **Toxicol In Vitro**, v. 19, n. 4, p. 457–69, 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MTURI, G.J.; MARTINCIGH, B.S. Photostability of the sunscreens agent 4-tert-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane (avobenzone) in solvents of different polarity and proticity. **J Photochem Photob A: Chemistry**, v. 200, p. 410–420, 2008.

NARAYANAN, D.L.; SALADI, R.N.; FOX, J.L. Ultraviolet radiation and skin cancer. **Internat J Dermatol**, v. 49, p. 978–986, 2010.

NASH, J. F.; TANNER, P. R. Relevance of UV filter/sunscreen product photostability to human safety. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, v. 30, p. 88-95, 2014.

NASH, J.F. Human safety and efficacy of ultraviolet filters and sunscreen products. **Dermatologic Clinics**, v. 24, p. 35-51, 2006.

NATSCH, A. et al. A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. **J Appl Toxicol**, v. 33, n. 11, p. 1337-52, 2013.

NATSCH, A. et al. Predicting skin sensitizer potency based on *in vitro* data from KeratinoSens and kinetic peptide binding: global versus domain-based assessment. **Toxicol sci**, v. 143, p. 319-32, 2015.

NOHYNEK, G.J.; SCHAEFERY, H. Benefit and risk of organic ultraviolet filters. **Regul Toxicol Pharmacol**, v.33, p.285–99, 2001.

OECD. Series on Testing and Assessment No.168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 2: Use of the AOP to Develop Chemical Categories and Integrated Assessment and Testing Approaches: OECD Publishing 2012. Disponível em: <[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2012\)10/part2&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2012)10/part2&doclanguage=en)>. Acesso em: 25 jan. 2017.

OECD. Test No. 406: Skin Sensitisation, OECD Publishing, Paris, 1992. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264070660-en>

OECD. Test No. 429: Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, OECD Publishing, Paris, 2010a. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264071100-en>

OECD. Test No. 432: *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test, OECD Publishing, Paris, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264071162-en>

OECD. Test No. 442A: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: DA, OECD Publishing, Paris, 2010b. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264090972-en>

OECD. Test No. 442B: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA, OECD Publishing, Paris, 2010c. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264090996-en>

OECD. Test No. 442C: *In Chemico* Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA), OECD Publishing, Paris, 2015a. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264229709-en>

OECD. Test No. 442D: *In Vitro* Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method, OECD Publishing, Paris, 2015b. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264229822-en>

OECD. Test No. 442E: *In Vitro* Skin Sensitisation: Human Cell Line Activation Test (h-CLAT), OECD Publishing, Paris, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264264359-en>

OECD. Test No. 439: *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method, OECD Publishing, Paris, 2015c. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264242845-en>

OEDA, S. et al. Development of an *in vitro* photosensitization test based on changes of cell-surface thiols and amines as biomarkers: the photo-SH/NH₂ test. **J Toxicol Sci**, v. 41, n. 1, p. 129-42, 2016.

ONOUÉ, S. et al. Chemical photoallergy: photobiochemical mechanisms, classification, and risk assessments. **J Dermatol Sci**, v. 85, n. 1, p. 4-11, 2017.

ONOUÉ, S. et al. Establishment and intra-/inter-laboratory validation of a standard protocol of reactive oxygen species assay for chemical photosafety evaluation. **J Appl Toxicol**, v. 33, p. 1241-50, 2013.

PARRISH, J.A.; ZAYNOUN, S.; ANDERSON, R.R. Cumulative effects of repeated subthreshold doses of ultraviolet radiation. **J Invest Dermatol**, v. 76, n. 5, p. 356–8, 1981.

PASTILA, R.; LESZCZYNSKI, D. Ultraviolet-A radiation induces changes in cyclin G gene expression in mouse melanoma B16-F1 cells. **Cancer Cell Int**, v.7, n.7, 2007.

PATHAK, M.A.; CARRARO, C. Reactive oxygen species in cutaneous photosensitivity reactions in porphyrias, PUVA photochemotherapy, and melanin pigmentation. In: HAYAISHI, O.; IMAMURA, S.; MYACHI, Y. *The Biological Role of Reactive Oxygen Species in the Skin*. Tokyo University Press, Tokyo, p.75-84, 1988.

PEDERSEN, L.K. et al. Augmentation of skin response by exposure to a combination of allergens and irritants – a review. **Contact Dermat**, v.50, n.5, p.265– 73, 2004.

PENNACCHI, P. C. et al. Glycated reconstructed human skin as a platform to study the pathogenesis of skin aging. **Tissue Eng: Part A**, v. 21, n. 17-18, p. 2417-25, 2015.

PIGATTO, P. D. et al. Photopatch tests: an Italian multicentre study from 2004 to 2006. **Contact Dermatitis**, v. 59, n. 2, p. 103-8, 2008.

PLEASANCE E.D. et al. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. **Nature**, v. 463, p.191–6, 2010.

PRESTON, D.S.; STERN, R.S. Nonmelanoma cancers of the skin. **N Engl J Med**, v. 327, p. 1649–62, 1992.

REBUT, D. The sunscreen industry in Europe: past, present and future. In: LOWE, N.J.; SHAATH, N.A. **Sunscreens, Development, Evaluation, and Regulatory Aspects**. New York: Marcel Dekker, p. 161–171, 1990.

RIEGER, M.M. Photostability of cosmetic ingredients on the skin. **Cosmet Toil**, v. 112, p. 65-72, 1997.

ROELANDTS, R. Advances in sunscreen technology: choosing the sunscreen to suit. **Curr Opin Dermatol**, v. 2, p. 173–177, 1995.

ROSCHEER N.M. et al. Photodecomposition of several compounds commonly used as sunscreen agents. **Photochem Photobiol**, v. 80, p. 417-21, 1994.

RUNGER, T.M., KAPPES, U.P. Mechanisms of mutation formation with long-wave ultraviolet light (UVA). **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, v. 24, n. 1, p. 2–10, 2008.

RUSTEMEYER, T. et al. Analysis of effector and regulatory immune reactivity to nickel. **Clin Exp Allergy**, v. 34, p. 1458–66, 2004.

SAINT-MEZARD P. et al. Afferent and efferent phases of allergic contact dermatitis (ACD) can be induced after a single skin contact with haptens: evidence using a mouse model of primary ACD. **J Invest Dermatol**, v. 120, n. 4, p. 641-7, 2003.

SALVADOR, A.; CHISVERT, A. **Analysis of Cosmetic Products**, 1st ed. Elsevier Science, 2007. ISBN: 9780444522603

SARASWAT, A. Contact allergy to topical corticosteroids and sunscreens. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**, v. 78, n. 5, p. 552-9, 2012.

SCHAFER-KORTING, M. et al. Reconstructed epidermis and full-thickness skin for absorption testing: influence of the vehicles used on steroid permeation. **Altern Lab Anim**, v. 36, n. 4, p. 441-52, 2008.

SCHALKA, S. et al. Brazilian Society of Dermatology. Brazilian Consensus on Photoprotection. **An Bras Dermatol**, v. 89, 6 Suppl 1, p. 1-74, 2014.

SCHAUDER, S.; IPPEN, H. Contact and photocontact sensitivity to sunscreens. Review of a 15-year experience and of the literature. **Contact Dermatitis**, v. 37, n. 5, p. 221-232, 1997.

SCHEMAN, A. Adverse reactions to cosmetics ingredients. **Dermatol Clin**, v. 18, p. 685-98, 2000.

SCHRADER, A.; JAKUPOVIC, J.; BALTES, W. Photochemical studies on trans-3-methylbutyl 4-methoxycinnamate. **J Soc Cosmet Chem**, v. 45, p. 43-52, 1994.

SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER SAFETY. The SCCS'S notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation 9th revision. 2016. Disponível em:

<http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_190.pdf>.

Acesso em: 11 set. 2016.

SCIENTIFIC COMMITTEE ON COSMETIC PRODUCTS AND NON-FOOD PRODUCTS INTENDED FOR CONSUMERS. NOTES OF GUIDANCE FOR TESTING OF COSMETIC INGREDIENTS FOR THEIR SAFETY EVALUATION. Adopted by the SCCNFP during the plenary meeting of 24 October 2000. Disponível em:

<http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/sccp/documents/out130_en.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2017.

SEIDLOVÁ-WUTTKE, D. et al. Comparison of effects of estradiol (E2) with those of octylmethoxycinnamate (OMC) and 4-methylbenzylidene camphor (4MBC)—2 filters of UV light on several uterine, vaginal, and bone parameters. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 214, n. 1, p. 1-7, 2006.

SHAATH, N.A. Evolution of modern sunscreen chemicals. In: LOWE, N.J.; SHAATH, N.A. **Sunscreens, Development, Evaluation, and Regulatory Aspects**. New York, Marcel Dekker, p.3–35, 1990.

SHAATH, N.A. Ultraviolet Filters. **Photochem Photobiol Sci**, v.9, p.464-469, 2010.

