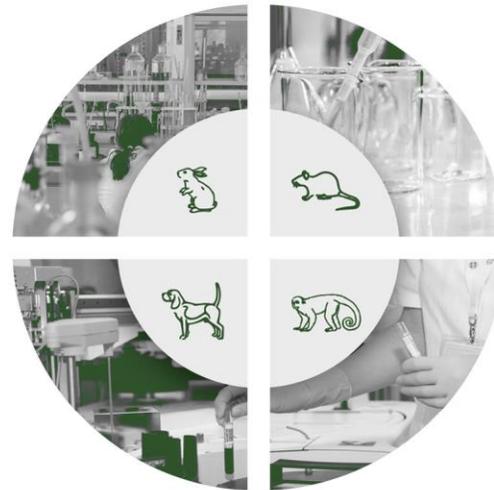


# Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



# I - Avaliação do potencial de sensibilização, de irritação e de corrosão da pele



## I - Avaliação do potencial de sensibilização, de irritação e de corrosão da pele:

1. Método OECD DT 430 - Corrosão cutânea *in vitro* teste de resistência elétrica transcutânea;
2. Método OECD DT 431 - Corrosão cutânea *in vitro*: teste da epiderme humana reconstituída;
3. Método OECD DT 435 - Teste de membrana de barreira *in vitro* para corrosão da pele;
4. Método OECD DT 439 - Irritação cutânea *in vitro*: método de reconstrução da epiderme humana;
5. Método OECD DT 429 - Sensibilização cutânea: ensaio do gânglio linfático local;
6. Método OECD DT 442A e 442B - Versões não radioativas do Ensaio do Linfonodo Local;
7. Método OECD DT 442C - Sensibilização cutânea química: ensaio direto de reatividade do peptídeo (DPRA)
8. Método OECD DT 442D - Ensaios de sensibilização cutânea *in vitro* que abordam o evento aop chave sobre a ativação do queratinócito



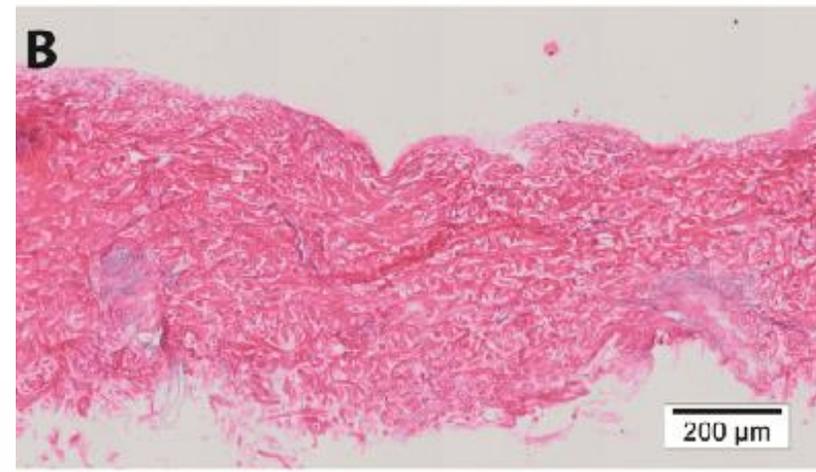
Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



# Diretriz da OECD Para o Ensaio de Substâncias Químicas - 430 Corrosão cutânea in vitro: método de teste de resistência elétrica transcutânea (ter)

## Definição de corrosão cutânea:

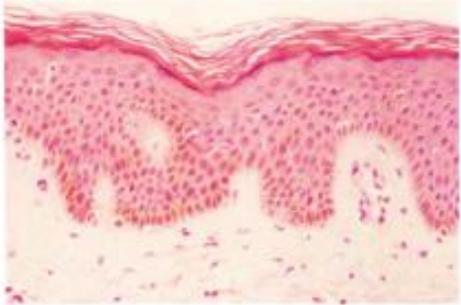
A corrosão cutânea refere-se à produção de danos irreversíveis na pele que se manifestam como necrose visível através da epiderme e na derme, após a aplicação de uma substância química de teste



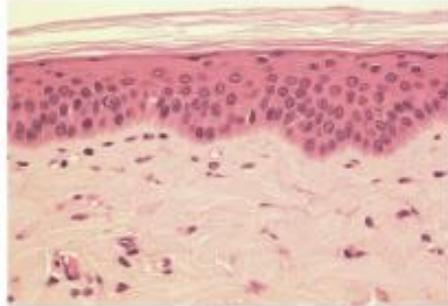
Ye, K., Traianedes, K., Choong, P. F. M., & Myers, D. E. (2016). Chondrogenesis of Human Infrapatellar Fat Pad Stem Cells on Acellular Dermal Matrix. *Frontiers in Surgery*, 3. doi:10.3389/fsurg.2016.00003

# Diretriz da OECD Para o Ensaio de Substâncias Químicas - 430 Corrosão cutânea in vitro: método de teste de resistência elétrica transcutânea (ter)

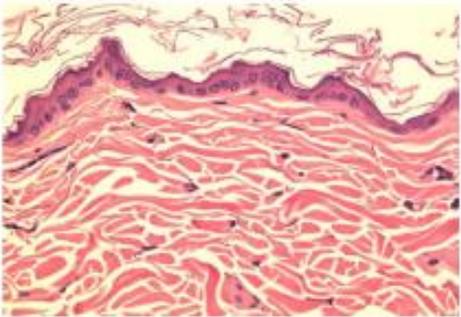
Human



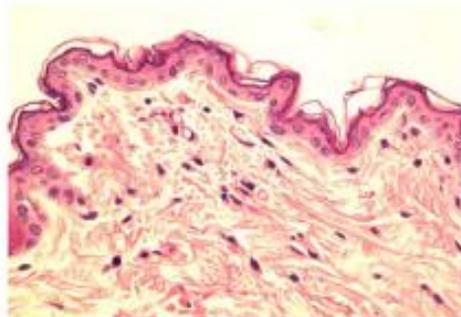
Pig



Rat



Rabbit



Esta diretriz aborda a corrosão terminal da pele na saúde humana. Baseia-se no método de teste de resistência elétrica transcutânea da pele do rato (TER), que utiliza discos de pele para identificar produtos corrosivos pela sua capacidade de produzir uma perda de integridade da camada córnea normal e função de barreira.

Heylings, J. EFSA Guidance on Dermal Absorption (2017) : "Industry View".  
In: <https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/event/170927-p09.pdf>

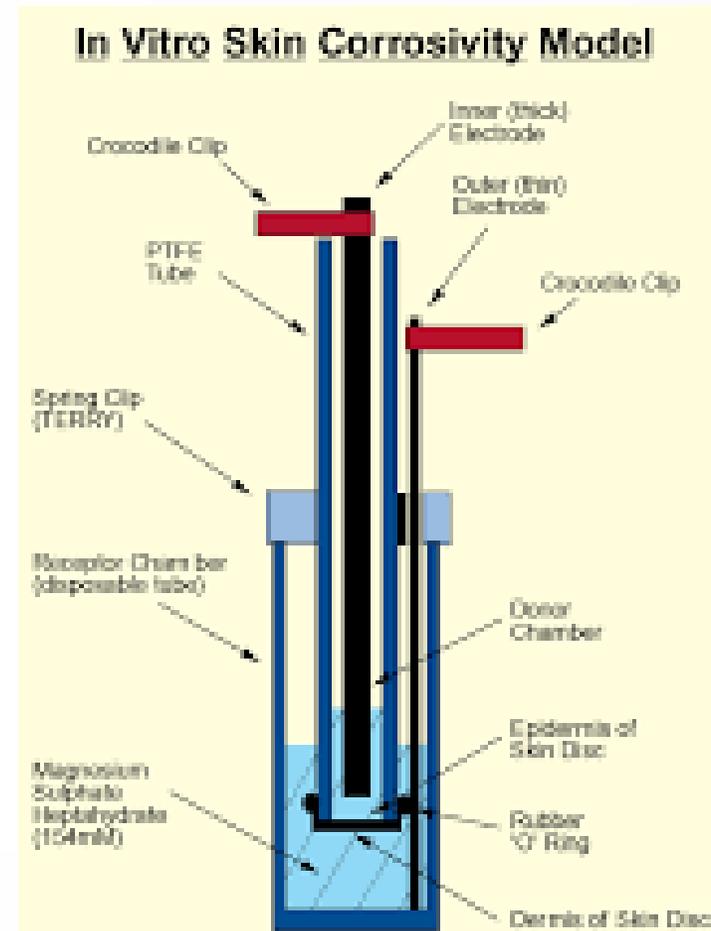


Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



## Diretriz da OECD Para o Ensaio de Substâncias Químicas - 430 Corrosão cutânea in vitro: método de teste de resistência elétrica transcutânea (ter)

O teste de resistência elétrica transcutânea da pele do rato (TER) pode ser usado para determinar o potencial de corrosão da pele de produtos químicos de teste, incluindo substâncias e misturas, sem o uso de animais vivos. Embora descrito como um procedimento in vitro, pode ser mais corretamente definido como um método ex vivo, uma vez que requer o uso de discos de pele retirados de um rato jovem morto de forma humana.



<https://www.piscltd.org.uk/wp-content/uploads/2014/11/2-Skin-Irritation-and-Corrosion-Final-Slides-for-website.pdf>

Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



## Diretriz da OECD Para o Ensaio de Substâncias Químicas - 430 Corrosão cutânea in vitro: método de teste de resistência elétrica transcutânea (ter)



Guest, R. The Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test: Eskes C., van Vliet E., Maibach H. (eds) Alternatives for Dermal Toxicity Testing. Springer, Cham

Os produtos químicos que são corrosivos para a pele são conhecidos por produzir uma perda de integridade e função de barreira do estrato córneo normal, e isso é medido como uma redução na pele TER em um sistema de teste simples de dois compartimentos em que os discos de pele servem como separação entre compartimentos.

## Diretriz da OECD Para o Ensaio de Substâncias Químicas - 430 Corrosão cutânea in vitro: método de teste de resistência elétrica transcutânea (ter)

Um estudo de validação e outros estudos publicados relataram que o método de teste TER da pele de rato é capaz de diferenciar corrosivos cutâneo conhecidos e não-corrosivos, com uma sensibilidade global de 94% (51/54) e especificidade de 71% (48/68) para uma base de dados de 122 substâncias.



Guest, R. The Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test: Eskes C., van Vliet E., Maibach H. (eds) Alternatives for Dermal Toxicity Testing. Springer, Cham



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



## Diretriz da OECD Para o Ensaio de Substâncias Químicas - 430 Corrosão cutânea in vitro: método de teste de resistência elétrica transcutânea (ter)



Guest, R. The Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test: Eskes C., van Vliet E., Maibach H. (eds) Alternatives for Dermal Toxicity Testing. Springer, Cham

Com base nos dados gerais disponíveis a Diretriz é aplicável a uma diversa gama de classes químicas e estados físicos, incluindo líquidos, semi-sólidos, sólidos e ceras (ou graxas). Todavia, uma vez que para alguns estados físicos específicos dados de referência adequados não estão disponíveis, deve-se ter em mente que um número pequeno de ceras e sólidos corrosivos foi avaliado durante a validação

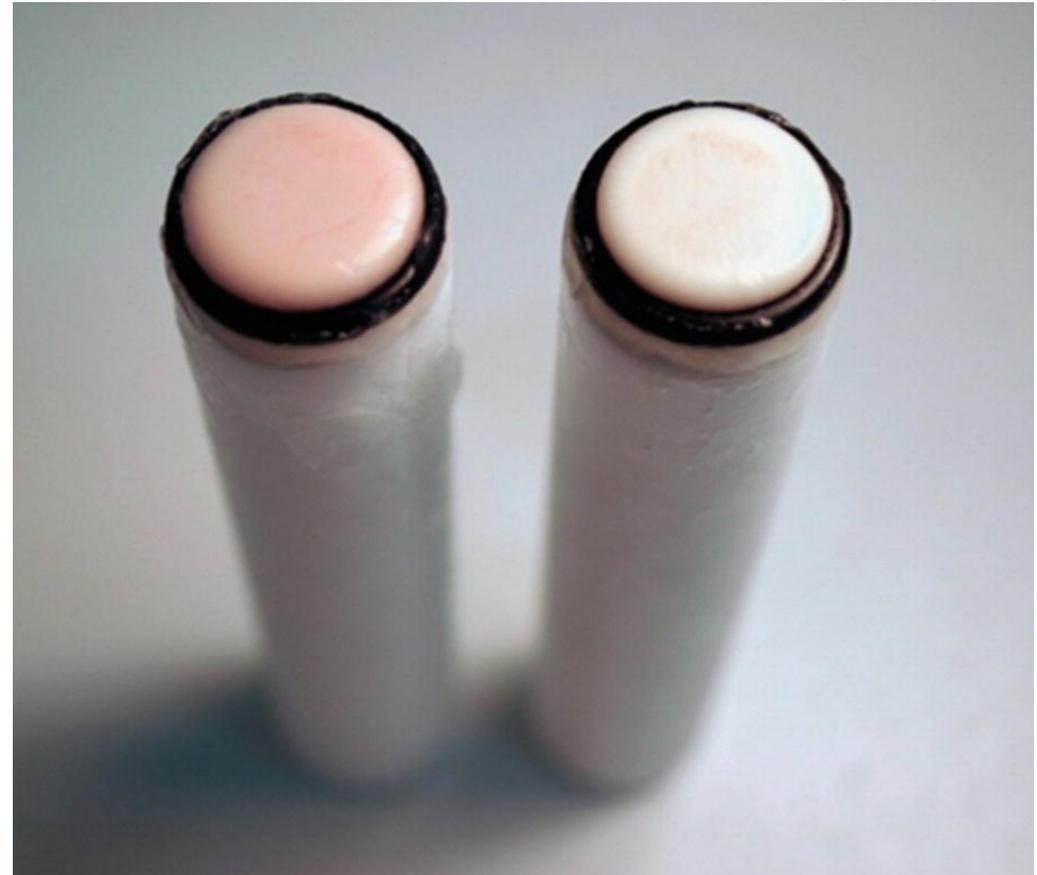


Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



## Diretriz da OECD Para o Ensaio de Substâncias Químicas - 430 Corrosão cutânea in vitro: método de teste de resistência elétrica transcutânea (ter)

Uma etapa importante é a utilização de corante permite a identificação de resultados falso-positivos que podem ocorrer devido ao aumento da permeabilidade da pele que não é devido à destruição do estrato córneo, tal como por alguns surfactantes e agentes tensioactivos orgânicos neutros.



Guest, R. The Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test: Eskes C., van Vliet E., Maibach H. (eds) Alternatives for Dermal Toxicity Testing. Springer, Cham



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil

# Diretriz da OECD Para o Ensaio de Substâncias Químicas - 430 Corrosão cutânea in vitro: método de teste de resistência elétrica transcutânea (ter)

## Princípio

A substância química em estudo é aplicada durante 24 horas nas superfícies epidérmicas dos discos de pele, num sistema de teste de dois compartimentos, no qual os discos de pele funcionam como a separação entre os compartimentos. Os discos de pele são retirados de ratos eutanasiados, com idades entre 28 e 30 dias. As substâncias químicas corrosivas são identificados por sua capacidade de produzir uma perda da integridade e função de barreira do estrato córneo normal, que é medida como uma redução no TER abaixo de um limiar.



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



# Diretriz da OECD Para o Ensaio de Substâncias Químicas - 430 Corrosão cutânea in vitro: método de teste de resistência elétrica transcutânea (ter)

## Aplicação

- ✓ O método TER utilizando pele de rato mostrou ser preditivo de corrosividade in vivo no coelho avaliado sob a Diretriz 404(2) da OECD.
- ✓ Para o TER da pele de rato, um valor de corte de 5k $\Omega$  foi selecionado com base em dados extensivos para uma ampla gama de substâncias.
- ✓ Pode ser aplicado em todos os tipos de substâncias: fármacos, cosméticos, agrotóxicos, produtos químicos etc...



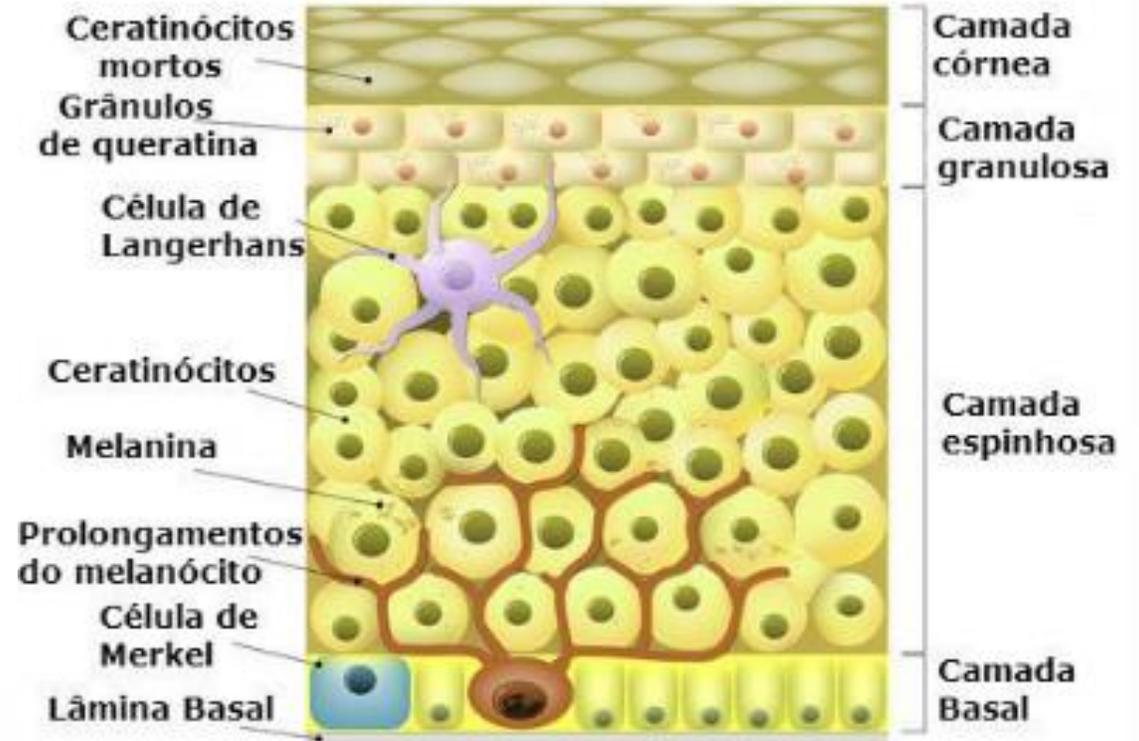
Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



# DIRETRIZ DA OECD PARA O ENSAIO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS - 431 Corrosão cutânea in vitro: método de teste de epiderme humana reconstruída (RHE, Recunstructed Human Epidermis)

A corrosão cutânea refere-se à produção de danos irreversíveis na pele.

Esta Diretriz de Teste aborda a corrosão cutânea do ponto final da saúde humana. Utiliza a epiderme humana reconstruída (RhE) (obtida a partir de queratinócitos epidérmicos não transformados derivados de humanos) que imita de perto as propriedades histológicas, morfológicas, bioquímicas e fisiológicas das partes superiores da pele humana, isto é, a epiderme.