SHAW, T. et al. True photoallergy to sunscreens is rare despite popular belief. **Dermatitis**, v. 21, p. 185–98, 2010.

SIGMA–ALDRICH. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/> Acesso em: 25 jan. 2017.

SMITH, C; HOTCHKISS, S. **Allergic contact dermatitis: chemical and metabolic mechanisms**. London, England: Taylor & Francis, 2001.

SPIEKSTRA, S.W. et al. Potential method to determine irritant potency *in vitro* – Comparison of two reconstructed epidermal culture models with different barrier competency. **Toxicol in Vitro**, v. 23, n. 2, p. 349–355, 2009.

SPIEKSTRA, S.W., BREETVELD, M., RUSTEMEYER. Woundhealing factors secreted by epidermal keratinocytes substitutes. **Wound Repair Regen**, v. 15, n. 5, p. 708–717, 2007.

SPIELMANN, H. et al. EC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: first results obtained with the Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. **Toxicol in Vitro**, v. 8, p. 793–6, 1994.

SPIELMANN, H. et al. The international EU/COLIPA *In vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity phototoxicity test. **Toxicol in Vitro**, v. 12, p. 305–27, 1998.

SPIELMANN, H. et al. The Second ECVAM Workshop on Phototoxicity Testing. **Altern Lab Anim**, v. 28, p. 777-814, 2000.

STOKES, W. et al. Comparison of the DPRA with a Three-Test Battery for *In Vitro* Evaluation of Skin Sensitization. SOT - 51 Annual Meeting and ToxExpo™, 2012.

SUSHKO, I. et al. ToxAlerts: a Web server of structural alerts for toxic chemicals and compounds with potential adverse reactions. **J Chem Inf Model**, v. 52, p. 2310-6, 2012.

SUZUKI, T. et al. Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 203, n. 1, p. 9–17, 2005.

SZCZURKO, C. et al. Photocontact allergy to oxybenzone: ten years of experience. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, v. 10, p. 144-7, 1994.

THYSSEN, J.P. et al. The critical review of methodologies and approaches to assess the inherent skin sensitization potential (skin allergies) of chemicals. Part I. **Contact Dermatitis**, v 66 Suppl 1, p. 11-24, 2012.

THYSSEN, J.P.; et al. The epidemiology of contact allergy in the general population – prevalence and main findings. **Contact Dermat**, v. 57, p. 287– 299, 2007.

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

URBACH. F. The historical aspects of sunscreens. **J Photochem Photobiol B, Biol**; v. 64, n. 2-3, p. 99–104, 2001.

VAN DEN BOGAARD, E. H. et al. Crosstalk between keratinocytes and T cells in a 3D microenvironment: a model to study inflammatory skin diseases. **J Invest Dermatol**, v. 134, n. 3, p. 719-27, 2014.

VAVROVA, K. et al. Filaggrin deficiency leads to impaired lipid profile and altered acidification pathways in a 3D skin construct. **J Invest Dermatol**, v. 134, n. 3, p. 746-53, 2014.

VICTOR, F. C.; COHEN, D. E.; SOTER, N. A. A 20-year analysis of previous and emerging allergens that elicit photoallergic contact dermatitis. **J Am Acad Dermatol**, v. 62, p. 605-610, 2010.

WALLMEYER, L. et al. Stimulation of PPARalpha normalizes the skin lipid ratio and improves the skin barrier of normal and filaggrin deficient reconstructed skin. **J Dermatol Sci**, v. 80, p. 102-10, 2015.

WALLMEYER, L. et al. TSLP is a trigger for T cell migration in atopic dermatitis, submitted.

WALTERS, K.A. et al. Percutaneous penetration of octyl salicylate from representative sunscreen formulations through human skin *in vitro*. **Food Chem Toxicol**, v.35, n.12, p.1219–1225, 1997.

WANG, S.Q. et al. The evolution of sunscreen products in the United States – a 12-year cross sectional study. **Photochem Photobiol Sci**, v. 12, p. 197–202, 2013.

WANG, S.Q.; LIM, H.W. **Principles and Practice of Photoprotection**. Switzerland: Springer International Publishing, 2016.

WELTZIEN, H.U. et al. Cell immune responses to haptens. Structural models for allergic and autoimmune reactions. **Toxicol**, v. 107, n. 2, p. 141–51, 1996.

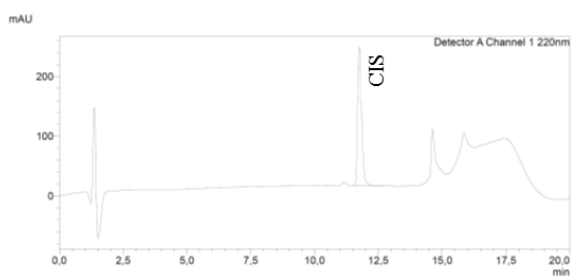
WONDRAK, G.T.; JACOBSON, M.K.; JACOBSON, E.L. Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. **Photochem Photobiol Sci**, v. 5, n. 2, p. 215–37, 2006.

Apêndices

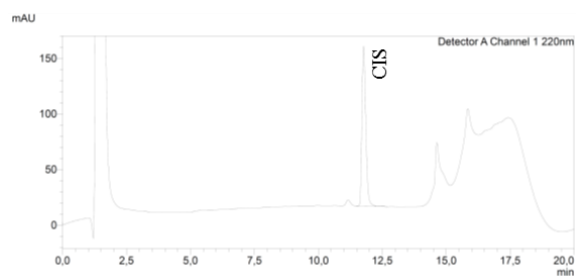
APÊNDICE 1: Cromatogramas das substâncias do ensaio do DPRA para cisteína.

Cisteína (CIS), aldeído cinâmico (AC), dodecil sulfato de sódio (SDS), dinitroclorobenzeno (DNCB), avobenzona (AVO), benzofenona-3 (BZF-3), octocrileno (OCT).

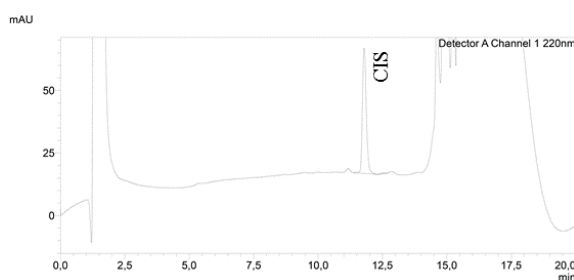
Controle de Referência CIS



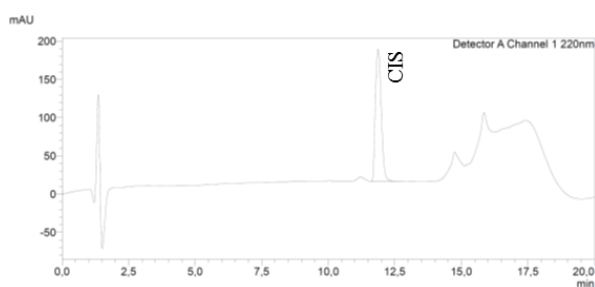
Controle de Referência centrifugado CIS



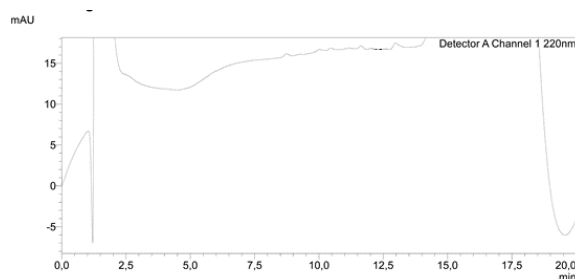
AC



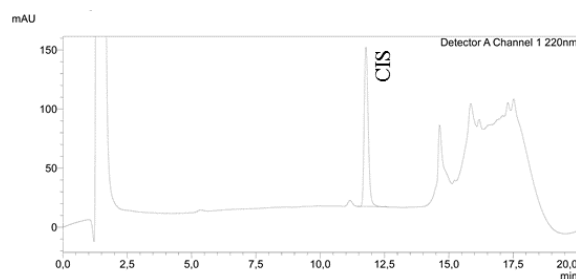
SDS



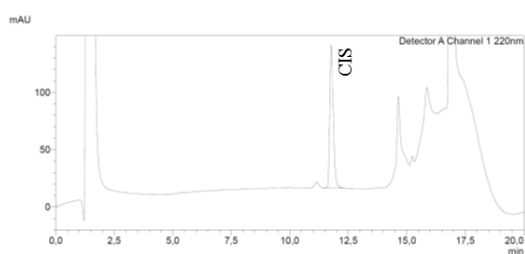
DNCB



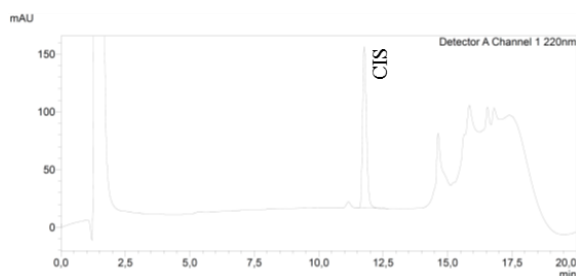
AVO



BZF-3



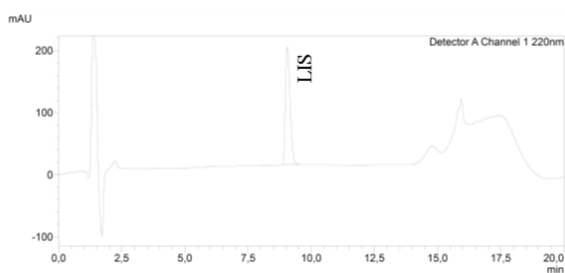
OCT



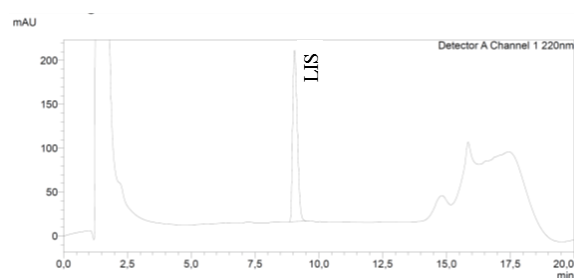
APÊNDICE 2: Cromatogramas das substâncias do ensaio do DPRA para lisina.