<https://www.todamateria.com.br/epiderme/>



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



# DIRETRIZ DA OECD PARA O ENSAIO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS - 431 Corrosão cutânea in vitro: método de teste de epiderme humana reconstruída (RHE, Recunstructed Human Epidermis)

Estudos de pré-validação, seguidos de um estudo formal de validação para avaliar a corrosão da pele foram conduzidos com dois testes disponíveis, o EpiSkin™ Standard Model (SM) e o EpiDerm™ SkinCorrosivity Test (SCT) (EPI-200). O resultado desses estudos levou à recomendação de que os dois MRV mencionados acima poderiam ser usados para fins regulatórios na distinção entre substâncias corrosivas (C) e não corrosivas (NC) e que o EpiSkin™ poderia ser usado como suporte à subcategorização de substâncias corrosivas.



<http://www.episkin.com/Training>

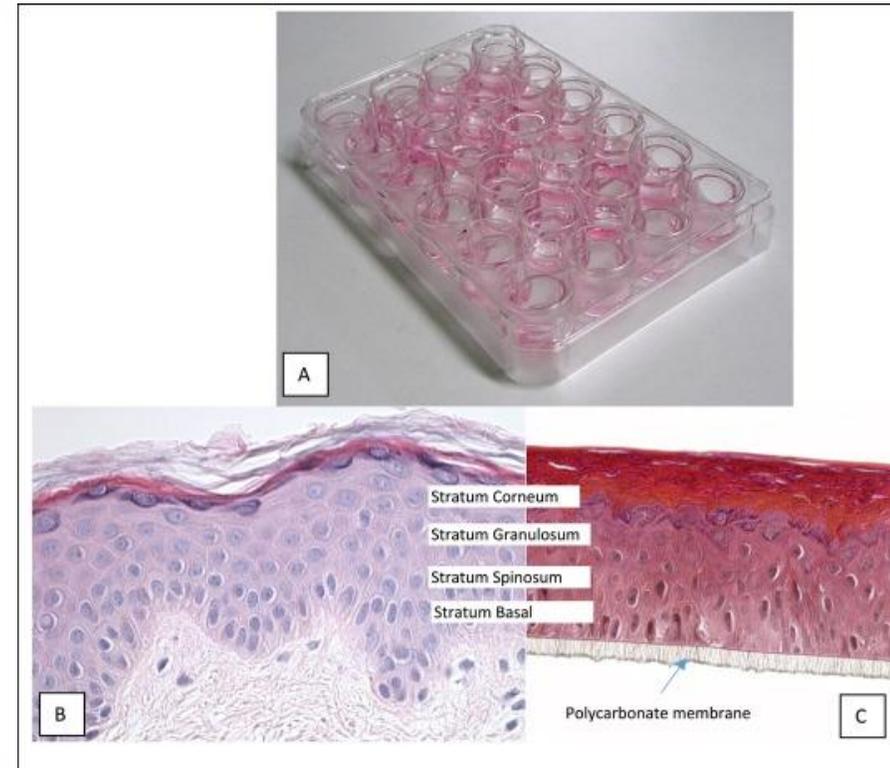


Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



# DIRETRIZ DA OECD PARA O ENSAIO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS - 431 Corrosão cutânea in vitro: método de teste de epiderme humana reconstruída (RHE, Recunstructed Human Epidermis)

Outros dois métodos de teste RHE comercialmente disponíveis para testar corrosão cutânea in vitro mostraram resultados similares ao MRV do EpiDerm™, de acordo com a validação baseada em procedimento padrão. São o SkinEthic™ RHE1 e o epiCSR (previamente conhecido como ES-1000), os quais também podem ser usados para finalidades regulatórias, na distinção entre substâncias corrosivas e não corrosivas



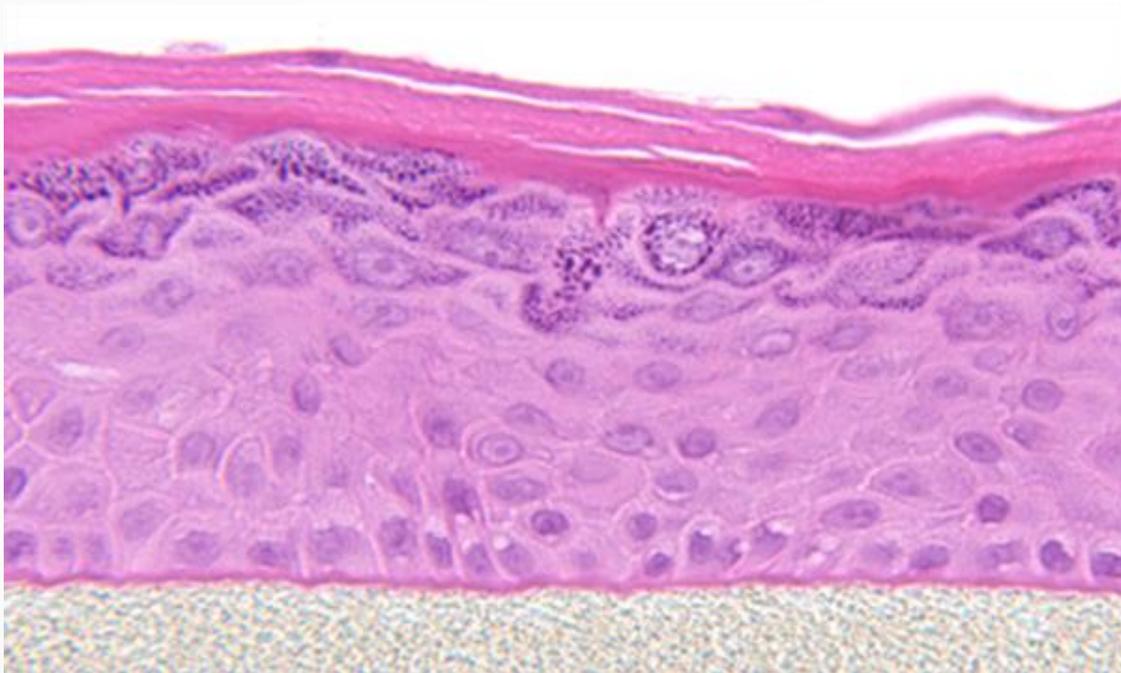
Christian Pellevoisin; Christelle Videau; Damien Briotet; Corinne Grégoire; Carine Tornier; Alain Alonso; Anne Sophie Rigaudeau; Charbel Bouez; Nathalie Seyler. SkinEthic™ RHE for in vitro evaluation of skin irritation of medical device extracts. Toxicology in Vitro, v.50, p.418-425, 2018



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil

# DIRETRIZ DA OECD PARA O ENSAIO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS - 431

## Corrosão cutânea in vitro: método de teste de epiderme humana reconstruída (RHE, Recunstructed Human Epidermis)



<https://www.mattek.com/products/epiderm/>

### PRINCÍPIO DO TESTE

A substância química em estudo é aplicada topicamente a um modelo tridimensional de RHE, constituído por **queratinócitos epidérmicos não transformados, derivados de humanos**, que foram cultivados para **formar um modelo altamente diferenciado da epiderme humana em multicamadas**. Consiste de camadas basais, espinhosas e granulares organizadas e de um estrato córneo multicamadas, contendo camadas lipídicas intercelulares lamelares, representando as principais classes de lipídios análogos às encontradas in vivo.



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



# DIRETRIZ DA OECD PARA O ENSAIO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS - 431

## Corrosão cutânea in vitro: método de teste de epiderme humana reconstruída (RHE, Recunstructed Human Epidermis)

### PRINCÍPIO DO TESTE

O método de teste de RHE baseia-se na premissa de que substâncias químicas corrosivas são capazes de penetrar no estrato córneo por difusão ou erosão e são citotóxicas para as células nas camadas subjacentes. A viabilidade celular é medida por conversão enzimática do corante vital MTT brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio; CAS número 298-93-1], num sal de azul de formazan que é quantitativamente medido após extração de tecidos



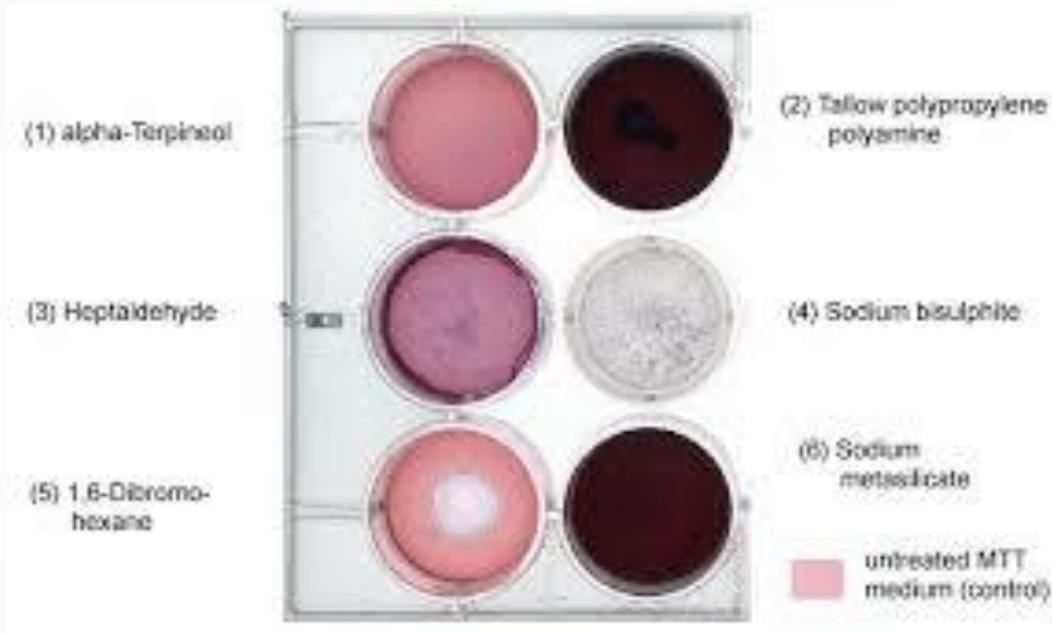
<http://revistapesquisa.fapesp.br/en/2017/01/02/laboratory-skin/>



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil

# DIRETRIZ DA OECD PARA O ENSAIO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS - 431

## Corrosão cutânea in vitro: método de teste de epiderme humana reconstruída (RHE, Recunstructed Human Epidermis)



<https://www.mattek.com/wp-content/uploads/Skin-Corrosion-Test-Protocol.pdf>

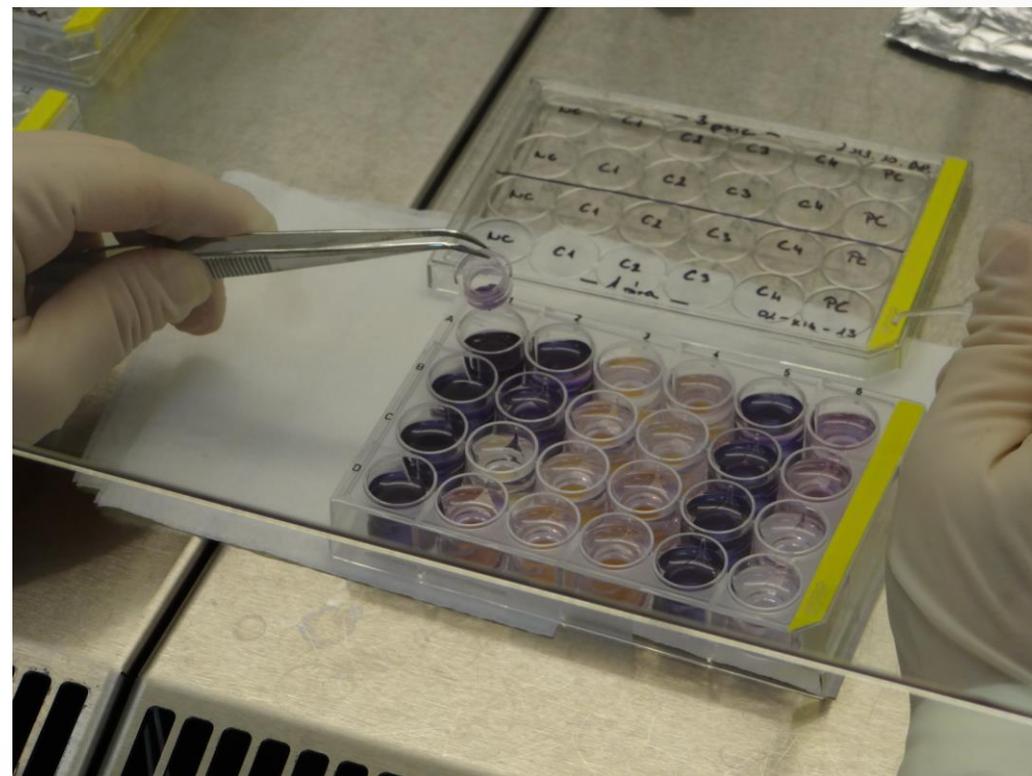
Uma possível interferência é que uma substância de teste pode reduzir diretamente o MTT, mimetizando assim a atividade da enzima desidrogenase da mitocôndria celular. Esta propriedade da substância de ensaio será apenas um problema, se no momento do teste de MTT (após o produto químico ter sido enxaguado) ainda existirem quantidades suficientes da substância de teste presente nos (ou nos) tecidos. Neste caso, a (verdadeira) redução metabólica do MTT e a (falsa) redução direta do MTT podem ser diferenciadas e quantificadas por ensaios diretos com a substância teste

# DIRETRIZ DA OECD PARA O ENSAIO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS - 431

## Corrosão cutânea in vitro: método de teste de epiderme humana reconstruída (RHE, Recunstructed Human Epidermis)

### Aplicação

- ✓ Pode ser aplicado em todos os tipos de substâncias: fármacos, cosméticos, agrotóxicos, produtos químicos etc...
- ✓ Pode ser usados produtos solúveis e insolúveis em água ( o excipiente deverá ser testado separadamente, produtos sólidos deverão ser moídos a condição de pó, poderá ser usados extraíveis de sólidos e semi-sólidos).



[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:RHE\\_MTT\\_test\\_4.JPG?uselang=pt-br#file](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:RHE_MTT_test_4.JPG?uselang=pt-br#file)



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil

## Guia da OECD para o Ensaio de Substâncias Químicas - 435

### Teste de membrana de barreira in vitro para corrosão da pele

Corrosão cutânea refere-se à produção de danos cutâneos irreversíveis, manifestando-se como necrose visível através da epiderme e na derme, que acontece após a aplicação de um teste químico.

Estudos de validação foram concluídos para o método de teste de barreira in vitro comercialmente disponível como Corrositex<sup>®</sup>, mostrando precisão geral para prever a corrosividade cutânea de 79% (128/163), sensibilidade de 85% (76/89) e especificidade de 70% (52/74) para um banco de dados de 163 substâncias e misturas.



<https://iivs.org/testing-services/assays/dermal/corrositex/>



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



## Guia da OECD para o Ensaio de Substâncias Químicas - 435

### Teste de membrana de barreira in vitro para corrosão da pele

Esse método de ensaio pode ser utilizado para tomar decisões sobre a corrosividade e a não-corrosividade de classes específicas de produtos químicos; por exemplo, ácidos orgânicos e inorgânicos, derivados ácidos e bases para determinados testes de transporte.



<https://iivs.org/testing-services/assays/dermal/corrositex/>



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



# Guia da OECD para o Ensaio de Substâncias Químicas - 435

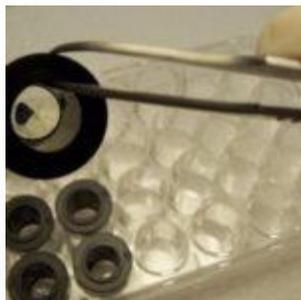
## Teste de membrana de barreira in vitro para corrosão da pele



Preparação do Indicador



Preparação da biobarreira



Disco de Biobarreira

### Princípio do Teste

O sistema de teste compreende dois componentes: uma biobarreira macromolecular sintética e um sistema de detecção química (CDS); este método de ensaio detecta, através da membrana de barreira CDS, os danos causados por substâncias químicas corrosivas após a aplicação da substância química em teste, na superfície da membrana de barreira sintética macromolecular, presumivelmente, pelo mesmo mecanismo de corrosão que opera na pele viva.

<https://iivs.org/testing-services/assays/dermal/corrositex/>

## Guia da OECD para o Ensaio de Substâncias Químicas - 435

### Teste de membrana de barreira in vitro para corrosão da pele

A penetração através da membrana de barreira (ou ruptura) pode ser medida por um número de procedimentos ou CDS, incluindo uma mudança na cor de um corante indicador de pH ou em alguma outra propriedade da solução indicadora abaixo da barreira



<https://iivs.org/testing-services/assays/dermal/corrositex/>



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



## Guia da OECD para o Ensaio de Substâncias Químicas - 435

### Teste de membrana de barreira in vitro para corrosão da pele



<https://iivs.org/testing-services/assays/dermal/corrositex/>

A membrana de barreira deve ser determinada como sendo válida, isto é, relevante e confiável, para seu uso pretendido. Isto inclui assegurar que diferentes preparações são consistentes em relação às propriedades de barreira, capazes de manter uma barreira contra substâncias químicas não-corrosivas, capazes de categorizar as propriedades corrosivas de substâncias químicas nas várias subcategorias de corrosividade do GHS da ONU. A classificação atribuída baseia-se no tempo que uma substância química leva para penetrar através da membrana de barreira até a solução indicadora.



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil

## Guia da OECD para o Ensaio de Substâncias Químicas - 435

### Teste de membrana de barreira in vitro para corrosão da pele

Uma limitação do método de teste de referência validado é que muitas substâncias químicas não corrosivas, e algumas substâncias químicas corrosivas, podem não se qualificar para testes, com base nos resultados do teste de compatibilidade inicial.

As substâncias químicas de teste que não causam alteração detectável no teste de compatibilidade (isto é, alteração de cor no Sistema de Detecção Química do método de teste de referência validado) não podem ser testadas com o método de membrana de barreira e devem ser testadas usando-se outros métodos de teste

Substâncias químicas aquosas, com pH na faixa de 4,5 a 8,5, muitas vezes não se qualificam para testes; no entanto, 85% das substâncias químicas testadas nessa faixa de pH não foram corrosivas em testes em animais(7).

Os métodos de teste de membrana de barreira in vitro podem ser utilizados para testar sólidos (solúveis ou insolúveis em água), líquidos (aquosos ou não aquosos) e emulsões



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



# Guia da OECD para o Ensaio de Substâncias Químicas - 439

## Irritação cutânea in vitro: método de reconstrução da epiderme humana

A irritação cutânea refere-se à produção de danos reversíveis na pele após a aplicação de uma substância química em teste, durante até 4 horas [conforme definido pelo Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS) das Nações Unidas](



<https://www.cyprotex.com/blog/in-vitro-skin-irritation-working-to-replace-the-draize-test/>



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil

# Guia da OECD para o Ensaio de Substâncias Químicas - 439

## Irritação cutânea in vitro: método de reconstrução da epiderme humana



<http://www.krishgen.com/dermal-irritation-assay-oecd-tg-439/>

### PRINCÍPIO DO TESTE

A substância química de teste é aplicada topicamente a um modelo tridimensional de RhE, constituído por queratinócitos epidérmicos não transformados, derivados de humanos, que foram cultivados para criar um modelo de multicamadas altamente diferenciado da epiderme humana. Consiste em camadas basais, espinhosas e granulares organizadas, e camadas lipídicas lamelares intercelulares, contendo camadas intercelulares que representam as principais classes lipídicas análogas às encontradas in vivo.