Lisina (LIS), aldeído cinâmico (AC), dodecil sulfato de sódio (SDS), dinitroclorobenzeno (DNCB), avobenzona (AVO), benzofenona-3 (BZF-3), octocrileno (OCT).

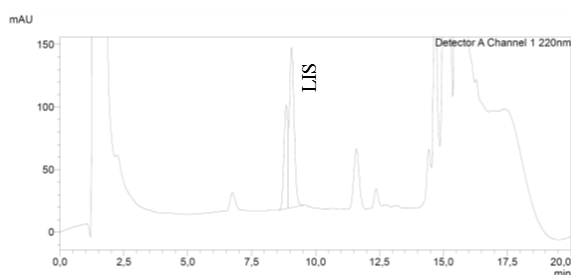
Controle de Referência LIS



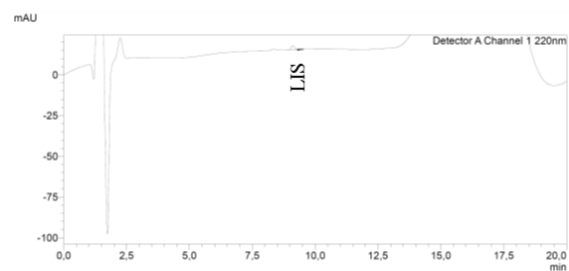
Controle de Referência centrifugado LIS



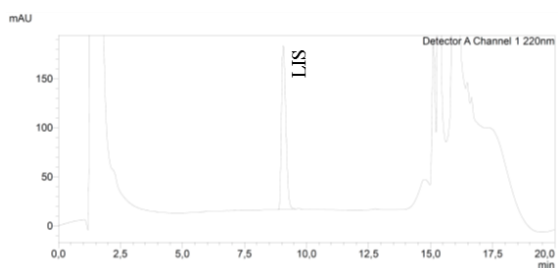
AC



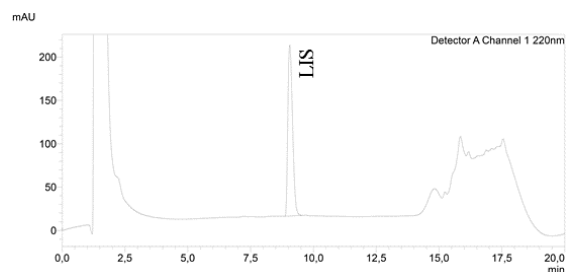
SDS



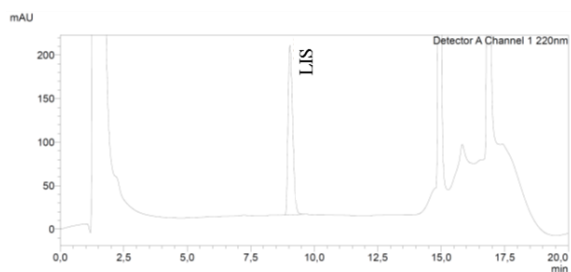
DNCB



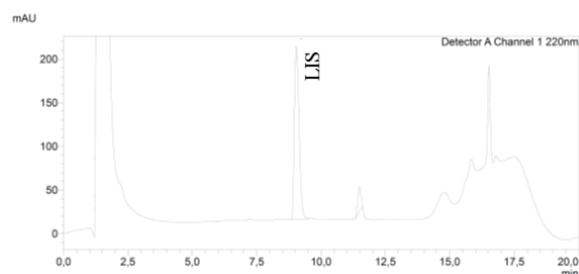
AVO



BZF-3



OCT



Anexos

ANEXO 1 – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP n.º. 002/2017
 kms

Ribeirão Preto, 25 de janeiro de 2017.

À Sra.
Prof^a. Dr^a. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro
 Departamento de Ciências Farmacêuticas
 FCFRP/USP

Prezada Professora,

Informamos que a emenda do projeto de pesquisa intitulado “**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA DE DIFERENTES MATÉRIAS-PRIMAS E FORMULAÇÕES COSMÉTICAS FOTOPROTETORAS POR MÉTODOS IN VITRO**”, apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP n.º. 372**, foi analisada e aprovada “ad referendum” do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP na presente data.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá “ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local”.

Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,


 PROF^a. DR^a. CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO
 Coordenadora do CEP/FCFRP

ANEXO 2 – TCLE 1

Termo de consentimento

Pesquisadora responsável: Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro

Pesquisadora associada: Carolina Gomes Benevenuto

Médico responsável: Dr. Flávio de Oliveira Pileggi – CRM 74.730

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Meu nome é Prof^ª. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro, sou pesquisadora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e gostaria de convidá-lo a participar desta pesquisa. Estou desenvolvendo a pesquisa “**Avaliação da sensibilização cutânea de diferentes matérias-primas e formulações cosméticas fotoprotetoras por métodos *in vitro***”, que faz parte de uma linha de pesquisa que será desenvolvida pelos pesquisadores do Laboratório de Tecnologia de Cosméticos da FCFRP-USP, com o objetivo de gerar modelos de pele humana reconstituída.

Nessa pesquisa, estamos propondo produzir modelos de pele em laboratório que tem as mesmas características da pele humana. Esse modelo de pele será utilizado para avaliar a toxicidade de produtos cosméticos e será comparado com modelos já utilizados nos Estados Unidos e Europa.

A sua participação é voluntária. Para participar, é necessário ler atentamente este documento e ouvir nossas explicações em caso de dúvidas. Se estiver interessado em participar, solicitaremos que assine este documento em duas vias, uma para o(a) Sr(a) e outra para o pesquisador.

Após ter concordado em participar do estudo e ter assinado este termo de consentimento, será utilizada uma amostra da pele do prepúcio de seu filho (ou do menor sob sua responsabilidade) que seria jogada fora após a realização da cirurgia de fimose. O procedimento da cirurgia não será alterado, sendo que a diferença seria a ceder a pele do prepúcio, que seria jogada fora, para esta pesquisa.

A pesquisa será concluída em dezembro de 2016, mas será coletada amostra de pele apenas uma vez de cada participante, ou seja, somente nesta cirurgia de fimose.

As sobras das amostras poderão ser armazenadas por até 10 anos no biorrepositório do Tecnoprot para gerar outros modelos de pele que serão utilizados para outros estudos do laboratório. Após esse período, as amostras serão descartadas.

As amostras de pele recebidas serão codificadas, para manter o nome do participante doador em segredo. Para serem utilizadas nas pesquisas, as amostras de pele deverão ser submetidas a testes para pesquisas de alguns micróbios, o vírus de vírus da imunodeficiência humana (HIV), Papilomavírus humano (HPV), vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV), Citomegalovírus, sífilis, Mycoplasma genitalium, gonorreia, herpes simplex vírus 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2), Chlamydia trachomatis e Trichomonas vaginalis. Estes testes são procedimentos padrões internacionais de qualidade, para pesquisas com pele humana. A Profa. Dra. Marcia Edilaine Lopes Consolaro, da Universidade Estadual de Maringá, será a responsável pelas análises e ela não terá acesso à identidade dos participantes doadores da pele, somente aos códigos. Todos os participantes doadores das peles poderão conhecer os resultados destes testes com a sua pele. Caso o paciente apresente resultados positivos para qualquer um dos referidos testes, o médico Dr Flávio de Oliveira Pileggi se responsabilizará em informar ao participante/responsável e fará o encaminhamento necessário. As amostras que não passarem nos testes de qualidade não serão utilizadas na pesquisa e nem guardadas no laboratório, elas serão jogadas fora.

Se a amostra passar nestes testes de qualidade, estiver sem nenhum dos micróbios pesquisados, a amostra de pele será utilizada na pesquisa e, se o(a) Sr(a) autorizar, a amostra também será guardada por até 10 anos no Biorrepositório do Tecnoprot, para gerar outros modelos de pele, que serão utilizados para outras pesquisas do nosso laboratório. Mas a cada nova pesquisa com essa pele, o(a) Sr(a) será procurado(a) para receber explicações e autorizar ou não a utilização da pele guardada.

Os riscos que podem ocorrer são os previstos para uma cirurgia, sendo que serão utilizados nessa pesquisa apenas participantes com indicação para cirurgia de fimose e as amostras utilizadas normalmente são jogadas fora nessa cirurgia.

Caso não queira participar, o seu seguimento no hospital continuará o mesmo, sem prejuízo nenhum para o seu tratamento ou cirurgia. E mesmo depois de aceitar, o(a) Sr(a) poderá desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, para isto deverá entrar em contato com o pesquisador nos telefones que aparecem neste documento.

Não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. O único benefício será o de auxiliar-nos a produzir modelos de pele para reduzir o uso de animais em pesquisa para a avaliação da segurança de produtos cosméticos.

Afirmamos que os dados obtidos serão guardados de maneira sigilosa e que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento.

Qualquer dúvida sobre esta pesquisa, entrar em contato com Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro ou Dr. Flávio de Oliveira Pileggi, pelos telefones (16) 3315-4315 ou 3602.2501 (horário comercial) ou (16) 99722-1035 (fora do horário comercial), ou no endereço Av. do Café s/n, Bairro Monte Alegre, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – SP, bloco S, sala 65A-A. E com o médico Dr. Flávio de Oliveira Pileggi no endereço Avenida Bandeirantes, 3900, ramal 2501, Bairro Monte Alegre, Hospital das Clínicas da FMRP-USP, Ribeirão Preto – SP.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – CEP/FCFRP. Em caso de dúvidas quanto aos seus direitos como participante de pesquisa entre em contato com o Comitê: Av. do Café, s/n - Monte Alegre, FCFRP/USP, CEP 14040-903, Ribeirão Preto – SP. Fone/Fax (16) 3315-4213 e-mail: cep@fcfrp.usp.br

Eu, _____, responsável pelo menor, autorizo a utilização de descarte de pele de cirurgia de fimose de _____ para a realização de pesquisa sobre a **sensibilização cutânea de diferentes matérias-primas e formulações cosméticas fotoprotetoras por métodos *in vitro***. Fui informado (a) sobre o procedimento e que o pedaço de pele retirada não causará dano a sua saúde e que as amostras serão armazenadas por até 10 anos no biorrepositório do laboratório Tecnoprot. Fui informado (a) também que a finalidade dessa pesquisa é de no futuro reduzir o uso de animais em pesquisa.
Ribeirão Preto, _____ de _____ de 201__.

Assinatura do responsável legal pelo paciente – Registro

Eu, Profa Dra Lorena Rigo Gaspar Cordeiro, conversei com o paciente sobre a coleta de material biológico, utilizando uma linguagem adequada e apropriada. Acredito que o informei o suficiente para a tomada de decisão de maneira livre e esclarecida. Comprometo-me a responder qualquer dúvida ou prestar qualquer tipo de esclarecimento durante ou após a realização deste estudo, permanecendo inteiramente à disposição no meu laboratório na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto USP (telefone 16-3315-4315 / 3315-

0252). Comprometo-me ainda a prestar informações atualizadas durante o estudo, mesmo que essas possam afetar a vontade do paciente de continuar participando.

Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro
Pesquisadora responsável

Eu, Dr. Flávio de Oliveira Pileggi, conversei com o paciente/participante sobre a coleta de material biológico, utilizando uma linguagem adequada e apropriada. Acredito que o informei o suficiente para a tomada de decisão de maneira livre e esclarecida. Comprometo-me a responder qualquer dúvida ou prestar qualquer tipo de esclarecimento durante ou após a realização deste estudo, permanecendo inteiramente à disposição no meu consultório (telefone 16-3602.2501) ou no Hospital das Clínicas da FMRP-USP. Reforço ainda o meu compromisso em acompanhar devidamente o paciente durante todo o período de sua participação no projeto.

Dr. Flávio de Oliveira Pileggi – CRM 74.730
Assinatura do Médico

ANEXO 3 – Termo de armazenamento de amostras biológicas 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Armazenamento de Amostras Biológicas

Na cirurgia de fimose do seu filho ou do menor sob sua responsabilidade será retirado um excesso da pele do pênis dele. Esse excesso de pele será jogado fora após a cirurgia. Mas ao invés de ser jogada fora, essa pele pode ser usada em pesquisa.

O(a) Senhor(a) está sendo convidado a ceder essa pele que será jogada fora para ser utilizada em pesquisas científicas. A pele será guardada no laboratório Tecnoprot, sob responsabilidade da Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP)-USP. A cada nova pesquisa com essa pele, o Senhor será procurado para receber explicações e autorizar ou não a utilização da amostra já armazenada.

Caso concorde, o(a) Senhor(a) cederá uma amostra da pele do prepúcio de seu filho ou do menor sob sua responsabilidade, que seria jogada fora após a realização da cirurgia de fimose. O(A) Senhor(a) deverá assinar duas vias deste documento, uma para o(a) Senhor(a) e outra para o pesquisador.

A sua autorização para nos ceder a pele para pesquisa não causará nenhum problema para a saúde do seu filho ou do menor sob sua responsabilidade e nenhuma mudança no procedimento da cirurgia. Os riscos que podem ocorrer são os previstos para uma cirurgia, sendo que serão utilizados nessa pesquisa apenas voluntários com indicação para cirurgia de fimose.

As amostras de pele recebidas serão codificadas, para manter o nome do participante doador em segredo. Para serem utilizadas nas pesquisas, as amostras de pele deverão ser submetidas a testes para pesquisas de alguns micróbios, o vírus da imunodeficiência humana (HIV), Papilomavírus humano (HPV), vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV), Citomegalovírus, sífilis, *Mycoplasma genitalium*, gonorréia, herpes simplex vírus 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2), *Chlamydia trachomatis* e *Trichomonas vaginalis*. Estes testes são procedimentos padrões internacionais de qualidade, para pesquisas com pele humana. A Profa. Dra. Marcia Edilaine Lopes Consolaro, da Universidade Estadual de Maringá, será a responsável pelas análises e ela não terá acesso à identidade dos participantes doadores da pele, somente aos códigos. Todos os participantes doadores das peles poderão conhecer os resultados destes testes com a sua pele. Caso o paciente apresente resultados positivos para qualquer um dos referidos testes, o Dr. Flávio de Oliveira Pileggi se responsabilizará em informar ao participante/responsável e fará o encaminhamento necessário. As amostras que não passarem nos testes de qualidade não serão utilizadas na pesquisa e nem guardadas no laboratório, elas serão jogadas fora.

Esta amostra de pele e os seus dados coletados serão identificados por códigos de modo que garanta seu sigilo. Se a amostra passar nestes testes de qualidade, estiver sem nenhum dos micróbios pesquisados, a amostra de pele será utilizada na pesquisa e, se o(a) Sr(a) autorizar, a amostra também será guardada por até 10 anos no Biorrepositório do Tecnoprot, para gerar outros modelos de pele, que serão utilizados para outras pesquisas do nosso laboratório. Mas a cada nova pesquisa com essa pele, o(a) Sr(a) será procurado(a) para receber explicações e autorizar ou não a utilização da pele guardada. O reservatório de amostras biológicas, registrado como “Biorrepositório do Tecnoprot” (Laboratório de Tecnologia de Cosméticos Aplicada à Fotoproteção) está localizado no Laboratório de Tecnologia de Cosméticos Aplicada à Fotoproteção da FCFRP-USP, sala 65, 2º andar, Bloco S, sob minha responsabilidade. Ao final deste tempo de armazenamento, a amostra de pele será jogada fora.

O(a) Senhor(a) poderá desistir de participar a qualquer momento. Para isso, basta entrar em contato com o pesquisador principal responsável por esta pesquisa nos endereços constantes no final deste documento, para que eu possa suspender o armazenamento da sua amostra de pele, que poderá ser entregue ao/à Senhor(a), se assim desejar, ou jogada fora, após seu consentimento por escrito.

Caso não concorde em ceder a pele do prepúcio de seu filho ou do menor sob sua responsabilidade ou desista de permitir que se guarde esta pele, essa decisão não lhe trará qualquer prejuízo do atendimento que lhe for prestado, ou seja, não haverá nenhum prejuízo para a realização da cirurgia de fimose de seu filho ou do menor sob sua responsabilidade. Coloco-me à disposição para lhe fornecer o resultado da pesquisa realizada com sua amostra.

A coleta deste material biológico nesse momento não trará nenhum benefício imediato para o(a) Senhor(a). Entretanto, no futuro, os dados obtidos com novas pesquisas poderão ajudar outras pessoas e reduzir o uso de animais em pesquisa.