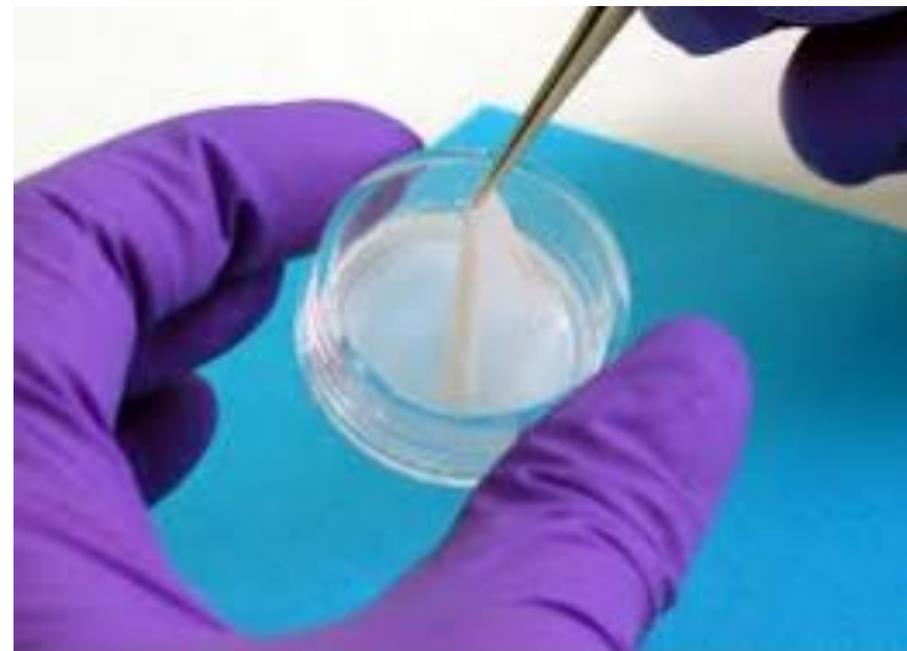
Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



# Guia da OECD para o Ensaio de Substâncias Químicas - 439

## Irritação cutânea *in vitro*: método de reconstrução da epiderme humana

As células danificadas podem liberar mediadores inflamatórios ou induzir uma cascata inflamatória, que também atua sobre as células da derme, particularmente as células estromais e endoteliais dos vasos sanguíneos. É a dilatação e o aumento da permeabilidade das células endoteliais que produzem o eritema e o edema observados. Os métodos de teste baseados em RhE, na ausência de qualquer vascularização no sistema de teste *in vitro*, medem os eventos de iniciação na cascata, por exemplo dano celular/ tecidual, utilizando leituras de viabilidade celular.



[http://biocip.cz/index.php?id\\_product=534&controller=product&id\\_lang=1](http://biocip.cz/index.php?id_product=534&controller=product&id_lang=1)



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil

# Guia da OECD para o Ensaio de Substâncias Químicas - 439

## Irritação cutânea in vitro: método de reconstrução da epiderme humana

A viabilidade celular em modelos de RhE é medida por conversão enzimática do corante vital MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, azul de tiazolilo; CAS número 298-93-1], num sal de azul de formazan, que é quantitativamente medido após a remoção de tecidos por espectrofotometria em HPLC/UPLC. As substâncias químicas irritantes são identificadas por sua capacidade de diminuir a viabilidade celular abaixo dos limites definidos (isto é,  $\leq 50\%$ , para a categoria 2 do GHS da ONU). Dependendo do esquema regulamentar e da aplicabilidade da diretriz, as substâncias químicas de teste, que produzem viabilidade celular acima do limiar definido, podem ser considerados não irritantes (ou seja,  $> 50\%$ , Sem categoria UN GHS).

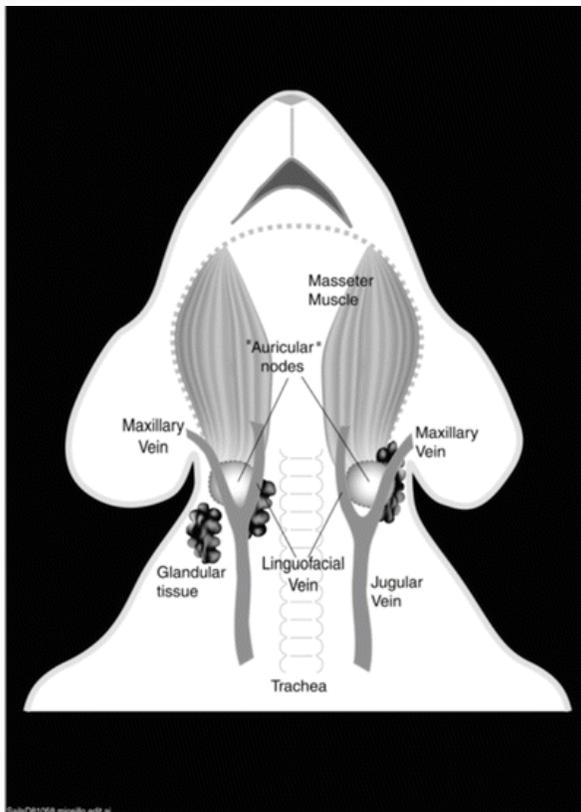


Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



# Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas - 429

## Sensibilização cutânea: ensaio do gânglio linfático local



O Ensaio do Gânglio Linfático Local LLNA é um método *in vivo* e, conseqüentemente, não elimina o uso de animais na avaliação da atividade de sensibilização alérgica por contato. Tem, no entanto, o potencial para reduzir o número de animais necessários para este fim. Além disso, o LLNA oferece um refinamento substancial (menos dor e angústia) da maneira como os animais são usados para testes de sensibilização alérgica por contato. O LLNA baseia-se na consideração de eventos imunológicos estimulados por substâncias químicas durante a fase de indução da sensibilização .

•van Huygevoort, T (2017). The Murine Local Lymph Node Assay. In: Parker G. (eds) Immunopathology in Toxicology and Drug Development. Molecular and Integrative Toxicology. Humana Press, Cham. p. 619-637.



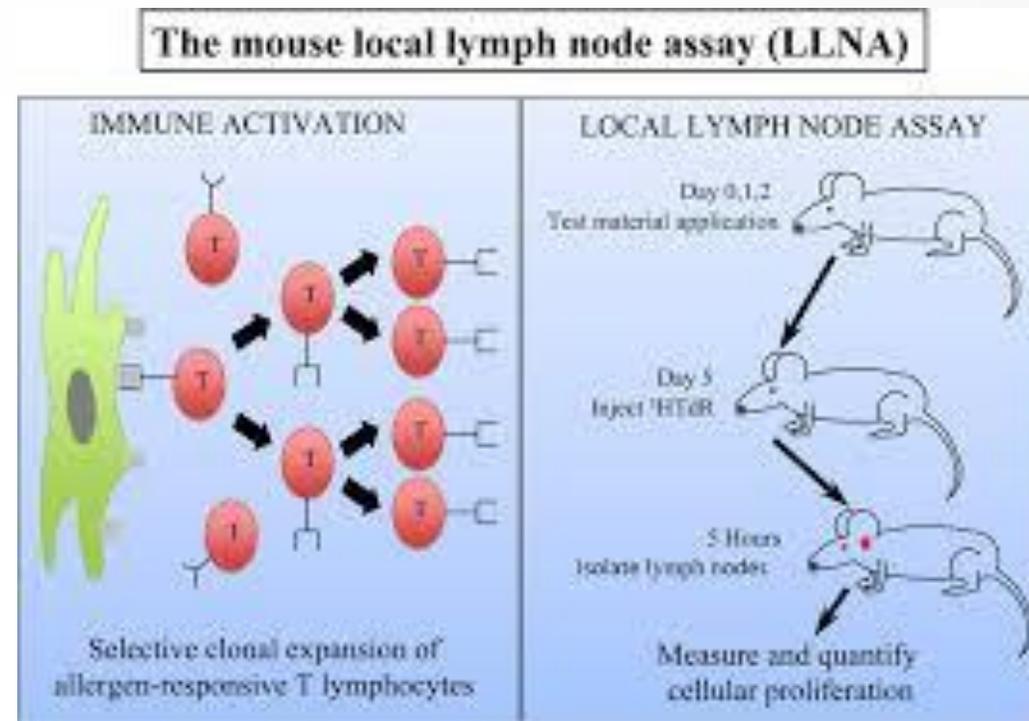
Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



# Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas - 429

## Sensibilização cutânea: ensaio do gânglio linfático local

Ao contrário dos testes com cobaias (TG 406, o LLNA não requer que sejam eliciadas reações de hipersensibilidade dérmica induzida por desafio. Inclusive, o LLNA não requer o uso de um adjuvante, como é o caso do teste de maximização de cobaias. Assim, o LLNA reduz a dor e a angústia dos animais. Apesar das vantagens do LLNA sobre o TG 406, deve-se reconhecer que existem algumas limitações que podem exigir o uso do TG 406.



Ian Kimber, David A. Basketter, G. Frank Gerberick, Cindy A. Ryan, and Rebecca J. Dearman. Chemical Allergy: Translating Biology into Hazard Characterization. TOXICOLOGICAL SCIENCES 120(S1), S238–S268 (2011)

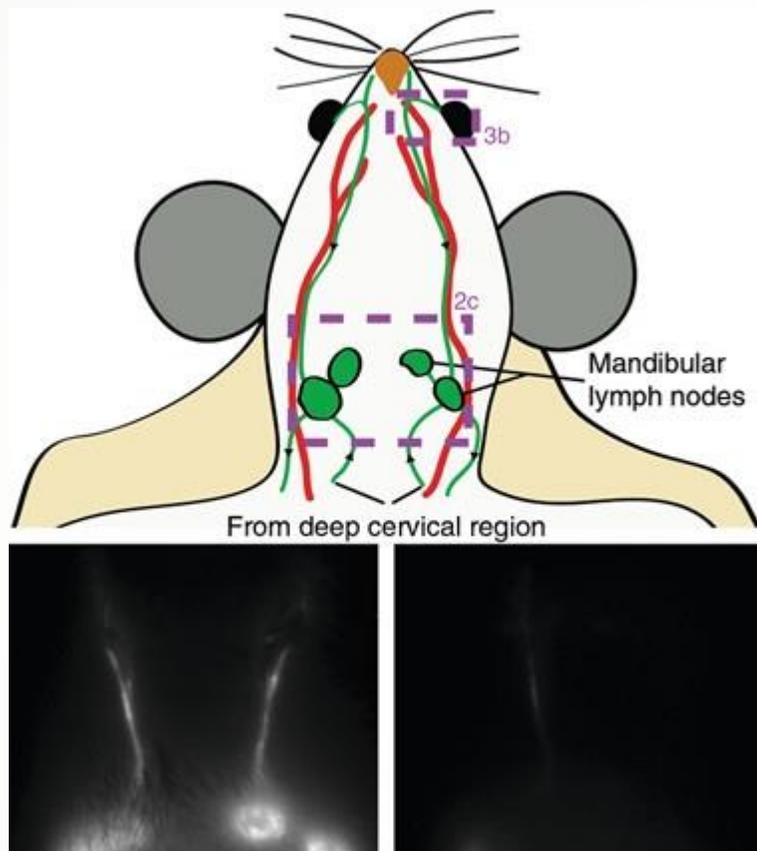


Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



# Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas - 429

## Sensibilização cutânea: ensaio do gânglio linfático local



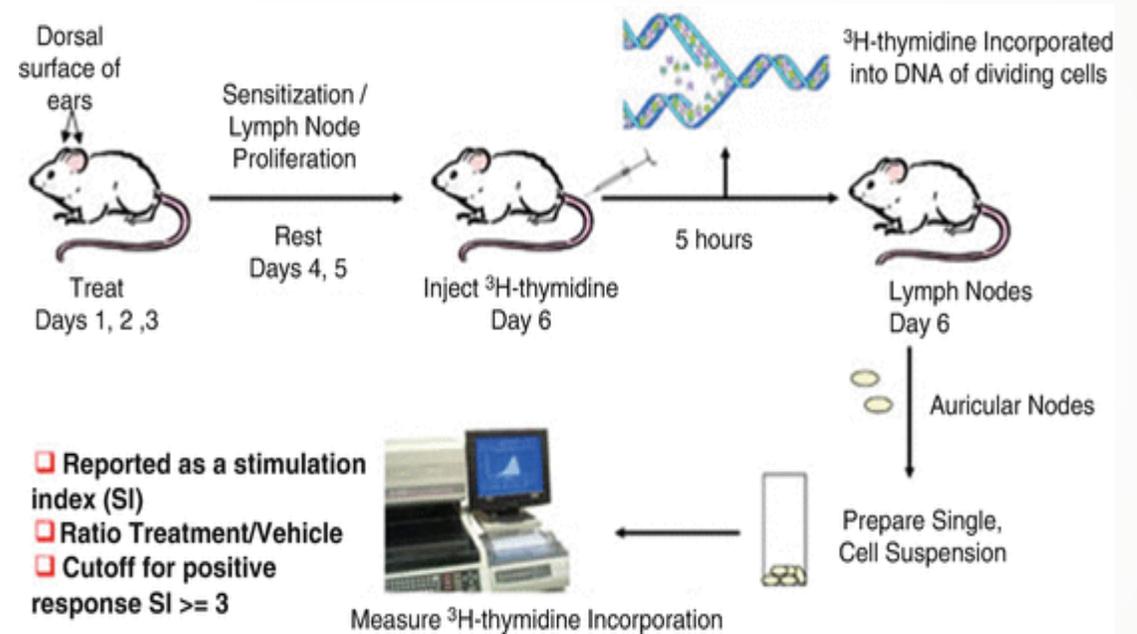
O princípio básico subjacente ao LLNA é que os sensibilizadores induzem a proliferação de linfócitos nos gânglios linfáticos que drenam o local de aplicação da substância em estudo. Esta proliferação é proporcional à dose e à potência do alérgeno aplicado e proporciona um meio simples de obter uma medição quantitativa da sensibilização

<https://www.picturesso.com/pics/rat-lymphatic-system-52.html>

# Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas - 429

## Sensibilização cutânea: ensaio do gânglio linfático local

Os métodos descritos aqui são baseados no uso de marcação radioativa in vivo para medir um número aumentado de células proliferativas nos gânglios linfáticos auriculares de drenagem. No entanto, podem ser utilizados outros parâmetros para a avaliação do número células em proliferação, desde que os requisitos dos Padrões de Performance sejam cumpridos na íntegra.



•van Huygevoort, T (2017). The Murine Local Lymph Node Assay. In: Parker G. (eds) Immunopathology in Toxicology and Drug Development. Molecular and Integrative Toxicology. Humana Press, Cham. p. 619-637.



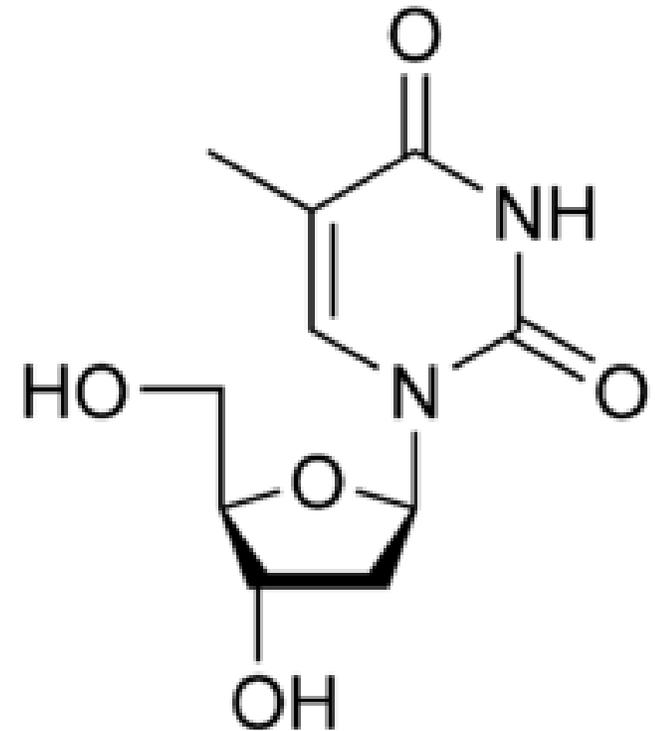
Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



# Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas - 429

## Sensibilização cutânea: ensaio do gânglio linfático local

A incorporação de 3H-metil-timidina é medida por contagem de cintilação- $\beta$  como desintegrações por minuto (DPM). A incorporação de 125I-iododesoxiuridina é medida por contagem de 125I e também é expressa como DPM. Dependendo da abordagem utilizada, a incorporação é expressa como DPM/camundongo (abordagem animal individual) ou DPM/grupo de tratamento (abordagem do grupo de tratamento em conjunto).



<https://pt.wikipedia.org/wiki/Timidina>



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil

# Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas - 429

## Sensibilização cutânea: ensaio do gânglio linfático local



<https://www.yu.edu/stern/ug/chemistry-biochemistry>

### Aplicação

- ✓ Pode ser aplicado em todos os tipos de substâncias: fármacos, cosméticos, agrotóxicos, produtos químicos etc...
- ✓ Pode ser usados produtos solúveis e insolúveis em água ( o excipiente deverá ser testado separadamente, produtos sólidos deverão ser moídos a condição de pó, poderá ser usados extraíveis de sólidos e semi-sólidos).



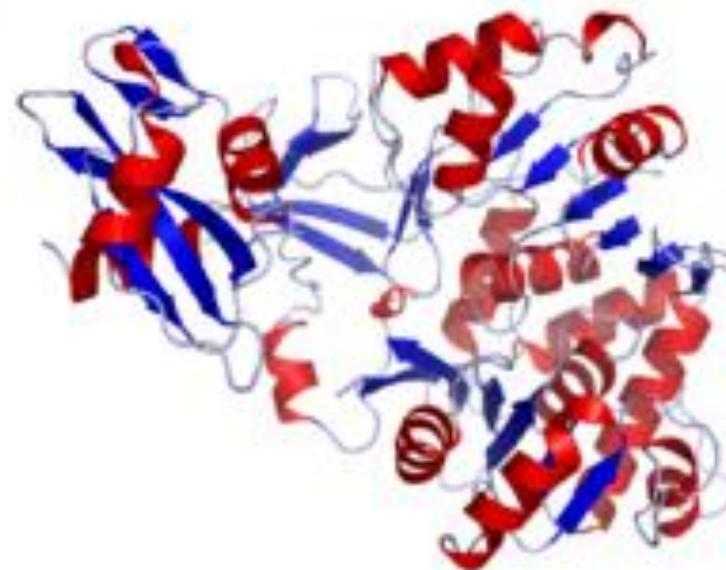
Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



# Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas - 442A

## Sensibilização cutânea: ensaio dos gânglios linfáticos locais: DA

No LLNA (OECD 429), a timidina ou o iodo radioisotópico é usado para medir a proliferação de linfócitos e, portanto, o ensaio tem uso limitado em regiões onde a aquisição, o uso ou o descarte de radioatividade é problemático. O LLNA: DA (desenvolvido por Daicel Chemical Industries, Ltd.) é uma modificação não radioativa para o LLNA, que quantifica o conteúdo de trifosfato de adenosina (ATP), via bioluminescência, como um indicador da proliferação de linfócitos.