Em caso de dúvida o (a) Senhor(a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da FCFRP-USP pelo e-mail cep@fcfrp.usp.br ou pelo fone (16) 3315-4213 e com os pesquisadores Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro ou Dr. Flávio de Oliveira Pileggi, pelos telefones (16) 3315-4315 (horário comercial) ou (16) 99722-1035 (fora do horário comercial), ou no endereço da FCFRP-USP: Av. do Café s/n, Bairro Monte Alegre, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – SP, bloco S, sala 65A-A. E com o médico Dr. Flávio de Oliveira Pileggi no endereço Avenida Bandeirantes, 3900 - Monte Alegre, Ribeirão Preto – SP, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP telefone: (16) 3602-1000.

Declaro que toda nova pesquisa, utilizando sua amostra de pele, será realizada somente quando o projeto for aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP e com o seu consentimento prévio.

Profa Dra Lorena Rigo Gaspar Cordeiro

Pesquisador responsável

Tel: (16) 3315- 4315/3315 0252 / (16) 99722-1035 email: lorena@fcfrp.usp.br

Consentimento do Participante de Pesquisa

Eu, _____, RG: _____, residente na Rua _____ (número, bairro, cidade, telefone), aceito que a amostra de pele, que seria jogada fora após a cirurgia de fimose do meu filho ou do menor sob minha responsabilidade, seja armazenada pela Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro na FCFRP-USP para fins de pesquisa científica. Declaro estar ciente de que a previsão de guarda do material é de no máximo 10 anos e que serei consultado pela pesquisadora para dar meu consentimento para toda pesquisa que será realizada com esta pele.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____.

Assinatura do pai/mãe ou responsável

ANEXO 4 – TCLE 2

Termo de consentimento

Pesquisadora responsável: Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro

Pesquisadora associada: Carolina Gomes Benevenuto

Médico responsável: Dra. Alexandra Longo Camperoni – CRM 89074

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Meu nome é Prof^ª. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro, sou pesquisadora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e gostaria de convidá-lo a participar desta pesquisa. Estou desenvolvendo a pesquisa “**Avaliação da sensibilização cutânea de diferentes matérias-primas e formulações cosméticas fotoprotetoras por métodos *in vitro***”, que faz parte de uma linha de pesquisa que será desenvolvida pelos pesquisadores do Laboratório de Tecnologia de Cosméticos da FCFRP-USP, com o objetivo de gerar modelos de pele humana reconstituída.

Nessa pesquisa, estamos propondo produzir modelos de pele em laboratório que tem as mesmas características da pele humana. Esse modelo de pele será utilizado para avaliar a toxicidade de produtos cosméticos e será comparado com modelos já utilizados nos Estados Unidos e Europa.

A sua participação é voluntária. Para participar, é necessário ler atentamente este documento e ouvir nossas explicações em caso de dúvidas. Se estiver interessado em participar, solicitaremos que assine este documento em duas vias, uma para o(a) Sr(a) e outra para o pesquisador.

Após ter concordado em participar do estudo e ter assinado este termo de consentimento, será utilizada uma amostra da pele do prepúcio de seu filho (ou do menor sob sua responsabilidade) que seria jogada fora após a realização da cirurgia de fimose. O procedimento da cirurgia não será alterado, sendo que a diferença seria a ceder a pele do prepúcio, que seria jogada fora, para esta pesquisa.

A pesquisa será concluída em dezembro de 2016, mas será coletada amostra de pele apenas uma vez de cada participante, ou seja, somente nesta cirurgia de fimose.

As sobras das amostras poderão ser armazenadas por até 10 anos no biorrepositório do Tecnoprot para gerar outros modelos de pele que serão utilizados para outros estudos do laboratório. Após esse período, as amostras serão descartadas.

As amostras de pele recebidas serão codificadas, para manter o nome do participante doador em segredo. Para serem utilizadas nas pesquisas, as amostras de pele deverão ser submetidas a testes para pesquisas de alguns micróbios, o vírus de vírus da imunodeficiência humana (HIV), Papilomavírus humano (HPV), vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV), Citomegalovírus, sífilis, Mycoplasma genitalium, gonorreia, herpes simplex vírus 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2), Chlamydia trachomatis e Trichomonas vaginalis. Estes testes são procedimentos padrões internacionais de qualidade, para pesquisas com pele humana. A Profa. Dra. Marcia Edilaine Lopes Consolaro, da Universidade Estadual de Maringá, será a responsável pelas análises e ela não terá acesso à identidade dos participantes doadores da pele, somente aos códigos. Todos os participantes doadores das peles poderão conhecer os resultados destes testes com a sua pele. Caso o paciente apresente resultados positivos para qualquer um dos referidos testes, a médica Dra. Alexandra L. Camperoni se responsabilizará em informar ao participante/responsável e fará o encaminhamento necessário. As amostras que não passarem nos testes de qualidade não serão utilizadas na pesquisa e nem guardadas no laboratório, elas serão jogadas fora.

Se a amostra passar nestes testes de qualidade, estiver sem nenhum dos micróbios pesquisados, a amostra de pele será utilizada na pesquisa e, se o(a) Sr(a) autorizar, a amostra também será guardada por até 10 anos no Biorrepositório do Tecnoprot, para gerar outros modelos de pele, que serão utilizados para outras pesquisas do nosso laboratório. Mas a cada nova pesquisa com essa pele, o(a) Sr(a) será procurado(a) para receber explicações e autorizar ou não a utilização da pele guardada.

Os riscos que podem ocorrer são os previstos para uma cirurgia, sendo que serão utilizados nessa pesquisa apenas participantes com indicação para cirurgia de fimose e as amostras utilizadas normalmente são jogadas fora nessa cirurgia.

Caso não queira participar, o seu seguimento no hospital continuará o mesmo, sem prejuízo nenhum para o seu tratamento ou cirurgia. E mesmo depois de aceitar, o(a) Sr(a) poderá desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, para isto deverá entrar em contato com o pesquisador nos telefones que aparecem neste documento.

Não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. O único benefício será o de auxiliar-nos a produzir modelos de pele para reduzir o uso de animais em pesquisa para a avaliação da segurança de produtos cosméticos.

Afirmamos que os dados obtidos serão guardados de maneira sigilosa e que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento.

Qualquer dúvida sobre esta pesquisa, entrar em contato com Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro ou Dra. Alexandra Longo Camperoni, pelos telefones (16) 3315-4315 ou 3372-9511 (horário comercial) ou (16) 99722-1035 (fora do horário comercial), ou no endereço Av. do Café s/n, Bairro Monte Alegre, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – SP, bloco S, sala 65A-A. E com a médica Dra. Alexandra Longo Camperoni no endereço Av Independência, 4750 - Jardim Califórnia -916 Ribeirão Preto, SP - Cep: 14026-160, Hospital Estadual de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto – SP, telefone: (16) 3902-3333.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – CEP/FCFRP. Em caso de dúvidas quanto aos seus direitos como participante de pesquisa entre em contato com o Comitê: Av. do Café, s/n - Monte Alegre, FCFRP/USP, CEP 14040-903, Ribeirão Preto – SP. Fone/Fax (16) 3315-4213 e-mail: cep@fcfrp.usp.br

 Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro
 PESQUISADORA PRINCIPAL

Eu, _____, responsável pelo menor, autorizo a utilização de descarte de pele de cirurgia de fimose de _____ para a realização de pesquisa sobre a **sensibilização cutânea de diferentes matérias-primas e formulações cosméticas fotoprotetoras por métodos *in vitro***. Fui informado (a) sobre o procedimento e que o pedaço de pele retirada não causará dano a sua saúde e que as amostras serão armazenadas por até 10 anos no biorrepositório do laboratório Tecnoprot. Fui informado (a) também que a finalidade dessa pesquisa é de no futuro reduzir o uso de animais em pesquisa.
 Ribeirão Preto, _____ de _____ de 201__.

 Assinatura do responsável legal pelo paciente – Registro

Eu, _____, conversei com o paciente sobre a coleta de material biológico, utilizando uma linguagem adequada e apropriada. Acredito que o

informei o suficiente para a tomada de decisão de maneira livre e esclarecida. Comprometo-me a responder qualquer dúvida ou prestar qualquer tipo de esclarecimento durante ou após a realização deste estudo, permanecendo inteiramente à disposição no meu laboratório na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto USP (telefone 16-3315-4315 / 3315-0252). Comprometo-me ainda a prestar informações atualizadas durante o estudo, mesmo que essas possam afetar a vontade do paciente de continuar participando.

Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro
Pesquisadora responsável

Eu, _____, conversei com o paciente/participante sobre a coleta de material biológico, utilizando uma linguagem adequada e apropriada. Acredito que o informei o suficiente para a tomada de decisão de maneira livre e esclarecida. Comprometo-me a responder qualquer dúvida ou prestar qualquer tipo de esclarecimento durante ou após a realização deste estudo, permanecendo inteiramente à disposição no meu consultório (telefone 16-3519-4444) ou no Hospital Estadual de Ribeirão Preto. Reforço ainda o meu compromisso em acompanhar devidamente o paciente durante todo o período de sua participação no projeto.