<https://gl.wikipedia.org/wiki/Luciferase>



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil

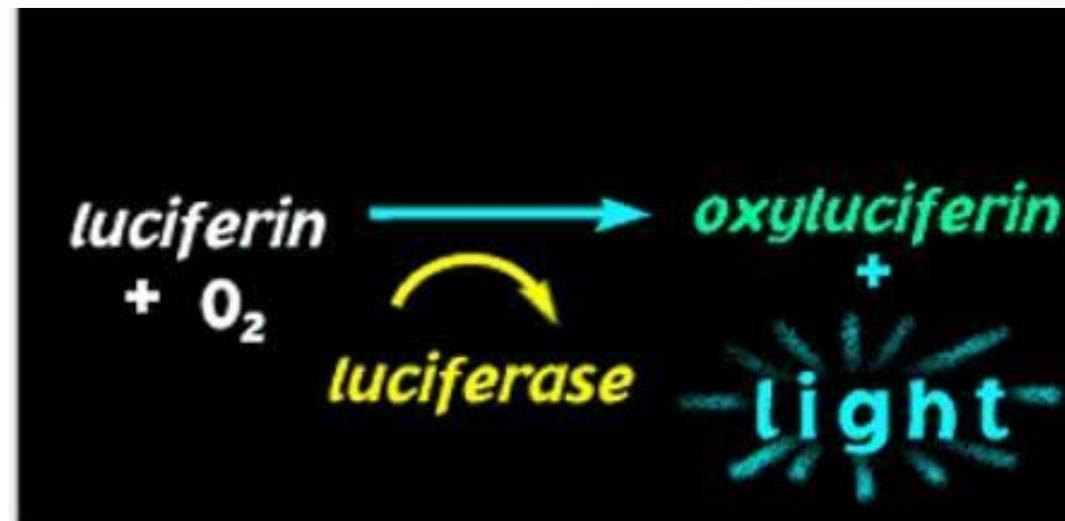


## Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas - 442A

### Sensibilização cutânea: ensaio dos gânglios linfáticos locais: DA

O LLNA: DA é um método *in vivo* do LLNA (OECD 429) modificado para identificar substâncias de teste potenciais expressivamente sensibilizantes da pele, com limitações específicas.

Isto não implica necessariamente que em todos os casos o LLNA: DA deva ser usado no lugar de testes LLNA ou cobaias (DIRETRIZ 406), mas que o ensaio é de igual mérito e pode ser empregado como uma alternativa na qual os resultados positivos e negativos já não requeiram mais confirmação.



<https://docplayer.com.br/52469225-O-que-e-quais-mecanismos-por-que-emitir-luz-quem-emite-luz-bioluminescencia.html>



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil

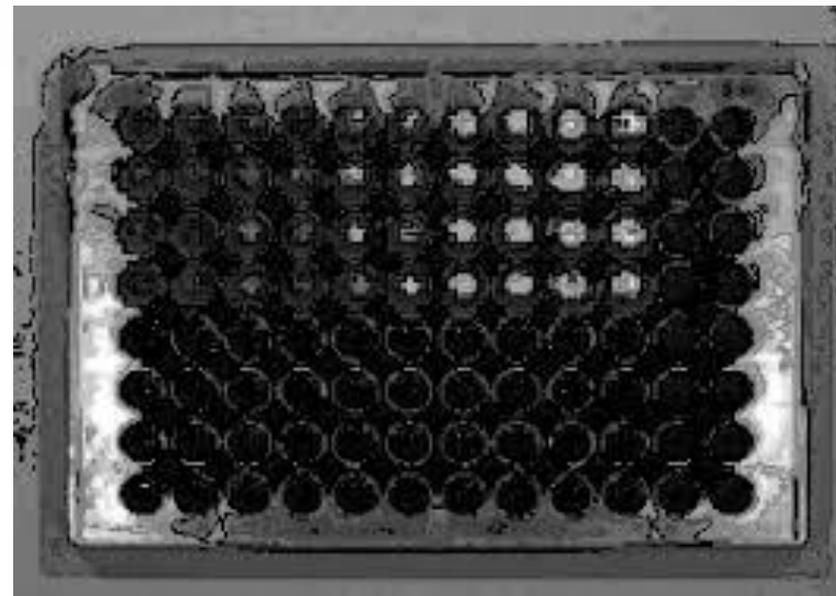


## Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas - 442A

### Sensibilização cutânea: ensaio dos gânglios linfáticos locais: DA

Os métodos descritos aqui se baseiam no uso da medição do conteúdo de ATP pela bioluminescência (conhecida por correlacionar com o número de células vivas) para indicar o aumento no número de células proliferativas nos gânglios linfáticos auriculares.

O método bioluminescente utiliza a enzima luciferase para catalisar a formação de luz a partir de ATP e luciferina, de acordo com a seguinte reação: A intensidade da luz emitida está linearmente relacionada com a concentração de ATP e é medida usando-se um luminômetro. O ensaio de luciferina-luciferase é um método sensível para quantificação de ATP usado em uma ampla variedade de aplicações(20).



<https://rbc.inca.gov.br/>

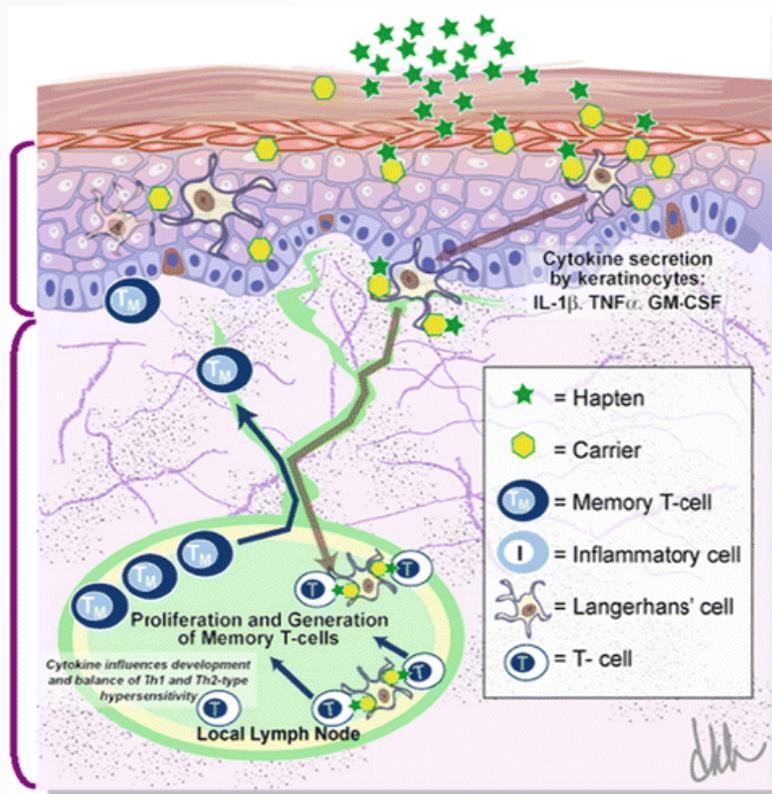


Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



# Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas - 442A

## Sensibilização cutânea: ensaio dos gânglios linfáticos locais: DA



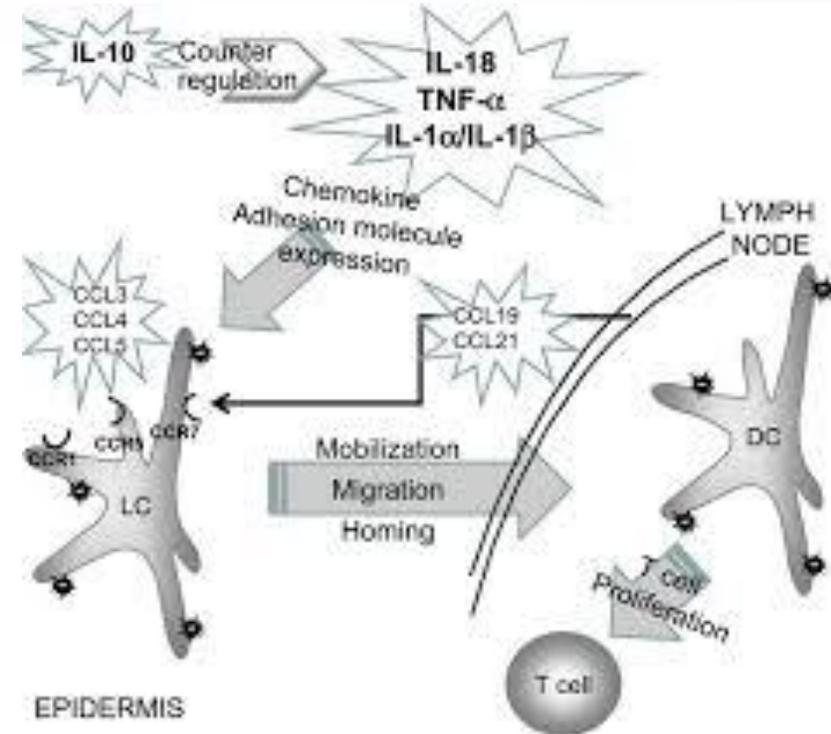
Ian Kimber, David A. Basketter, G. Frank Gerberick, Cindy A. Ryan, and Rebecca J. Dearman. Chemical Allergy: Translating Biology into Hazard Characterization. TOXICOLOGICAL SCIENCES 120(S1), S238–S268 (2011)

Os aumentos no teor de ATP nos gânglios linfáticos são medidos pelo método da luciferina/luciferase, usando-se um kit de medição de ATP, que mensura a bioluminescência em Unidades de Luminescência Relativa (RLU). O tempo do ensaio, desde o tempo de eutanásia do animal até a medição do conteúdo de ATP, para cada animal individual, deve ser mantido uniforme, dentro de aproximadamente 30 minutos, porque o conteúdo de ATP diminui gradualmente com o tempo após a eutanásia

# Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas – 442B

## Ensaio de gânglio linfático local: BRDU-ELISA ou BRDU-FCM

Existe consenso sobre os eventos biológicos-chave subjacentes à sensibilização cutânea. O conhecimento atual dos mecanismos químicos e biológicos associados à sensibilização cutânea foi resumido na forma de uma Via de Desfecho Adverso (AOP, Adverse Outcome Pathway, em inglês)(2), começando com o evento de iniciação molecular até os eventos intermediários ao efeito adverso, ou seja, dermatite alérgica de contato.



Ian Kimber, David A. Basketter, G. Frank Gerberick, Cindy A. Ryan, and Rebecca J. Dearman. Chemical Allergy: Translating Biology into Hazard Characterization. TOXICOLOGICAL SCIENCES 120(S1), S238–S268 (2011)



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



## Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas – 442B

### Ensaio de gânglio linfático local: BRDU-ELISA ou BRDU-FCM

**O primeiro evento** chave pode ser abordado usando-se o Ensaio de Reatividade Direta do Peptídeo (DPRA) in chemico, DIRETRIZ 442C(3). **O segundo evento** chave nesta AOP ocorre nos queratinócitos e inclui respostas inflamatórias, bem como alterações na expressão gênica, associadas a vias específicas de sinalização celular, como as vias dependentes de antioxidante/elemento de resposta eletrofílica (ARE). Este evento chave pode ser abordado usando-se os métodos de teste de luciferase ARE-Nrf2 in vitro (KeratinoSens™ ou LuSens), DIRETRIZ 442D(4). **O terceiro evento** chave é a ativação de células dendríticas (DC), tipicamente avaliadas pela expressão de marcadores específicos de superfície celular, quimiocinas e citocinas, e pode ser abordado usando-se o Teste de Ativação de Linha Celular Humana in vitro (h-CLAT), o Teste de Ativação da Linha Celular U937 (U-SENS™) in vitro ou o ensaio de Gene relator de Interleucina-9 (Ensaio IL-8 Luc), como descrito na DIRETRIZ 442E(5). **O quarto evento** chave é a proliferação de células T, que é avaliada indiretamente nos ensaios de Gânglio Linfático Local in vivo em camundongos (LLNA)(6).



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



## **Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas – 442B**

### **Ensaio de gânglio linfático local: BRDU-ELISA ou BRDU-FCM**

Esta Diretriz de Teste descreve duas modificações não radioativas para o método de teste LLNA que utilizam 5-bromo-2-desoxiuridina não radiomarcados (BrdU) (número CAS [“Chemical Abstracts Service”] 59-14-3) em ELISA [Ensaio de Imunoabsorção Enzimática] – ou sistema de teste baseado no FCM [Método de Citometria de Fluxo] para medir a proliferação de linfócitos:

- O ensaio de gânglio linfático local: BrdU-ELISA;
- O ensaio de gânglio linfático local: BrdU-FCM;

Semelhantemente ao LLNA, o LLNA: BrdU-ELISA e o LLNA: BrdU-FCM estudam a fase de indução da sensibilização cutânea e fornecem dados quantitativos adequados para a avaliação dose-resposta.

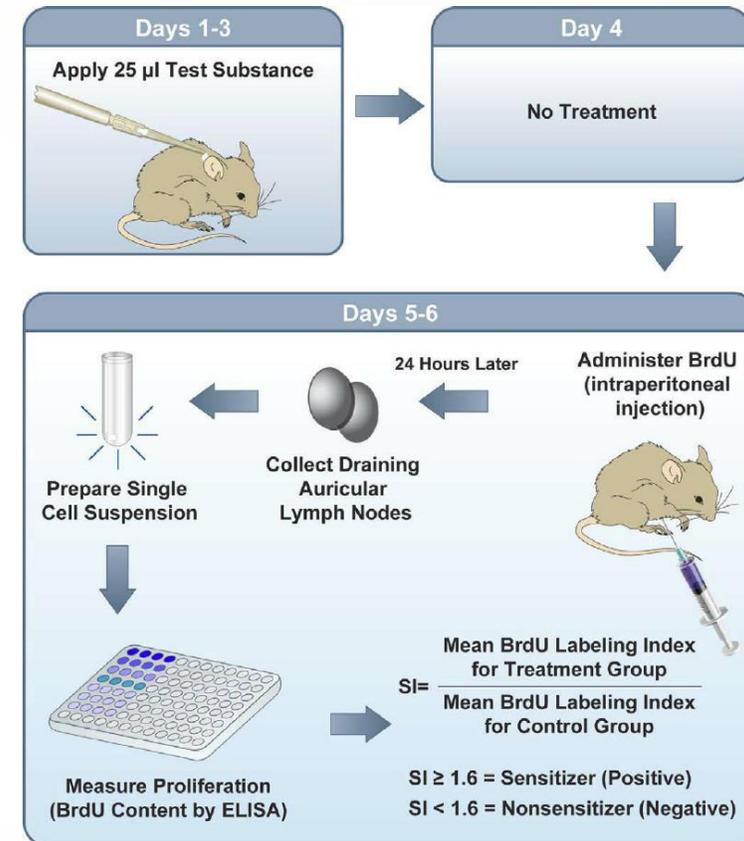


**Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil**

# Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas – 442B

## Ensaio de gânglio linfático local: BRDU-ELISA

O método BRDU-ELISA é baseado no uso da medição do conteúdo de BrdU em um aumento no número de células em proliferação nos gânglios linfáticos auriculares drenantes. BrdU é um análogo da timidina e é similarmente incorporado ao DNA das células em proliferação. A incorporação de BrdU é medida pelo ELISA, que utiliza um anticorpo específico para BrdU, que também é marcado com peroxidase



[https://www.researchgate.net/publication/264851867\\_Evaluation\\_of\\_Two\\_Nonradiolabeled\\_Murine\\_Local\\_Lymph\\_Node\\_Assays\\_LLNA\\_for\\_Potency\\_Categorization\\_of\\_Substances\\_Causing\\_Allergic\\_Contact\\_Dermatitis\\_in\\_Humans](https://www.researchgate.net/publication/264851867_Evaluation_of_Two_Nonradiolabeled_Murine_Local_Lymph_Node_Assays_LLNA_for_Potency_Categorization_of_Substances_Causing_Allergic_Contact_Dermatitis_in_Humans)



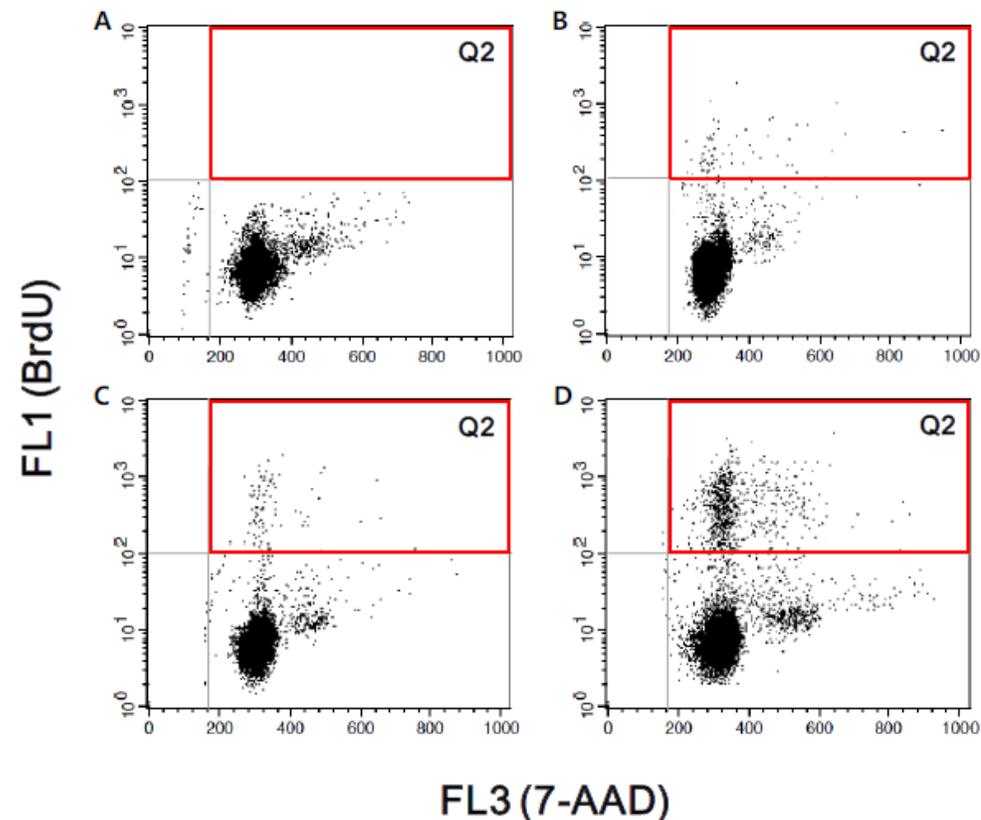
Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



# Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas – 442B

## Ensaio de gânglio linfático local: BRDU-FCM

O método BRDU-FCM é baseado no uso da medição do conteúdo de BrdU para indicar o aumento no número de células em proliferação nos gânglios linfáticos auriculares drenantes. BrdU é um análogo da timidina e é similarmente incorporado ao DNA das células em proliferação. A incorporação de BrdU é medida por FCM, que utiliza um anticorpo específico para BrdU que também é marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC). O FCM (citometria de fluxo) quantifica o número de células viáveis positivas para BrdU usando um citômetro de fluxo, que é amplamente empregado na análise da população de linfócitos.