Dra. Alexandra Longo Camperoni

ANEXO 5 – Termo de armazenamento de amostras biológicas 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Armazenamento de Amostras Biológicas

Na cirurgia de fimose do seu filho ou do menor sob sua responsabilidade será retirado um excesso da pele do pênis dele. Esse excesso de pele será jogado fora após a cirurgia. Mas ao invés de ser jogada fora, essa pele pode ser usada em pesquisa.

O(a) Senhor(a) está sendo convidado a ceder essa pele que será jogada fora para ser utilizada em pesquisas científicas. A pele será guardada no laboratório Tecnoprot, sob responsabilidade da Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP)-USP. A cada nova pesquisa com essa pele, o Senhor será procurado para receber explicações e autorizar ou não a utilização da amostra já armazenada.

Caso concorde, o(a) Senhor(a) cederá uma amostra da pele do prepúcio de seu filho ou do menor sob sua responsabilidade, que seria jogada fora após a realização da cirurgia de fimose. O(A) Senhor(a) deverá assinar duas vias deste documento, uma para o(a) Senhor(a) e outra para o pesquisador.

A sua autorização para nos ceder a pele para pesquisa não causará nenhum problema para a saúde do seu filho ou do menor sob sua responsabilidade e nenhuma mudança no procedimento da cirurgia. Os riscos que podem ocorrer são os previstos para uma cirurgia, sendo que serão utilizados nessa pesquisa apenas voluntários com indicação para cirurgia de fimose.

As amostras de pele recebidas serão codificadas, para manter o nome do participante doador em segredo. Para serem utilizadas nas pesquisas, as amostras de pele deverão ser submetidas a testes para pesquisas de alguns micróbios, o vírus da imunodeficiência humana (HIV), Papilomavírus humano (HPV), vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV), Citomegalovírus, sífilis, *Mycoplasma genitalium*, gonorréia, herpes simplex vírus 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2), *Chlamydia trachomatis* e *Trichomonas vaginalis*. Estes testes são procedimentos padrões internacionais de qualidade, para pesquisas com pele humana. A Profa. Dra. Marcia Edilaine Lopes Consolaro, da Universidade Estadual de Maringá, será a responsável pelas análises e ela não terá acesso à identidade dos participantes doadores da pele, somente aos códigos. Todos os participantes doadores das peles poderão conhecer os resultados destes testes com a sua pele. Caso o paciente apresente resultados positivos para qualquer um dos referidos testes, a médica Dra. Alexandra Longo Camperoni se responsabilizará em informar ao participante/responsável e fará o encaminhamento necessário. As amostras que não passarem nos testes de qualidade não serão utilizadas na pesquisa e nem guardadas no laboratório, elas serão jogadas fora.

Esta amostra de pele e os seus dados coletados serão identificados por códigos de modo que garanta seu sigilo. Se a amostra passar nestes testes de qualidade, estiver sem nenhum dos micróbios pesquisados, a amostra de pele será utilizada na pesquisa e, se o(a) Sr(a) autorizar, a amostra também será guardada por até 10 anos no Biorrepositório do Tecnoprot, para gerar outros modelos de pele, que serão utilizados para outras pesquisas do nosso laboratório. Mas a cada nova pesquisa com essa pele, o(a) Sr(a) será procurado(a) para receber explicações e autorizar ou não a utilização da pele guardada. O reservatório de amostras biológicas, registrado como “Biorrepositório do Tecnoprot” (Laboratório de Tecnologia de Cosméticos Aplicada à Fotoproteção) está localizado no Laboratório de Tecnologia de Cosméticos Aplicada à Fotoproteção da FCFRP-USP, sala 65, 2º andar, Bloco S, sob minha responsabilidade. Ao final deste tempo de armazenamento, a amostra de pele será jogada fora.

O(a) Senhor(a) poderá desistir de participar a qualquer momento. Para isso, basta entrar em contato com o pesquisador principal responsável por esta pesquisa nos endereços constantes no final deste documento, para que eu possa suspender o armazenamento da sua amostra de pele, que poderá ser entregue ao/à Senhor(a), se assim desejar, ou jogada fora, após seu consentimento por escrito.

Caso não concorde em ceder a pele do prepúcio de seu filho ou do menor sob sua responsabilidade ou desista de permitir que se guarde esta pele, essa decisão não lhe trará qualquer prejuízo do atendimento que lhe for prestado, ou seja, não haverá nenhum prejuízo para a realização da cirurgia de fimose de seu filho ou do menor sob sua responsabilidade. Coloco-me à disposição para lhe fornecer o resultado da pesquisa realizada com sua amostra.

A coleta deste material biológico nesse momento não trará nenhum benefício imediato para o(a) Senhor(a). Entretanto, no futuro, os dados obtidos com novas pesquisas poderão ajudar outras pessoas e reduzir o uso de animais em pesquisa.

Em caso de dúvida o (a) Senhor(a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da FCFRP-USP pelo e-mail cep@fcfrp.usp.br ou pelo fone (16) 3315-4213 e com os pesquisadores Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro ou Dra. Alexandra Longo Camperoni, pelos telefones (16) 3315-4315 ou 3372-9511 (horário comercial) ou (16) 99722-1035 (fora do horário comercial), ou no endereço da FCFRP-USP: Av. do Café s/n, Bairro Monte Alegre, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – SP, bloco S, sala 65A-A. E com médica Dra. Alexandra Longo Camperoni no endereço Av Independência, 4750 - Jardim Califórnia -916 Ribeirão Preto, SP - Cep: 14026-160, Hospital Estadual de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto – SP, telefone: (16) 3902-3333.

Declaro que toda nova pesquisa, utilizando sua amostra de pele, será realizada somente quando o projeto for aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP e com o seu consentimento prévio.

Profa Dra Lorena Rigo Gaspar Cordeiro

Pesquisador responsável

Tel: (16) 3315- 4315/3315 0252 / (16) 99722-1035 email: lorena@fcfrp.usp.br

Consentimento do Participante de Pesquisa

Eu, _____, RG: _____, residente na Rua _____ (número, bairro, cidade, telefone), aceito que a amostra de pele, que seria jogada fora após a cirurgia de fimose do meu filho ou do menor sob minha responsabilidade, seja armazenada pela Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro na FCFRP-USP para fins de pesquisa científica. Declaro estar ciente de que a previsão de guarda do material é de no máximo 10 anos e que serei consultado pela pesquisadora para dar meu consentimento para toda pesquisa que será realizada com esta pele.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____.

Assinatura do pai/mãe ou responsável

ANEXO 6 – TCLE 3

Termo de consentimento

Pesquisadora responsável: Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro

Pesquisadora associada: Carolina Gomes Benevenuto

Médico responsável: Dra Maria de Fátima Galli Sorita Tazima (CRM: 49089)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Meu nome é Prof^ª. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro, sou pesquisadora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e gostaria de convidá-lo a participar desta pesquisa. Estou desenvolvendo a pesquisa “**Avaliação da sensibilização cutânea de diferentes matérias-primas e formulações cosméticas fotoprotetoras por métodos *in vitro***”, que faz parte de uma linha de pesquisa que será desenvolvida pelos pesquisadores do Laboratório de Tecnologia de Cosméticos da FCFRP-USP, com o objetivo de gerar modelos de pele humana reconstituída.

Nessa pesquisa, estamos propondo produzir modelos de pele em laboratório que tem as mesmas características da pele humana. Esse modelo de pele será utilizado para avaliar a toxicidade de produtos cosméticos e será comparado com modelos já utilizados nos Estados Unidos e Europa.

A sua participação é voluntária. Para participar, é necessário ler atentamente este documento e ouvir nossas explicações em caso de dúvidas. Se estiver interessado em participar, solicitaremos que assine este documento em duas vias, uma para o(a) Sr(a) e outra para o pesquisador.

Após ter concordado em participar do estudo e ter assinado este termo de consentimento, será utilizada uma amostra da pele do prepúcio de seu filho (ou do menor sob sua responsabilidade) que seria jogada fora após a realização da cirurgia de fimose. O procedimento da cirurgia não será alterado, sendo que a diferença seria a ceder a pele do prepúcio, que seria jogada fora, para esta pesquisa.

A pesquisa será concluída em dezembro de 2016, mas será coletada amostra de pele apenas uma vez de cada participante, ou seja, somente nesta cirurgia de fimose.

As sobras das amostras poderão ser armazenadas por até 10 anos no biorrepositório do Tecnoprot para gerar outros modelos de pele que serão utilizados para outros estudos do laboratório. Após esse período, as amostras serão descartadas.

As amostras de pele recebidas serão codificadas, para manter o nome do participante doador em segredo. Para serem utilizadas nas pesquisas, as amostras de pele deverão ser submetidas a testes para pesquisas de alguns micróbios, o vírus de vírus da imunodeficiência humana (HIV), Papilomavírus humano (HPV), vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV), Citomegalovirus, sífilis, Mycoplasma genitalium, gonorreia, herpes simplex vírus 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2), Chlamydia trachomatis e Trichomonas vaginalis. Estes testes são procedimentos padrões internacionais de qualidade, para pesquisas com pele humana. A Profa. Dra. Marcia Edilaine Lopes Consolaro, da Universidade Estadual de Maringá, será a responsável pelas análises e ela não terá acesso à identidade dos participantes doadores da pele, somente aos códigos. Todos os participantes doadores das peles poderão conhecer os resultados destes testes com a sua pele. Caso o paciente apresente resultados positivos para qualquer um dos referidos testes, a médica Dra. Maria de Fátima Galli Sorita Tazima se responsabilizará em informar ao participante/responsável e fará o encaminhamento necessário. As amostras que não passarem nos testes de qualidade não serão utilizadas na pesquisa e nem guardadas no laboratório, elas serão jogadas fora.

Se a amostra passar nestes testes de qualidade, estiver sem nenhum dos micróbios pesquisados, a amostra de pele será utilizada na pesquisa e, se o(a) Sr(a) autorizar, a amostra também será guardada por até 10 anos no Biorrepositório do Tecnoprot, para gerar outros modelos de pele, que serão utilizados para outras pesquisas do nosso laboratório. Mas a cada nova pesquisa com essa pele, o(a) Sr(a) será procurado(a) para receber explicações e autorizar ou não a utilização da pele guardada.

Os riscos que podem ocorrer são os previstos para uma cirurgia, sendo que serão utilizados nessa pesquisa apenas participantes com indicação para cirurgia de fimose e as amostras utilizadas normalmente são jogadas fora nessa cirurgia.

Caso não queira participar, o seu seguimento no hospital continuará o mesmo, sem prejuízo nenhum para o seu tratamento ou cirurgia. E mesmo depois de aceitar, o(a) Sr(a) poderá desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, para isto deverá entrar em contato com o pesquisador nos telefones que aparecem neste documento.

Não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. O único benefício será o de auxiliar-nos a produzir modelos de pele para reduzir o uso de animais em pesquisa para a avaliação da segurança de produtos cosméticos.

Afirmamos que os dados obtidos serão guardados de maneira sigilosa e que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento.

Qualquer dúvida sobre esta pesquisa, entrar em contato com Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro ou Dra. Maria de Fátima Galli Sorita Tazima, pelos telefones (16) 3315-4315 ou (16) 99722-1035 (fora do horário comercial), ou no endereço Av. do Café s/n, Bairro Monte Alegre, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – SP, bloco S, sala 65A-A. E com a médica Dra. Maria de Fátima Galli Sorita Tazima no endereço Av Independência, 4750 - Jardim Califórnia -916 Ribeirão Preto, SP - Cep: 14026-160, Hospital Estadual de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto – SP, telefone: (16) 36027100.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – CEP/FCFRP. Em caso de dúvidas quanto aos seus direitos como participante de pesquisa entre em contato com o Comitê: Av. do Café, s/n - Monte Alegre, FCFRP/USP, CEP 14040-903, Ribeirão Preto – SP. Fone/Fax (16) 3315-4213 e-mail: cep@fcfrp.usp.br

 Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro
 PESQUISADORA PRINCIPAL

Eu, _____, responsável pelo menor, autorizo a utilização de descarte de pele de cirurgia de fimose de _____ para a realização de pesquisa sobre a **sensibilização cutânea de diferentes matérias-primas e formulações cosméticas fotoprotetoras por métodos *in vitro***. Fui informado (a) sobre o procedimento e que o pedaço de pele retirada não causará dano a sua saúde e que as amostras serão armazenadas por até 10 anos no biorrepositório do laboratório Tecnoprot. Fui informado (a) também que a finalidade dessa pesquisa é de no futuro reduzir o uso de animais em pesquisa.
 Ribeirão Preto, _____ de _____ de 201__.

 Assinatura do responsável legal pelo paciente – Registro

Eu, _____, conversei com o paciente sobre a coleta de material biológico, utilizando uma linguagem adequada e apropriada. Acredito que o informei o suficiente para a tomada de decisão de maneira livre e esclarecida. Comprometo-

me a responder qualquer dúvida ou prestar qualquer tipo de esclarecimento durante ou após a realização deste estudo, permanecendo inteiramente à disposição no meu laboratório na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto USP (telefone 16-3315-4315 / 3315-0252). Comprometo-me ainda a prestar informações atualizadas durante o estudo, mesmo que essas possam afetar a vontade do paciente de continuar participando.

Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro
Pesquisadora responsável

Eu, _____, conversei com o paciente/participante sobre a coleta de material biológico, utilizando uma linguagem adequada e apropriada. Acredito que o informei o suficiente para a tomada de decisão de maneira livre e esclarecida. Comprometo-me a responder qualquer dúvida ou prestar qualquer tipo de esclarecimento durante ou após a realização deste estudo, permanecendo inteiramente à disposição no meu consultório (telefone 16-36027100) ou no Hospital Estadual de Ribeirão Preto. Reforço ainda o meu compromisso em acompanhar devidamente o paciente durante todo o período de sua participação no projeto.

Dra. Maria de Fátima Galli Sorita Tazima – CRM 49089
Assinatura do Médico

ANEXO 7 – Termo de armazenamento de amostras biológicas 3

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Armazenamento de Amostras Biológicas

Na cirurgia de fimose do seu filho ou do menor sob sua responsabilidade será retirado um excesso da pele do pênis dele. Esse excesso de pele será jogado fora após a cirurgia. Mas ao invés de ser jogada fora, essa pele pode ser usada em pesquisa.

O(a) Senhor(a) está sendo convidado a ceder essa pele que será jogada fora para ser utilizada em pesquisas científicas. A pele será guardada no laboratório Tecnoprot, sob responsabilidade da Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP)-USP. A cada nova pesquisa com essa pele, o Senhor será procurado para receber explicações e autorizar ou não a utilização da amostra já armazenada.

Caso concorde, o(a) Senhor(a) cederá uma amostra da pele do prepúcio de seu filho ou do menor sob sua responsabilidade, que seria jogada fora após a realização da cirurgia de fimose. O(A) Senhor(a) deverá assinar duas vias deste documento, uma para o(a) Senhor(a) e outra para o pesquisador.

A sua autorização para nos ceder a pele para pesquisa não causará nenhum problema para a saúde do seu filho ou do menor sob sua responsabilidade e nenhuma mudança no procedimento da cirurgia. Os riscos que podem ocorrer são os previstos para uma cirurgia, sendo que serão utilizados nessa pesquisa apenas voluntários com indicação para cirurgia de fimose.

As amostras de pele recebidas serão codificadas, para manter o nome do participante doador em segredo. Para serem utilizadas nas pesquisas, as amostras de pele deverão ser submetidas a testes para pesquisas de alguns micróbios, o vírus da imunodeficiência humana (HIV), Papilomavírus humano (HPV), vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV), Citomegalovírus, sífilis, *Mycoplasma genitalium*, gonorréia, herpes simplex vírus 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2), *Chlamydia trachomatis* e *Trichomonas vaginalis*. Estes testes são procedimentos padrões internacionais de qualidade, para pesquisas com pele humana. A Profa. Dra. Marcia Edilaine Lopes Consolaro, da Universidade Estadual de Maringá, será a responsável pelas análises e ela não terá acesso à identidade dos participantes doadores da pele, somente aos códigos. Todos os participantes doadores das peles poderão conhecer os resultados destes testes com a sua pele. Caso o paciente apresente resultados positivos para qualquer um dos referidos testes, a médica Dra. Maria de Fátima Galli Sorita Tazima se responsabilizará em informar ao participante/responsável e fará o encaminhamento necessário. As amostras que não passarem nos testes de qualidade não serão utilizadas na pesquisa e nem guardadas no laboratório, elas serão jogadas fora.

Esta amostra de pele e os seus dados coletados serão identificados por códigos de modo que garanta seu sigilo. Se a amostra passar nestes testes de qualidade, estiver sem nenhum dos micróbios pesquisados, a amostra de pele será utilizada na pesquisa e, se o(a) Sr(a) autorizar, a amostra também será guardada por até 10 anos no Biorrepositório do Tecnoprot, para gerar outros modelos de pele, que serão utilizados para outras pesquisas do nosso laboratório. Mas a cada nova pesquisa com essa pele, o(a) Sr(a) será procurado(a) para receber explicações e autorizar ou não a utilização da pele guardada. O reservatório de amostras biológicas, registrado como “Biorrepositório do Tecnoprot” (Laboratório de Tecnologia de Cosméticos Aplicada à Fotoproteção) está localizado no Laboratório de Tecnologia de Cosméticos Aplicada à Fotoproteção da FCFRP-USP, sala 65, 2º andar, Bloco S, sob minha responsabilidade. Ao final deste tempo de armazenamento, a amostra de pele será jogada fora.

O(a) Senhor(a) poderá desistir de participar a qualquer momento. Para isso, basta entrar em contato com o pesquisador principal responsável por esta pesquisa nos endereços constantes no final deste documento, para que eu possa suspender o armazenamento da sua amostra de pele, que poderá ser entregue ao/à Senhor(a), se assim desejar, ou jogada fora, após seu consentimento por escrito.