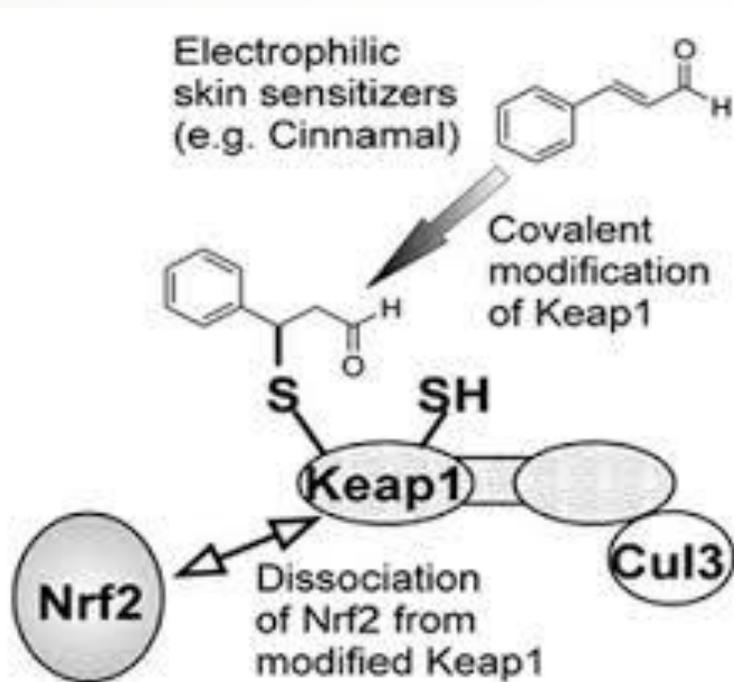


Korean Center for the Validation of Alternative Methods. Local Lymph Node Assay: 5-bromo-2-deoxyuridine-flow cytometry method (LLNA: BrdU-FCM) Validation Study Report, January 2017. In: [https://www.oecd.org/env/ehs/testing/latestdocuments/Validation\\_Study\\_Report\\_LLNA\\_BrdU\\_FCM\\_updated\\_2017\\_clean.pdf](https://www.oecd.org/env/ehs/testing/latestdocuments/Validation_Study_Report_LLNA_BrdU_FCM_updated_2017_clean.pdf)

Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil

# Guia da OECD para o ensaio de substâncias químicas - 442C

## Sensibilização cutânea química: ensaio direto de reatividade do peptídeo (DPRA)



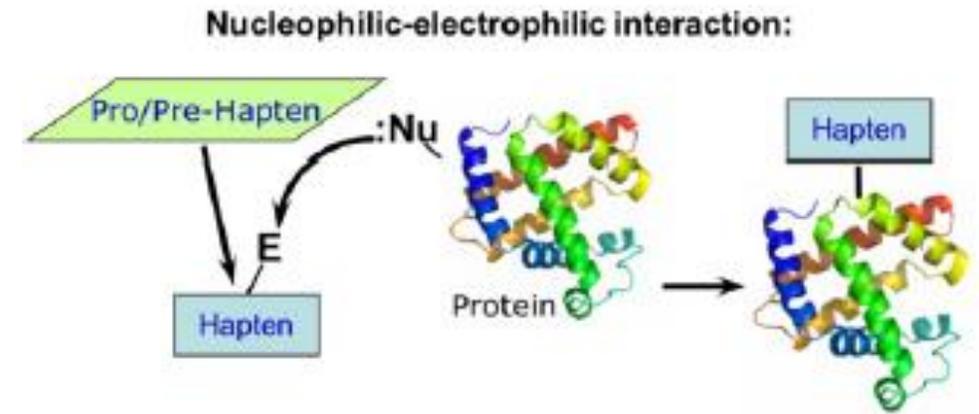
<https://www.piscltd.org.uk/wp-content/uploads/2015/01/Skin-Sensitization-webinar-final-ppt.pdf>

Recentemente, métodos de teste, baseados unicamente em explicações físicas ou biológicas\*, como teste *in chemico* e *in vitro*, foram considerados cientificamente válidos para a avaliação do risco de sensibilização cutânea a substâncias químicas. No entanto, combinações de métodos não animais (*in silico*, *in vitro*) contidas nas Abordagens Integradas para Testes e Avaliação (AITA) serão necessárias para se poder substituir totalmente os testes em animais atualmente em uso, dada a cobertura mecanicista restrita de VRA – dos métodos de teste não animais disponíveis nos dias de hoje

# Guia da OECD para o ensaio de substâncias químicas - 442C

## Sensibilização cutânea química: ensaio direto de reatividade do peptídeo (DPRA)

O DPRA é um método químico que quantifica a concentração restante de peptídeos contendo cisteína ou lisina, após 24 horas de incubação com a substância química em teste, a  $25 \pm 2,5^\circ\text{C}$ . Os peptídeos sintéticos contêm fenilalanina para auxiliar na detecção. A concentração relativa de peptídeos é medida por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, em inglês) com eluição por gradiente e detecção por UV a 220nm



<https://www.piscltd.org.uk/wp-content/uploads/2015/01/Skin-Sensitization-webinar-final-ppt.pdf>

# Guia da OECD para o ensaio de substâncias químicas - 442C

## Sensibilização cutânea química: ensaio direto de reatividade do peptídeo (DPRA)



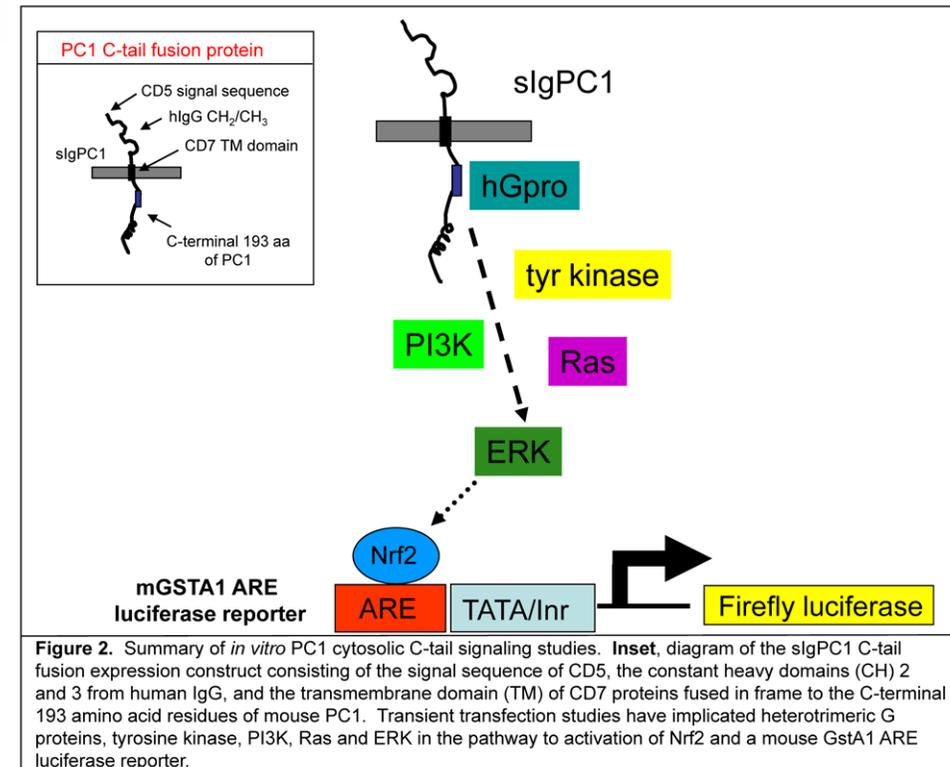
<http://archive.constantcontact.com/fs120/1102918552623/archive/1116000172838.html>

Soluções de estoque de cisteína (Ac-RFAACAA-COOH) e lisina (Ac-RFAAKAA-COOH), contendo peptídeos sintéticos de pureza superiores a 85% e, preferencialmente na faixa de 90-95%, devem ser preparadas imediatamente antes de sua incubação com a substância química em teste. A concentração final do peptídeo de cisteína deve ser 0,667mM em fosfato pH 7,5 tamponado, enquanto que a concentração final do peptídeo lisina deve ser de 0,667mM em acetato de amônio a pH 10,2 tamponado

# Guia da OECD para o ensaio de substâncias químicas - 442D

## Ensaio de sensibilização cutânea *in vitro* que abordam o evento AOP chave sobre a ativação do queratinócito

Pequenas substâncias eletrofílicas, tais como sensibilizadores cutâneos, podem atuar no sensor da proteína Keap1 (proteína 1 associada a ECH do tipo Kelch); por exemplo, a modificação covalente do resíduo de cisteína, resultando na sua dissociação do fator de transcrição Nrf2 (fator 2 relacionado com fator nuclear eritróide 2). O Nrf2 dissociado pode ativar genes dependentes de ARE, tais como aqueles que codificam enzimas desintoxicantes de fase II.



<http://www.kumc.edu/school-of-health-professions/research/research-projects.html>



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



# Guia da OECD para o ensaio de substâncias químicas - 442D

## Ensaio de sensibilização cutânea in vitro que abordam o evento AOP chave sobre a ativação do queratinócito

O método de teste KeratinoSens™ faz uso de uma linha celular imortalizada aderente, derivada de queratinócitos humanos, portadores estáveis de um gene repórter de luciferase sob o controle do elemento de resposta antioxidante do gene AKR1C2 humano. Sabe-se que esse gene é regulado positivamente pelos sensibilizadores cutâneos. A linhagem celular contém o gene da luciferase sob o controle transcricional de um promotor constitutivo fundido com o elemento ARE.

O sinal da luciferase reflete a ativação por sensibilizadores de genes dependentes de Nrf2 endógenos, sendo que a dependência do sinal da luciferase na linhagem celular recombinante em Nrf2 foi demonstrada.



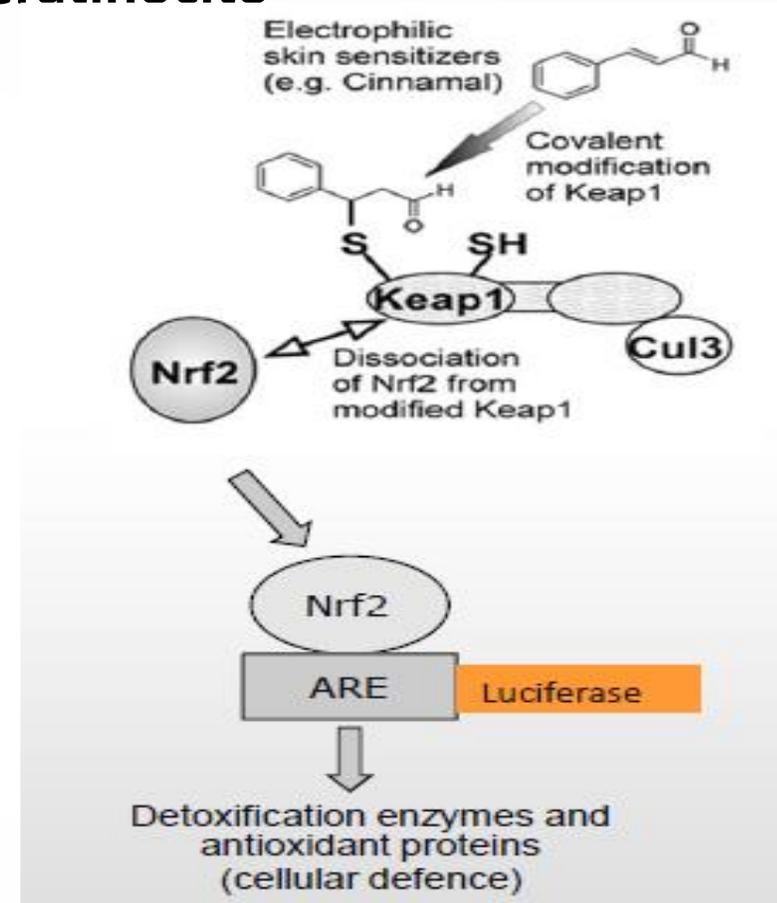
Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



# Guia da OECD para o ensaio de substâncias químicas - 442D

## Ensaio de sensibilização cutânea in vitro que abordam o evento AOP chave sobre a ativação do queratinócito

O método de teste LuSens faz uso de uma linhagem celular aderente, imortalizada e derivada de queratinócitos humanos que abrigam, de forma estável, um gene repórter de luciferase, sob o controle do elemento de resposta antioxidante do gene NQO1 de camundongo(20). Sabe-se que os genes dependentes da ARE, como o NQO1, são regulados positivamente pelos sensibilizadores de contato.



<https://www.piscltd.org.uk/wp-content/uploads/2015/01/Skin-Sensitization-webinar-final-ppt.pdf>



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



## **II - Para avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular: 342**

Método OECD DT 437 - Método de Teste de Opacidade e Permeabilidade da Córnea Bovina para Identificação:

- i) Substâncias Químicas Indutoras de Danos Oculares Graves e
- ii) Substâncias Químicas que Não Requerem Classificação para Irritação nos Olhos ou para Dano Ocular Grave

Método OECD DT 438 - Método de teste ocular isolado da galinha, para identificar:

- I) substâncias químicas que provocam lesões oculares graves e
- II) substâncias químicas que não requerem classificação para irritação ocular ou lesões oculares graves

Método OECD DT 460 - Método de teste de vazamento de fluoresceína para identificação de corrosivos oculares e irritantes severos

Método OECD DT 491 - Método de teste in vitro de exposição a curto prazo para identificação de:

- I) substâncias químicas que produzem danos graves ao olho e
- II) produtos químicos que não requerem classificação para irritação ocular ou dano sério ao olho

Método OECD DT 492 - Método de teste de epitélio humano semelhante à córnea (RhCE) reconstruído para identificar substâncias químicas que não exigem classificação e rotulagem para irritação ocular ou dano ocular grave



**Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil**



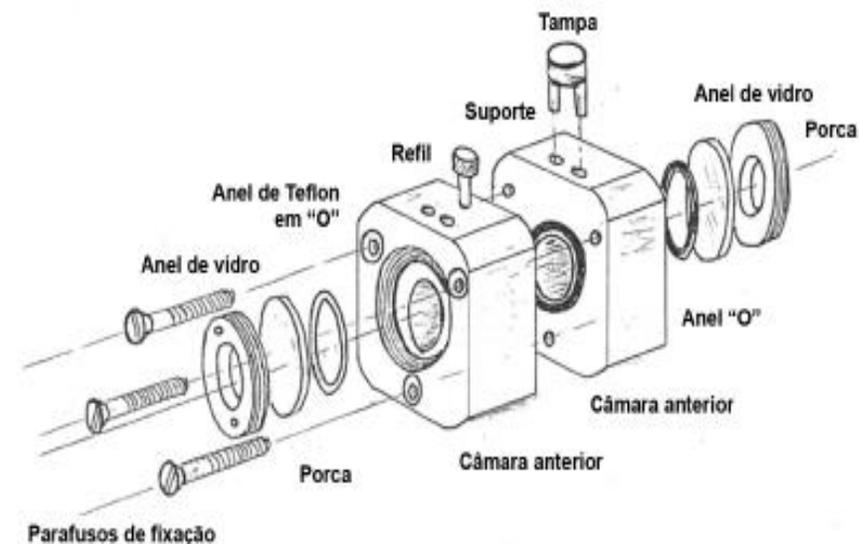
## Diretriz de OECD para o ensaio de substâncias químicas - 437

### Método de Teste de Opacidade e Permeabilidade da Córnea Bovina para Identificação:

#### Substâncias Químicas Indutoras de Danos Oculares Graves

#### PRINCÍPIO DO TESTE

O método de teste BCOP é um modelo organotípico, que fornece manutenção a curto prazo da função fisiológica e da bioquímica normal da córnea bovina *in vitro*. Neste método de teste, o dano é avaliado por medidas quantitativas de alterações na opacidade da córnea e permeabilidade com um opacitômetro e um espectrofotômetro de luz visível, respectivamente. Ambas as medições são usadas para calcular um IVIS, que é usado para atribuir uma categoria de classificação de risco de irritabilidade *in vitro* para a previsão do potencial de irritação ocular *in vivo* de uma substância química em teste.



<sup>1</sup>As dimensões fornecidas baseiam-se em um suporte para córnea que é usado para vacas



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil

# ***Diretriz de OECD para o ensaio de substâncias químicas - 437***

## ***Método de Teste de Opacidade e Permeabilidade da Córnea Bovina para Identificação:***

### **Substâncias Químicas Indutoras de Danos Oculares Graves**

Critério de decisão

Os valores-limite do IVIS para identificação de substâncias químicas de teste como indutores de lesões oculares graves (UN GHS Categoria 1) e substâncias químicas de teste que não exigem classificação para irritação nos olhos ou dano ocular grave (UN GHS Sem Categoria) são dados a seguir:

| <b>IVIS</b>   | <b>UN GHS</b>                   |
|---------------|---------------------------------|
| $\leq 3$      | Sem Categoria                   |
| $>3; \leq 55$ | Nenhuma previsão pode ser feita |
| $>55$         | Categoria 1                     |



## ***Diretriz OECD para o ensaio de substâncias químicas - 438*** ***Método de teste ocular isolado da galinha***



<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/meetings/implement-2011/ocular-present/8-allen.pdf>

O método de teste ICE é um modelo organotípico que fornece, em curto prazo, a manutenção ocular da galinha in vitro. Neste método de teste, o dano pela substância química é avaliado pela determinação do edema da córnea, da opacidade e da retenção de fluoresceína. Além disso, a histopatologia pode ser usada para aumentar a sensibilidade do método para a identificação de detergentes e surfactantes de pH não-extremo ( $2 < \text{pH} < 11,5$ ) da Categoria 1 do GHS da ONU.

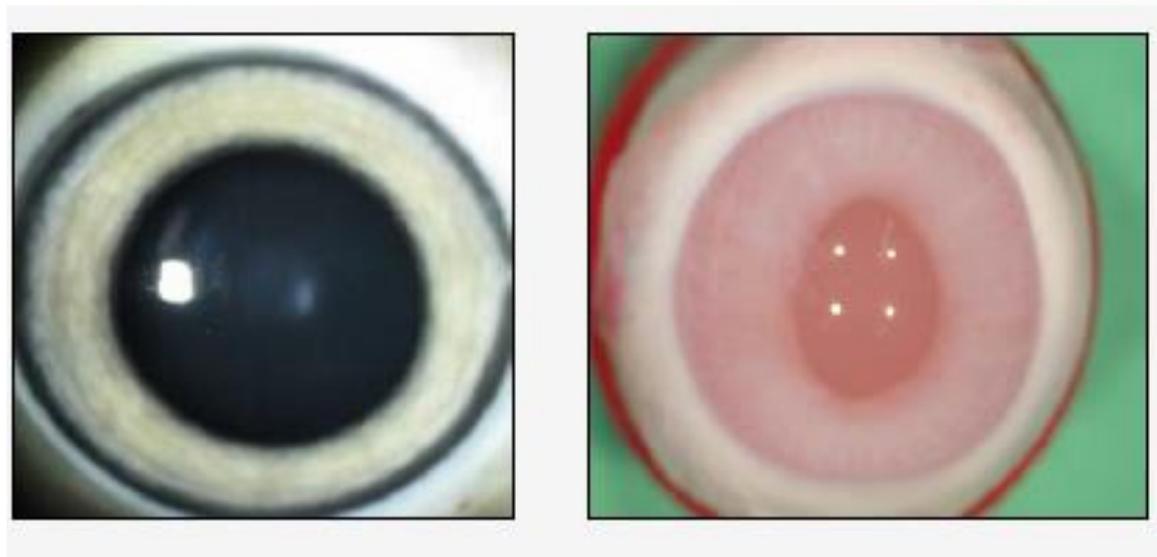


**Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil**



## ***Diretriz OECD para o ensaio de substâncias químicas - 438*** ***Método de teste ocular isolado da galinha***

Embora a medição do edema da córnea forneça uma avaliação quantitativa, a opacidade da córnea, a retenção de fluoresceína e as alterações histopatológicas envolvem, separadamente, uma avaliação qualitativa. Cada medição é convertida em uma pontuação quantitativa, usada para atribuir uma Classe ICE (I a IV), ou atribuída a uma categorização qualitativa usada para definir uma classificação de risco ocular in vitro, como UN GHS Categoria 1 ou como UN GHS Sem Categoria.