Caso não concorde em ceder a pele do prepúcio de seu filho ou do menor sob sua responsabilidade ou desista de permitir que se guarde esta pele, essa decisão não lhe trará qualquer prejuízo do atendimento que lhe for prestado, ou seja, não haverá nenhum prejuízo para a realização da cirurgia de fimose de seu filho ou do menor sob sua responsabilidade. Coloco-me à disposição para lhe fornecer o resultado da pesquisa realizada com sua amostra.

A coleta deste material biológico nesse momento não trará nenhum benefício imediato para o(a) Senhor(a). Entretanto, no futuro, os dados obtidos com novas pesquisas poderão ajudar outras pessoas e reduzir o uso de animais em pesquisa.

Em caso de dúvida o (a) Senhor(a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da FCFRP-USP pelo e-mail cep@fcfrp.usp.br ou pelo fone (16) 3315-4213 e com os pesquisadores Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro ou Dra. Maria de Fátima Galli Sorita Tazima, pelos telefones (16) 3315-4315 ou (16) 99722-1035 (fora do horário comercial), ou no endereço da FCFRP-USP: Av. do Café s/n, Bairro Monte Alegre, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – SP, bloco S, sala 65A-A. E com médica Dra. Maria de Fátima Galli Sorita Tazima no endereço Av Independência, 4750 - Jardim Califórnia -916 Ribeirão Preto, SP - Cep: 14026-160, Hospital Estadual de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto – SP, telefone: (16) 36077100.

Declaro que toda nova pesquisa, utilizando sua amostra de pele, será realizada somente quando o projeto for aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP e com o seu consentimento prévio.

Profa Dra Lorena Rigo Gaspar Cordeiro

Pesquisador responsável

Tel: (16) 3315- 4315/3315 0252 / (16) 99722-1035 email: lorena@fcfrp.usp.br

Consentimento do Participante de Pesquisa

Eu, _____, RG: _____, residente na Rua _____ (número, bairro, cidade, telefone), aceito que a amostra de pele, que seria jogada fora após a cirurgia de fimose do meu filho ou do menor sob minha responsabilidade, seja armazenada pela Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro na FCFRP-USP para fins de pesquisa científica. Declaro estar ciente de que a previsão de guarda do material é de no máximo 10 anos e que serei consultado pela pesquisadora para dar meu consentimento para toda pesquisa que será realizada com esta pele.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____.

Assinatura do pai/mãe ou responsável

ANEXO 8 – Termo de assentimento do menor

Termo de Assentimento

Este é um convite para participar de uma pesquisa. Nós somos pesquisadores da USP que fazemos cosméticos e cremes novos.

No laboratório, nós precisamos testar esses cosméticos e cremes em pedaços de pele que são jogados fora depois de cirurgias de fimose, iguais essa que você irá fazer (que é a retirada de um excesso da pele do pênis). A pele que será retirada na sua cirurgia será jogada fora.

Você concorda que a pele seja usada na nossa pesquisa ao invés de ser jogada fora? Esta pele não servirá mais para você, mas ela serve para nossa pesquisa.

Você não é obrigado a participar. Sua cirurgia acontecerá do mesmo jeito, sem problemas.

A pele será usada se você e o seu responsável concordarem. O seu nome ficará sempre em segredo. Se concordar, você precisa assinar 2 papéis iguais a este, um será seu e o outro da pesquisadora.

Nós queremos guardar o pedaço de pele que sobrar para outras pesquisas. Nós perguntaremos para você e para o seu responsável se concordarão com a nova pesquisa quando elas forem feitas.

E mesmo depois de aceitar participar, se você tiver qualquer dúvida sobre a pesquisa ou se você quiser desistir, é só nos avisar pelos telefones escritos no final deste papel ou falar com a Doutora Alexandra Longo Camperoni.

Você não vai gastar e nem ganhar dinheiro para participar da pesquisa.

Sua participação vai nos ajudar a não usar animais em pesquisa para cosméticos e cremes.

Eu, _____, concordo que a pele retirada durante a minha cirurgia de fimose, que seria jogada fora, seja usada na pesquisa “Avaliação da sensibilização cutânea de diferentes matérias-primas e formulações cosméticas fotoprotetoras por métodos *in vitro*” e também guardada para outras pesquisas. E eu e meu responsável seremos consultados para concordar ou não com outras pesquisas.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____.

Assinatura do menor

Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro - Pesquisadora responsável
Fones: (16) 3315-4315 ou 3372-9511 ou 99722-1035

ANEXO 9 – TCLE COLETA DE SANGUE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da pesquisa: "Avaliação da sensibilização cutânea de diferentes matérias-primas e formulações cosméticas fotoprotetoras por métodos *in vitro*".

Pesquisadora responsável: Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro

Pesquisadores associados: Carolina Gomes Benevenuto, Profa. Dra. Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias

Meu nome é Prof^ª. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro, sou pesquisadora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e gostaria de convidá-lo a participar desta pesquisa. Estou desenvolvendo a pesquisa "**Avaliação da sensibilização cutânea de diferentes matérias-primas e formulações cosméticas fotoprotetoras por métodos *in vitro***", que faz parte de uma linha de pesquisa que será desenvolvida pelos pesquisadores do Laboratório de Tecnologia de Cosméticos da FCFRP-USP, com o objetivo de gerar modelos de pele humana reconstituída.

Nessa pesquisa, estamos propondo produzir modelos de pele em laboratório que têm as mesmas características da pele humana. Esse modelo de pele será utilizado para avaliar a toxicidade de produtos cosméticos e será comparado com modelos já utilizados nos Estados Unidos e Europa. Para obtermos uma pele mais parecida com a pele humana, serão utilizados os linfócitos T em nosso modelo de pele, que são obtidos do sangue de doadores voluntários.

Nós precisamos de voluntários que não tenham doenças prévias, como doenças crônicas (tais como diabetes, hipertensão), doenças sexualmente transmissíveis (tais como AIDS, hepatites, sífilis), ou doenças que afetam o sistema imunológico (tais como câncer, doenças autoimunes, lúpus, imunodeficiências). Caso você não tenha nenhuma dessas doenças e tenha entre 18 e 60 anos, gostaríamos de convidá-lo a participar dessa pesquisa.

Após ter concordado em participar do estudo e ter assinado este termo de consentimento, será feita a coleta de sangue periférico por punção de veia do braço, após assepsia do local, por profissional habilitado, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. A partir do sangue coletado serão isolados os linfócitos T.

A pessoa que participar desta pesquisa deverá doar 20 mL de sangue (equivalente a duas colheres de sopa). Esta quantidade de sangue retirada não será prejudicial à saúde. A coleta de sangue será realizada no braço, com seringas e agulhas descartáveis por um profissional capacitado, podendo levar a um leve desconforto passageiro. A pesquisa não acarreta nenhum prejuízo a você doador, sendo os riscos apenas aqueles ligados à coleta de sangue, tais como dor da picada e formação de hematomas.

A sua participação é voluntária. Para participar, é necessário ler atentamente este documento e ouvir nossas explicações em caso de dúvidas. Se estiver interessado em participar, solicitaremos que assine este termo em duas vias, uma para você e outra para o pesquisador.

As células serão utilizadas somente nesta pesquisa e se houver sobras, estas serão descartadas corretamente.

Caso não queira participar, não haverá prejuízo nenhum para o(a) Sr(a). E mesmo depois de aceitar, o(a) Sr(a) poderá desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, para isto deverá entrar em contato com o pesquisador ou o Comitê de Ética em Pesquisa nos telefones que aparecem neste documento.

Não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. O único benefício será o de auxiliar-nos a produzir modelos de pele para reduzir o uso de animais em pesquisa para a avaliação da segurança de produtos cosméticos.

Afirmamos que os dados obtidos serão guardados de maneira sigilosa e que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento.

Qualquer dúvida sobre esta pesquisa, entrar em contato com Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro pelos telefones (16) 3315-4315 ou (16) 99722-1035 (fora do horário comercial), ou no endereço Av. do Café s/n, Bairro Monte Alegre, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – SP, bloco S, sala 65A-A.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – CEP/FCFRP. Em caso de dúvidas quanto aos seus direitos como participante de pesquisa entre em contato com o Comitê: Av. do Café, s/n - Monte Alegre, FCFRP/USP, CEP 14040-903, Ribeirão Preto – SP. Fone/Fax (16) 3315-4213 e-mail: cep@fcrp.usp.br

Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro
PESQUISADORA PRINCIPAL

Eu,

_____, RG n° _____, autorizo a retirada de 20 mL do meu sangue através de punção venosa para a realização de pesquisa. Fui informado (a) sobre o procedimento e que o volume retirado não causará danos à minha saúde. Fui informado (a) também que a finalidade dessa pesquisa é de avaliar a **sensibilização cutânea de diferentes matérias-primas e formulações cosméticas fotoprotetoras por métodos *in vitro***.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de 20__.

Assinatura do doador