<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/meetings/implement-2011/ocular-present/8-allen.pdf>



**Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil**



# Diretriz OECD para o ensaio de substâncias químicas - 438

## Método de teste ocular isolado da galinha

Sistema de escore histopatológico semi-quantitativo utilizado para olhos de galinha

Tabela 1. Escores de opacidade da córnea

| Escore | Observação                                                                                                           |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0      | Sem opacidade                                                                                                        |
| 0.5    | Opacidade muito fraca                                                                                                |
| 1      | Áreas dispersas ou difusas; detalhes da íris são claramente visíveis                                                 |
| 2      | Área translúcida facilmente discernível; detalhes da íris são ligeiramente obscurecidos                              |
| 3      | Opacidade corneana severa; nenhum detalhe específico da íris é visível; tamanho da pupila é dificilmente discernível |
| 4      | Opacidade corneana completa; íris invisível                                                                          |

Tabela 2. Pontuação de retenção de fluoresceína

| Escore | Observação                                                    |
|--------|---------------------------------------------------------------|
| 0      |                                                               |
| 0.5    | Coloração de célula única muito pequena                       |
| 1      | Coloração de célula única espalhada por toda a área da córnea |
| 2      | Coloração de célula única densa focal ou confluyente          |
| 3      | Grandes áreas confluentes da córnea retendo fluoresceína      |
| 4      | Opacidade corneana completa; íris invisível                   |

| Parâmetro                                                                                              | Observação | Escore | Descrição*                                                                      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|--------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Epitélio: erosão                                                                                       | Muito leve | 1/2    | Poucas células individuais até toda a camada superficial única                  |
|                                                                                                        | Leve       | 1      | Até 3 camadas desapareceu                                                       |
|                                                                                                        | Moderado   | 2      | Até 50% da camada epitelial desapareceu*                                        |
|                                                                                                        | Severa     | 3      | Camada epitelial desapareceu até a membrana basal                               |
| Epitélio: vacuolização<br>Pontuado separadamente para as partes superior, média e inferior epitélio ** | Muito leve | 1/2    | Uma única ou poucas células dispersas                                           |
|                                                                                                        | Leve       | 1      | Grupos de células vacuoladas ou uma única cadeia de células com pequenos vácuos |
|                                                                                                        | Moderado   | 2      | Até 50% do epitélio consiste de células vacuoladas*                             |
| Epitélio: necrose ***                                                                                  | Severa     | 3      | 50 - 100% do epitélio consiste de células vacuoladas                            |
|                                                                                                        | Normal     | -      | <10 células necróticas †                                                        |
|                                                                                                        | Muito leve | 1/2    | 10 a 20 células necróticas †                                                    |
|                                                                                                        | Leve       | 1      | 20 a 40 células necróticas †                                                    |
|                                                                                                        | Moderado   | 2      | Muitas células necróticas mas <50% de camada epitelial                          |
|                                                                                                        | Severa     | 3      | 50 a 100% da camada epitelial está necrosada                                    |
| Parâmetro                                                                                              | Observação | Escore | Descrição*                                                                      |
| Estroma: núcleos picnóticos ††††                                                                       | Normal     | -      | <5 núcleos picnóticos                                                           |
|                                                                                                        | Muito leve | 1      | 5 a 10 núcleos picnóticos                                                       |
|                                                                                                        | Leve       | 2      | >10 núcleos picnóticos                                                          |
|                                                                                                        | Moderado   | P      | Aparência irregular das fibras                                                  |
|                                                                                                        | Severa     | P      | O endotélio consiste de uma camada só, portanto o grau não é relevante          |



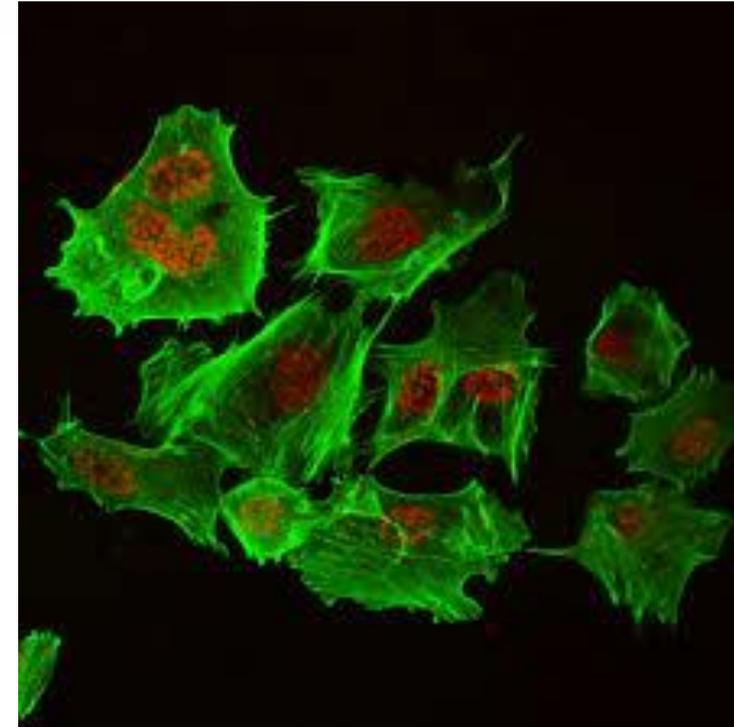
Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



## *Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas - 460*

### *Método de teste de vazamento de fluoresceína para identificação de corrosivos oculares e irritantes severos*

O método de teste de Vazamento de Fluoresceína (FL) é um método de teste in vitro que pode ser usado, sob certas circunstâncias e com limitações específicas, para classificar substâncias químicas (substâncias e misturas), tais como corrosivos oculares e irritantes graves, conforme definido pelo Sistema Global de Harmonização de Classificação e Rotulagem de Substâncias Químicas (GHS) (Categoria 1) da Organização das Nações Unidas (ONU).



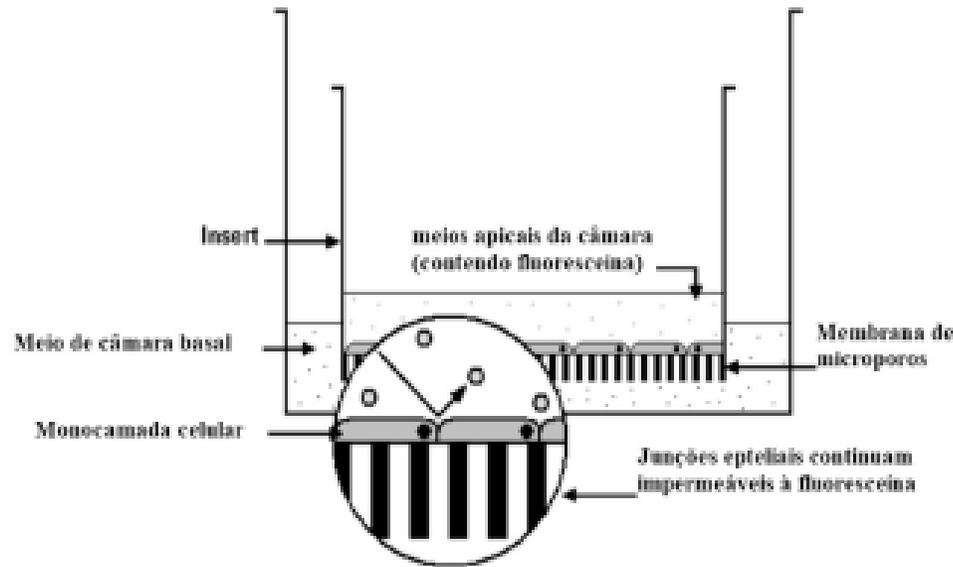
[http://www.asas.or.jp/jsaae\\_old/HARTUNG.pdf](http://www.asas.or.jp/jsaae_old/HARTUNG.pdf)



**Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil**

## Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas - 460

### Método de teste de vazamento de fluoresceína para identificação de corrosivos oculares e irritantes severos



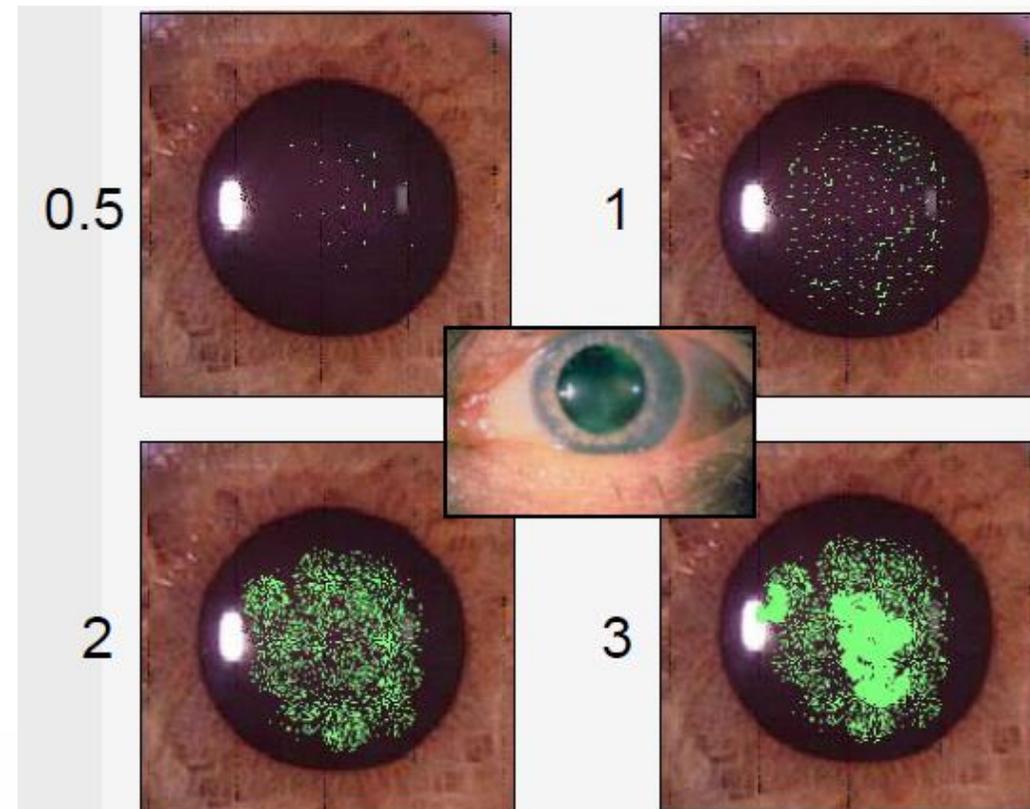
O método de teste FL é um ensaio *in vitro* baseado em citotoxicidade e função celular realizado numa monocamada confluyente de células epiteliais tubulares MDCK CB997, que crescem em inserções semipermeáveis e modelam o estado não proliferativo do epitélio córneo *in vivo*. A linha/contorno celular MDCK está bem estabelecida e forma junções estreitas desmossômicas semelhantes àquelas encontradas no lado apical dos epitélios conjuntivos e córneos.

## Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas - 491

Método de teste in vitro de exposição a curto prazo para identificação de:

- I) substâncias químicas que produzem danos graves ao olho e
- II) produtos químicos que não requerem classificação para irritação ocular ou dano sério ao olho

O método de teste de exposição a curto prazo (Short Time Exposure/STE, em inglês) é um método in vitro que pode ser usado sob certas circunstâncias, e com limitações específicas, para a classificação e a rotulagem de substâncias químicas (substâncias e misturas) que induzem danos oculares graves, bem como aquelas que não necessitam de classificação para danos oculares graves ou irritação ocular, conforme definido pelo Sistema Global de Harmonização de Classificação e Rotulagem de Substâncias Químicas (GHS) das Nações Unidas (ONU)



<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/meetings/implement-2011/ocular-present/8-allen.pdf>



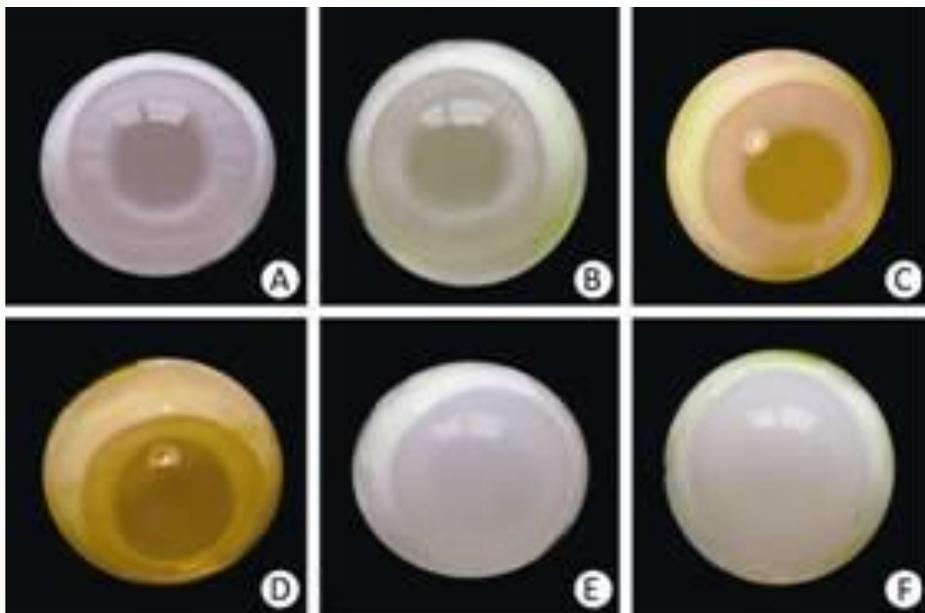
Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



## Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas - 491

Método de teste in vitro de exposição a curto prazo para identificação de:

- I) substâncias químicas que produzem danos graves ao olho e
- II) produtos químicos que não requerem classificação para irritação ocular ou dano sério ao olho



GUO Xiang, YANG Xing Fen, YANG Ying, HANS Raabe, CAI Jing Heng, XUE Jin Yu, TAN Xiao Hua, XIE Xiao Ping, XIONG Xi Kun and HUANG Jun Ming. Prediction of Ocular Irritancy of 26 Chemicals and 26 Cosmetic Products with Isolated Rabbit Eye (IRE) Test. Biomed Environ Sci, 2010; 25(3): 359-366.

O método de teste STE é um ensaio in vitro baseado em citotoxicidade que é realizado em uma monocamada confluyente de células Statens Serum Institut Rabbit Cornea (SIRC), cultivadas em uma microplaca de policarbonato de 96 poços. Após cinco minutos de exposição a uma substância química em teste, a citotoxicidade é medida quantitativamente, como a viabilidade relativa das células SIRC, usando-se o ensaio MTT(4). A viabilidade celular diminuída é usada para prever potenciais efeitos adversos que levam a danos oculares.



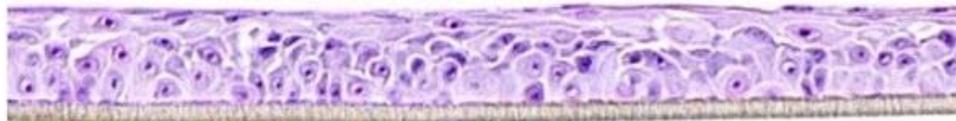
Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



## Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas - 492

Método de teste de epitélio humano semelhante à córnea (RhCE) reconstruído para identificar substâncias químicas que não exigem classificação e rotulagem para irritação ocular ou dano ocular grave

EpiOcular



Human Cornea



O objetivo desta Diretriz de Teste é descrever o procedimento usado para avaliar o potencial de risco ocular de uma substância química em teste, com base em sua capacidade de induzir citotoxicidade em uma construção de tecido RhCE, conforme medido pelo teste de corante de tetrazólio {TD; por exemplo, brometo de MTT [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio

<https://www.mattek.com/products/epiocular/#applications>



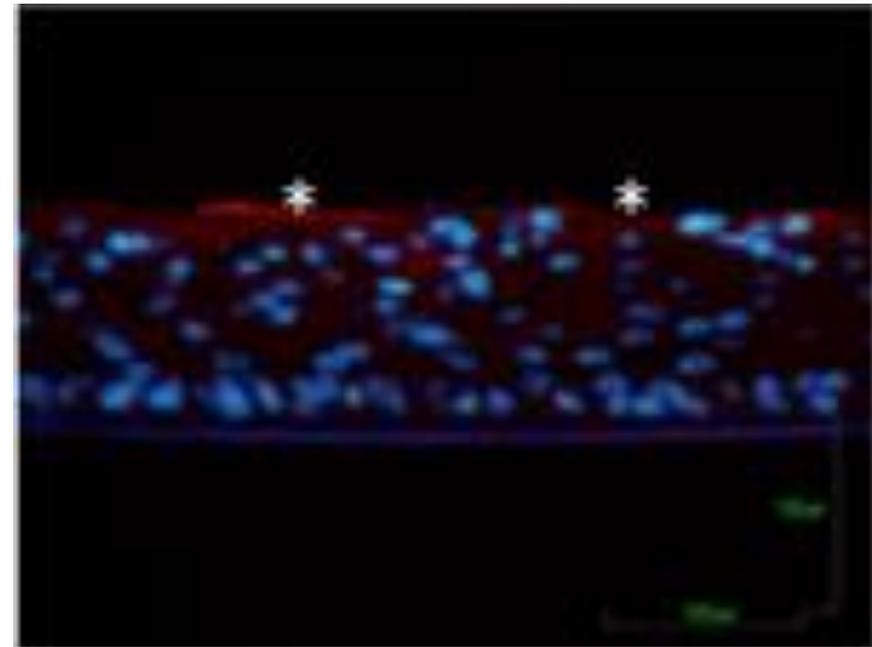
Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



## Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas - 492

### Método de teste de epitélio humano semelhante à córnea (RhCE) reconstruído para identificar substâncias químicas que não exigem classificação e rotulagem para irritação ocular ou dano ocular grave

Esta Diretriz de Teste é baseada em construções de tecido tridimensional comercial de RhCE, que são produzidos usando-se tanto queratinócitos epidérmicos primários humanos (EpiOcular™ OCL-200), quanto células epiteliais da córnea humana imortalizadas (SkinEthic™ HCE/ S), ou células epiteliais primárias da córnea humana (isto é, LabCyte CORNEA-MODEL24). As estruturas de tecido EpiOcular™ OCL-200, SkinEthic™ HCE/ S e LabCyte CORNEA-MODEL24 RhCE são semelhantes à estrutura tridimensional do epitélio corneano in vivo e são produzidas usando-se células da espécie de interesse.



<http://www.jppte.co.jp/english/business/LabCyte/CORNEAmode1.html>



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



### III - Para avaliação do potencial de Fototoxicidade:

Método OECD DT 432 - Teste de Fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU.



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



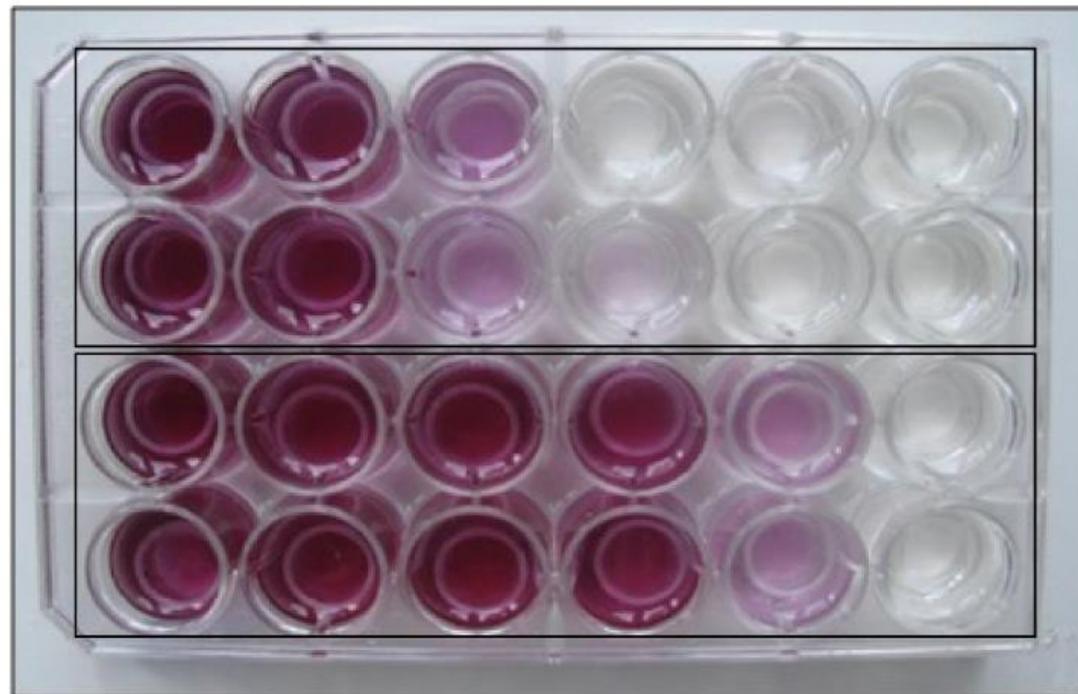
# Diretrizes OECD para teste De substâncias químicas - 432

## Teste de fototoxicidade in vitro 3T3 NRU

B

A fototoxicidade é definida como uma resposta tóxica a uma substância aplicada no corpo que é provocada ou aumentada (aparente em doses mais baixas) após a exposição subsequente à luz ou, que é induzida pela irradiação da pele após a administração sistêmica de uma substância.

2. O ensaio de fototoxicidade in vitro 3T3 NRU é utilizado para identificar o potencial fototóxico de uma substância química de ensaio, induzida após a exposição à luz.



<https://reconstructed-human-epidermis.com/epics/phototox/>



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



# Diretrizes OECD para teste De substâncias químicas - 432

## Teste de fototoxicidade in vitro 3T3 NRU



O teste de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU baseia-se numa comparação da citotoxicidade de uma substância química, quando testada na presença e na ausência de exposição a uma dose não citotóxica de luz solar simulada. A citotoxicidade neste teste é expressa como uma redução concentração-dependente da absorção do corante vital Vermelho Neutro (NR) medido 24 horas após o tratamento, com a substância química em teste e a irradiação



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



## Diretrizes OECD para testeDe substâncias químicas - 432

### Teste de fototoxicidade in vitro 3T3 NRU

O NR é um corante catiônico fraco que penetra rapidamente nas membranas celulares por não difusão, acumulando-se intracelularmente nos lisossomos. Alterações da superfície celular da membrana lisossomal sensível levam à fragilidade lisossomal e a outras alterações que gradualmente se tornam irreversíveis. Tais mudanças, provocadas pela ação de xenobióticos, resultam em menores absorção e ligação de NR. Assim, fica possível distinguir entre células viáveis, danificadas ou mortas – que é a base deste teste.



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil

#### **IV - Para avaliação da absorção cutânea:**

Método OECD DT 428 - Absorção Cutânea método *in vitro*.



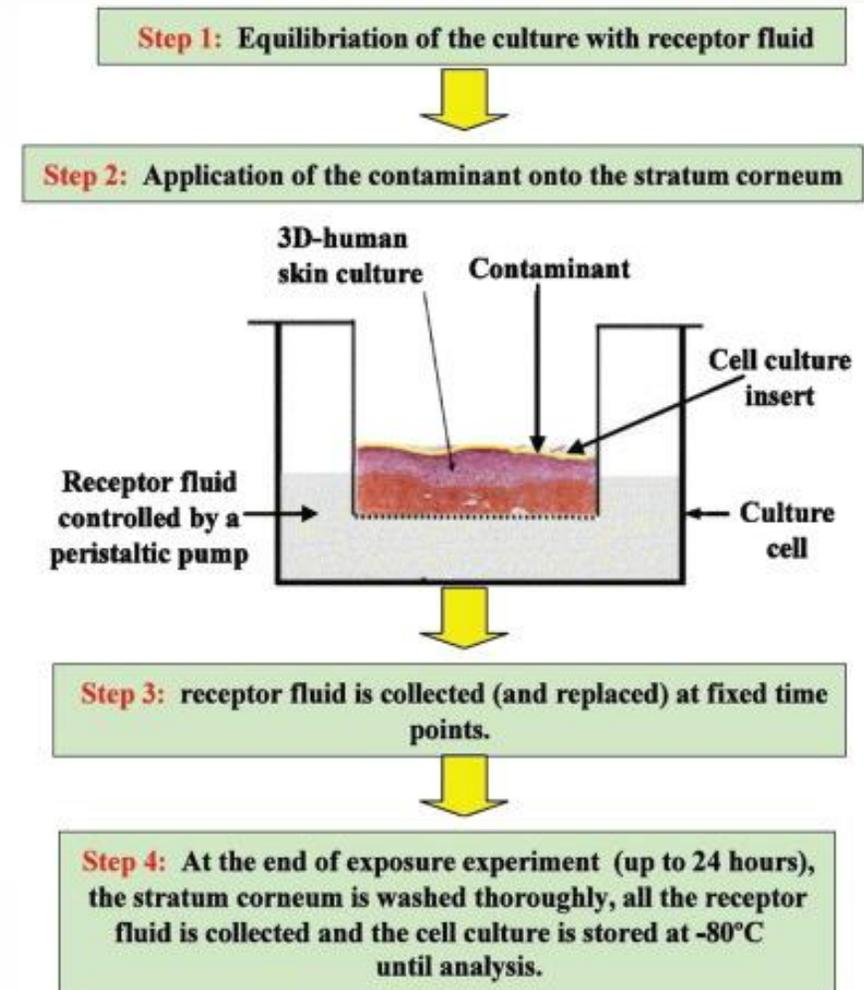
**Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil**



## Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas - 428

### Absorção cutânea: método in vitro

A diretriz OECD 428 apresenta princípios gerais para medir a absorção e a difusão cutâneas de uma substância de teste, usando uma amostra de tecido cutâneo. A pele de muitas espécies de mamíferos, incluindo humanos, pode ser usada. As propriedades de permeabilidade da pele são mantidas após a biópsia do corpo, porque a principal barreira de difusão é o stratum corneum (extrato córneo) não viável; o transporte ativo de substâncias químicas através da pele ainda não foi identificado.

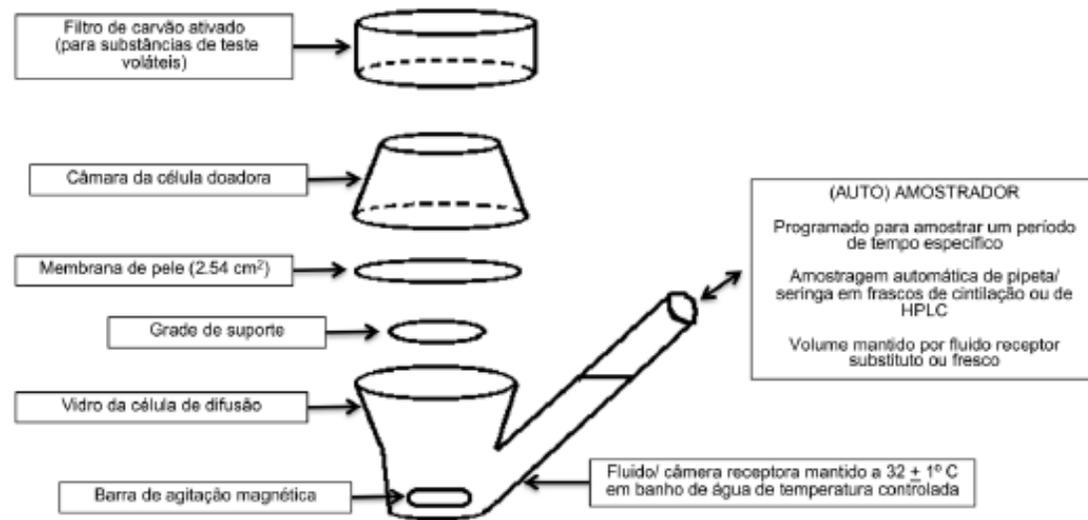


# Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas - 428

## Absorção cutânea: método *in vitro*

Figura 1

Exemplo de um design típico de uma célula de difusão estática para estudos de absorção percutânea *in vitro*.



### PRINCÍPIOS DO TESTE

A substância de teste, que pode ser identificada a partir de um radioisótopo, é aplicada à amostra de pele, separando as duas câmaras de célula de difusão. A substância química permanece na pele por tempo específico, sob condições restritas, antes da remoção por procedimento de limpeza apropriado. O fluido receptor é analisado por amostras, em períodos ao longo do experimento, e analisado para o teste de substâncias químicas e/ou metabólitos.

## **V - Para avaliação de toxicidade aguda:**

Método OECD DT 129 - Documento de orientação sobre o uso de ensaios de citotoxicidade para estimar as doses iniciais para testes de toxicidade sistêmica oral aguda

Método OECD DT 420 - Toxicidade oral aguda – procedimento de dose fixa

Método OECD DT 423 - Toxicidade oral aguda – método de classe de toxicidade aguda

Método OECD DT 425 - Toxicidade oral aguda – protocolo “up-and-down”



**Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil**



**Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas – 129**  
**Documento de orientação sobre o uso de ensaios de citotoxicidade para estimar as doses iniciais para testes de toxicidade sistêmica oral aguda**

O conceito de utilização de dados de citotoxicidade in vitro, para determinar as doses iniciais para testes de toxicidade oral aguda em roedores, foi discutido e avaliado no Workshop Internacional sobre Métodos In Vitro para Avaliação da Toxicidade Sistêmica Aguda, realizado em 2000 (ICCVAM, 2001a). A abordagem envolve a utilização de um valor de IC50 de um teste de citotoxicidade basal in vitro com a regressão do Registro de Citotoxicidade (RC) para prever um valor de DL50 para utilização como uma dose inicial para o método de Classe Tóxica Aguda (ATC) ou para o procedimento de teste Up-and-Down (UDP) (Spielmann et al., 1999). Simulações mostraram que o uso de ensaios de citotoxicidade in vitro, para estimar um DL50 para uso como uma dose inicial no UDP, poderia reduzir potencialmente o uso de animais em 25-40%.



**Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil**



## Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas – 129

### Documento de orientação sobre o uso de ensaios de citotoxicidade para estimar as doses iniciais para testes de toxicidade sistêmica oral aguda

O procedimento de ensaio de citotoxicidade basal in vitro da NRU (Neutral Red Unit) baseia-se na capacidade das células viáveis em incorporar e ligar-se ao vermelho neutro (VN), um corante supravital (Borenfreund e Puerner, 1985). O VN é um corantecatiônico fraco, que se difunde rapidamente, através da membrana plasmática, e se concentra nos lisossomos, onde se liga eletrostaticamente à matriz lisossomal aniônica.

(a)

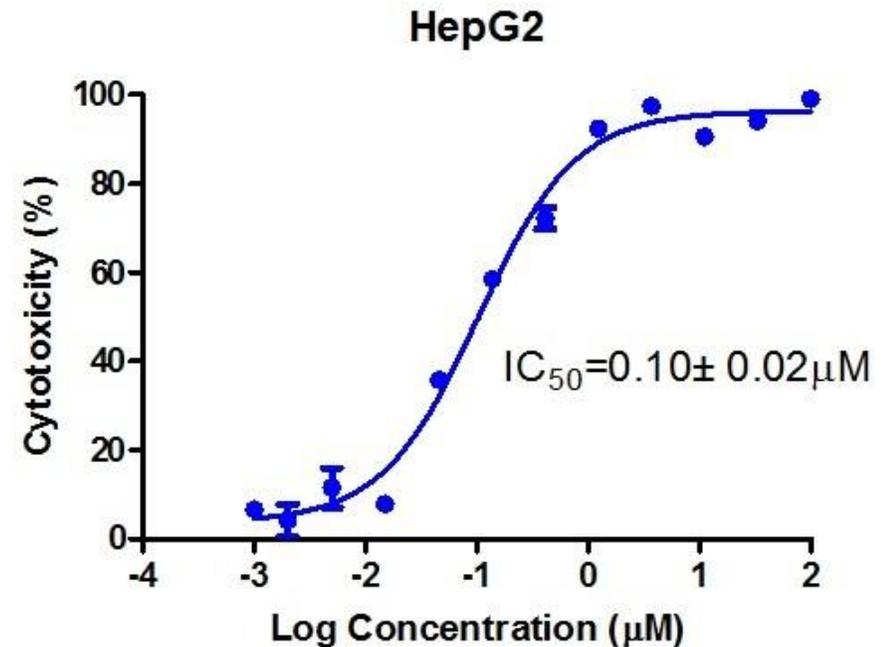


Figure: (a) Dose-response curve of HepG2

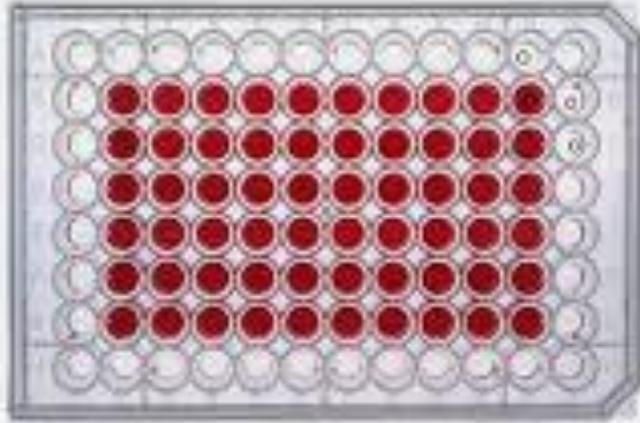


Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil

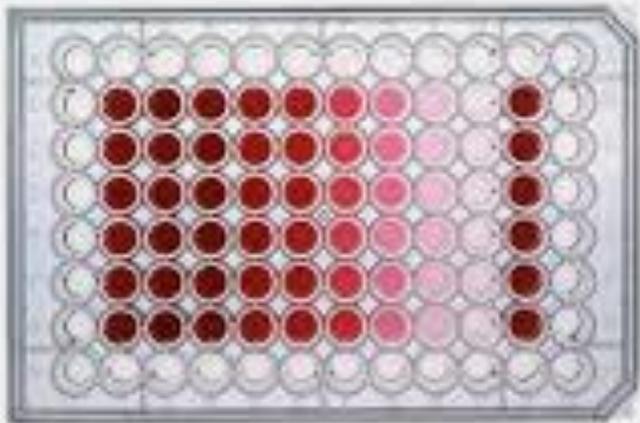


## Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas – 129

### Documento de orientação sobre o uso de ensaios de citotoxicidade para estimar as doses iniciais para testes de toxicidade sistêmica oral aguda



Ketoprofene -UV



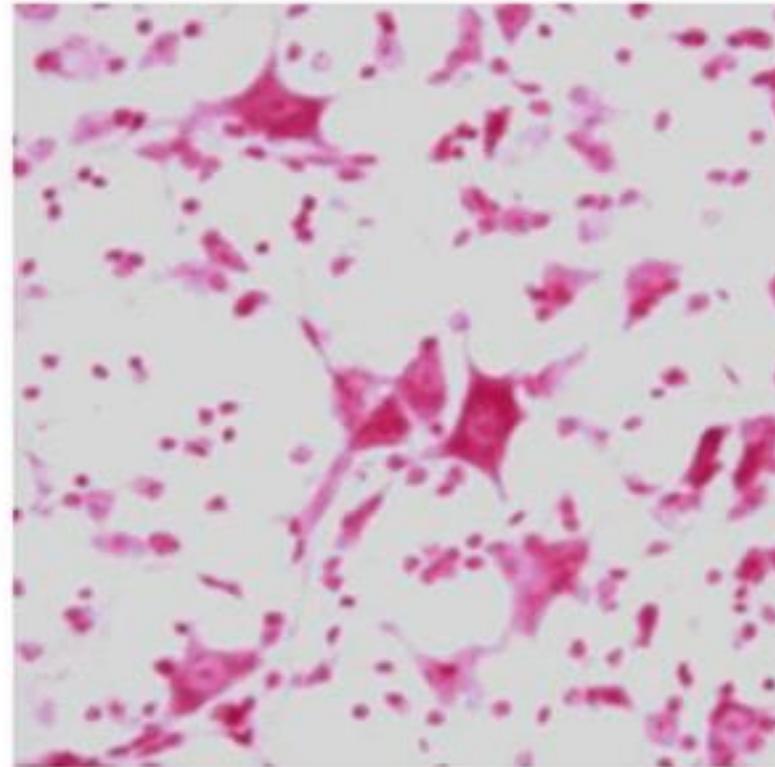
Ketoprofene +UV

Substâncias tóxicas podem alterar a superfície celular ou a membrana lisossômica para causar fragilidade lisossomal e outras alterações adversas que, gradualmente, se tornam irreversíveis. Tais alterações adversas provocam a morte celular e/ou a inibição do crescimento celular, que diminuem a quantidade de VN retida pela cultura.

## Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas – 129

### Documento de orientação sobre o uso de ensaios de citotoxicidade para estimar as doses iniciais para testes de toxicidade sistêmica oral aguda

A dose inicial in vivo é um valor estimado de  $DL_{50}$ , calculado inserindo-se o valor de  $IC_{50}$  in vitro numa fórmula de regressão derivada de 282 substâncias, para as quais existem valores históricos de  $DL_{50}$  orais de camundongos e valores  $IC_{50}$  in vitro do RC (ICCVAM, 2006a). Para as 72 substâncias químicas testadas no estudo de validação de citotoxicidade basal in vitro do NICEATM/ECVAM, a reprodutibilidade interlaboratorial da  $IC_{50}$ , medida pelo coeficiente de variação médio (CV), foi de 47%, para o ensaio 3T3 NRU, e 28%, para o NHK ensaio NRU.

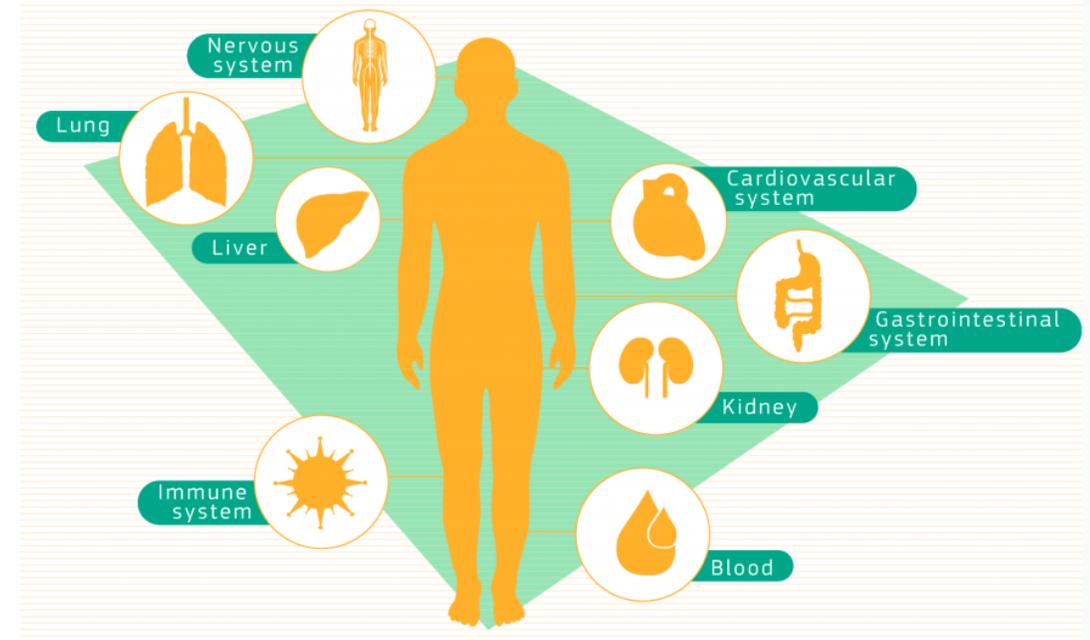


Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil

## Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas - 420

### Toxicidade oral aguda – procedimento de dose fixa

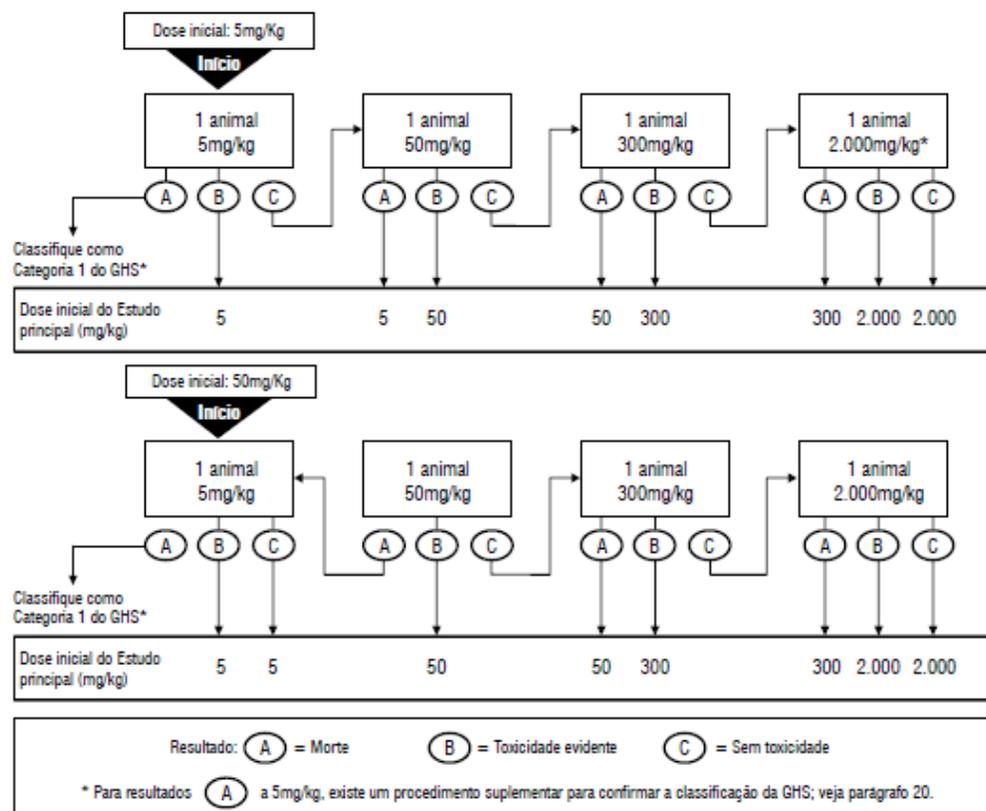
Métodos tradicionais para avaliar toxicidade aguda usam a morte de animais como ponto de término. Em 1984, uma nova abordagem para testes de toxicidade aguda foi sugerida pela Sociedade Britânica de Toxicologia, baseada na administração em uma série de níveis de dose fixa. A abordagem evitava a morte de animais, como ponto final do teste se baseava nas observações de sinais claros de toxicidade em um dos vários níveis de dose fixa. O procedimento foi adotado pelo Conselho como Diretriz de Teste em 1992, seguindo os estudos de validação *in vivo* – britânicos e internacionais.



# Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas - 420

## Toxicidade oral aguda – procedimento de dose fixa

Anexo 2: Fluxograma para o estudo observacional



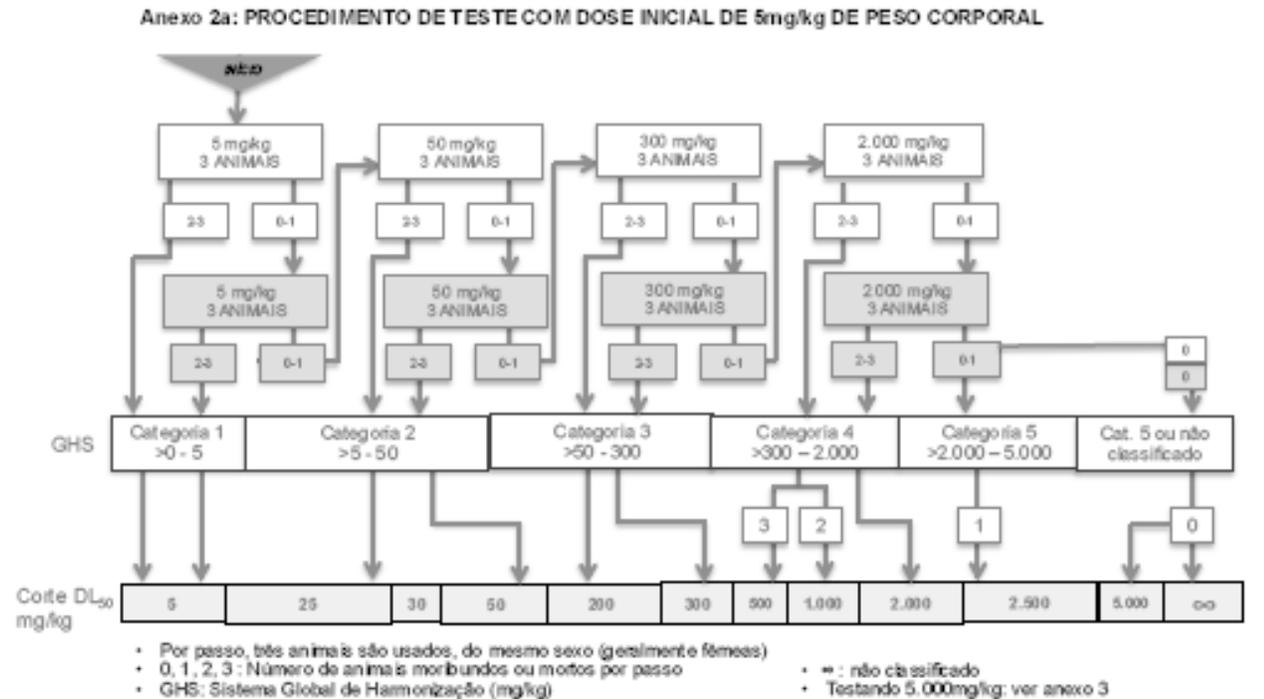
### Princípios do teste

Grupos de animais de um mesmo sexo são testados em um procedimento passo a passo, usando as doses fixas de 5, 50, 300 e 2.000mg/kg (excepcionalmente, uma dose fixa adicional de 5.000mg/kg pode ser considerada – veja parágrafo 19). A dose inicial é selecionada baseada em um estudo observacional para produzir alguns sinais de toxicidade, sem causar efeitos tóxicos severos ou mortalidade. Sinais clínicos e condições associadas à dor, ao sofrimento e à morte iminente são descritos em detalhes em um Documento de Orientação OECD em separado

# Diretrizes OECD para Testes de Substâncias Químicas - 423

## Toxicidade oral aguda – método de classe de toxicidade aguda

O método de classe de toxicidade aguda, estabelecido nesta diretriz, é um procedimento passo a passo, com o uso de três animais de um mesmo sexo por passo. Dependendo da mortalidade e/ou do estado terminal desses animais, em média 2-4 passos podem ser necessários para permitir o melhor julgamento da toxicidade aguda da substância teste. Esse procedimento é reproduzível, usa poucos animais e é capaz de ranquear substâncias de maneira similar à de outros métodos de testes de toxicidade aguda.



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil

## Diretrizes OECD para Testes de Substâncias Químicas - 425

### Toxicidade oral aguda – protocolo “up-and-down”

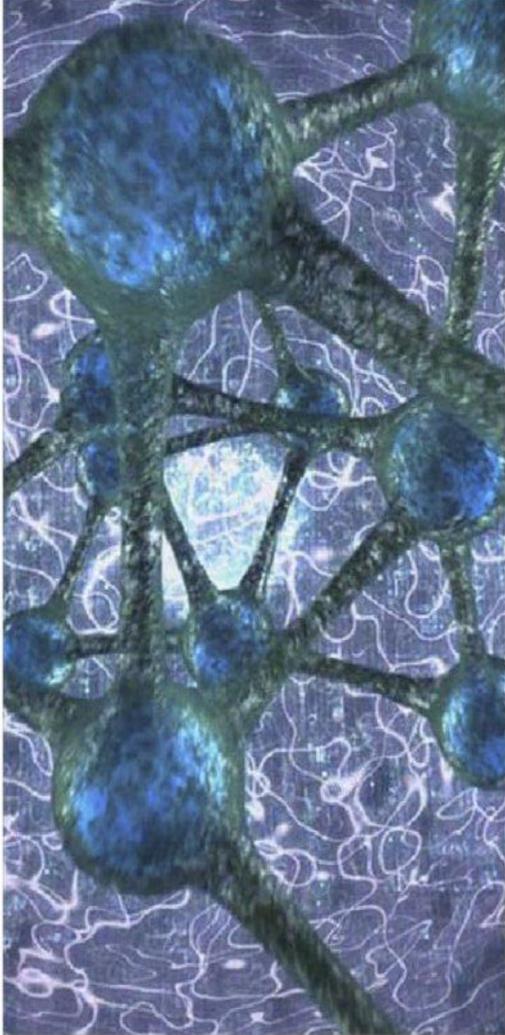
O método permite estimativa de uma DL50 com intervalo de confiança e o resultado permite que a substância seja ranqueada e classificada de acordo com o Sistema Global de Harmonização (GHS ou Global Harmonized System) para a classificação de substâncias químicas que causam toxicidade aguda.

Quando não houver informação disponível para fazer uma estimativa preliminar da DL50 e da inclinação da curva dose-resposta, os resultados de simulações de computador têm sugerido que começar perto de 175mg/kg e usar meio-log para diluição.



## Diretrizes OECD para Testes de Substâncias Químicas - 425

### Toxicidade oral aguda – protocolo “up-and-down”



O teste principal consiste em uma única progressão de dose ordenada na qual os animais são dosados, um de cada vez, em intervalo mínimo de 48 horas. O primeiro animal recebe uma dose abaixo do nível mais alto e estimado da  $DL_{50}$ . Se o animal sobreviver, a dose para o próximo animal é aumentada em [um fator de] 3,2 vezes a dose original; se morrer, a dose para o próximo animal é diminuída em uma progressão de dose similar. Cada animal deve ser observado cuidadosamente por até 48 horas antes de se decidir se deve dosar o próximo animal e em qual dosagem.

## **VI - Para avaliação de genotoxicidade**

Método OECD DT 487 - Teste de micronúcleos em células de mamíferos *in vitro*

## **VII – Para Avaliação de toxicidade reprodutiva:**

Método OECD DT 421 - Teste de triagem de reprodução/desenvolvimento de toxicidade

Método OECD DT 422 - Estudo combinado de toxicidade de dose repetida com o teste de triagem para reprodução/toxicidade no desenvolvimento



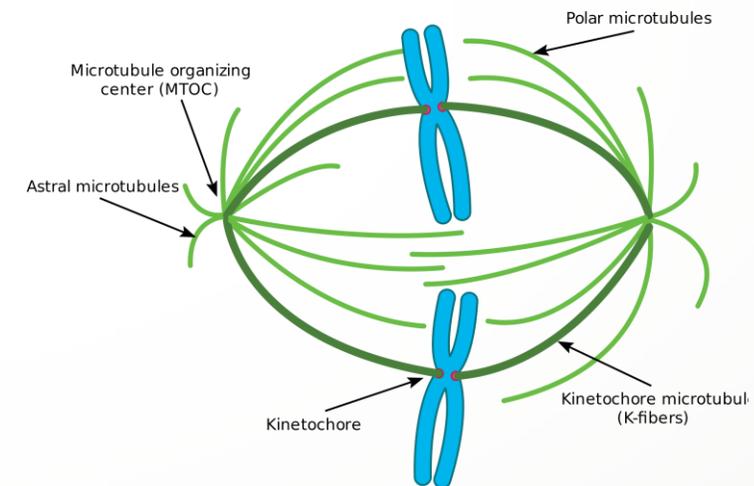
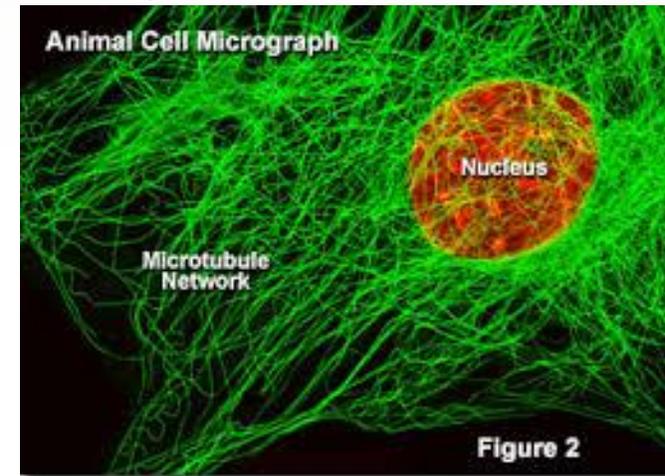
**Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil**



# Diretrizes OECD para Testes de Substâncias Químicas - 487

## Teste de micronúcleos em células de mamífero in vitro

<https://micro.magnet.fsu.edu/cells/microtubules/microtubules.html>



O teste do micronúcleo in vitro (MNvit) é um teste de genotoxicidade para a detecção de micronúcleos (MN) no citoplasma de células em interfase. Os micronúcleos podem se originar de fragmentos cromossômicos acêntricos (isto é, sem um centrômero) ou de cromossomos inteiros que são incapazes de migrar para os polos durante o estágio de anáfase da divisão celular.

[https://en.wikipedia.org/wiki/Microtubule#/media/File:Spindle\\_apparatus.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Microtubule#/media/File:Spindle_apparatus.svg)



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



# Diretrizes OECD para Testes de Substâncias Químicas - 487

## Teste de micronúcleos em células de mamífero in vitro

Culturas de células de origem humana ou de outros mamíferos são expostas à substância química em estudo, com e sem uma fonte exógena de ativação metabólica, a menos que sejam utilizadas células com capacidade metabólica adequada.

Tabela 2. Tratamento celular e períodos de coleta para o MNvit teste

|                                                                                                                                            |                            |                                                                                                                                                                                               |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Linfócitos, células primárias e linhagens celulares tratadas com cytoB                                                                     | + S9 Tratamento breve      | Tratar por 3-6 horas na presença de S9; remova o S9 e o meio de tratamento; adicione meio fresco e cytoB; coleta 1.5 - 2.0 comprimentos normais do ciclo celular após o início do tratamento. |
|                                                                                                                                            | - S9 Tratamento breve      | Tratar por 3-6 horas; remover o meio de tratamento; adicione meio fresco e cytoB; coleta 1.5 - 2.0 comprimentos normais do ciclo celular após o início do tratamento.                         |
|                                                                                                                                            | - S9 Tratamento prolongado | Trate por 1,5 a 2 comprimentos normais de ciclo celular na presença de cytoB; coleta no final do período de tratamento.                                                                       |
| Linhas celulares tratadas sem cytoB (Idênticas aos esquemas de tratamento descritos acima, com a exceção de que nenhum cytoB é adicionado) |                            |                                                                                                                                                                                               |



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil

## Diretrizes OECD para Testes de Substâncias Químicas - 421

### Teste de triagem de reprodução / desenvolvimento de toxicidade

A substância química de teste é administrada em doses graduadas a vários grupos de machos e fêmeas.

Os machos devem ser testados por, no mínimo, quatro semanas e até o dia anterior ao sacrifício programado (mínimo de duas semanas antes do acasalamento, durante o período de acasalamento e, aproximadamente, duas semanas após o acasalamento). Tendo em conta o período curto de tratamento pré-acasalamento em machos, a fertilidade pode não ser um indicador específico sensível da toxicidade testicular.

Portanto, um exame histológico detalhado dos testículos é essencial. A combinação de um período de dosagem pré-acasalamento de duas semanas e subseqüentes observações de acasalamento/fertilidade com um período de dosagem global de, pelo menos, quatro semanas, seguida de histopatologia detalhada das gônadas masculinas, é considerada suficiente para permitir a detecção da maioria dos efeitos sobre fertilidade masculina e espermatogênese.



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



## Diretrizes OECD para Testes de Substâncias Químicas - 421

### Teste de triagem de reprodução / desenvolvimento de toxicidade

As fêmeas devem ser testadas durante todo o estudo. Isso inclui duas semanas antes do acasalamento (com o objetivo de cobrir, pelo menos, doisaios completos), o tempo variável até a concepção, a duração da gestação e, no mínimo, treze dias após o parto, até, inclusive, o dia anterior ao sacrifício programada..



<http://palmerlab.org/laboratory-rat-breast-cancer-research-2/>



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil



## **Diretriz da OECD para teste de substâncias químicas - 422**

### **Estudo combinado de toxicidade de dose repetida com o teste de triagem para reprodução/ toxicidade no desenvolvimento**

Na avaliação e estudo das características tóxicas de uma substância química de teste, a determinação da toxicidade por via oral com doses repetidas pode ser realizada após a informação inicial sobre a toxicidade, obtida por testes agudos.

Este estudo fornece informações sobre os possíveis riscos à saúde, que possam surgir da exposição repetida durante um período de tempo relativamente limitado. O método compreende o estudo básico de toxicidade de dose repetida, que pode ser usado para substâncias químicas, nos quais 90 dias de estudo não são garantidos (quando o volume de produção não excede certos limites) ou como um estudo preliminar para um estudo de longo prazo.



**Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil**



有り難う

OBRIGADO



Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil

