



# V – FÓRUM DE ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS 2019

MÉTODOS ALTERNATIVOS DE  
IMUNOTOXICIDADE PARA BIOFÁRMACOS

Prof. Marco Antonio Stephano  
stephano@usp.br

- Introdução
- Aspectos Imunológicos dos Biofármacos
- Uso de Animais nos Ensaio de Comparabilidade de Biofármacos
- Aspectos regulatórios da Imunotoxicidade
- Métodos Gerais de Toxicidade e Antigenicidade
- Métodos alternativos para ensaios de Imunotoxicidade
  - ✓ Peptídeo auto imune
  - ✓ Agregado Protéico
  - ✓ Modulação de citocinas
  - ✓ Antigenicidade
- Conclusão



## INTRODUÇÃO

Os produtos farmacêuticos derivados da biotecnologia (biofarmacêuticos) foram desenvolvidos inicialmente no início dos anos 80.

As preocupações com a segurança surgiram da presença de impurezas e/ou contaminantes. Era preferível contar com processos de purificação para remover impurezas e contaminantes, em vez de estabelecer um programa de testes pré-clínicos para sua qualificação, uma vez que diversos produtos biológicos (insulinas, heparinas, soros e vacinas), no passado apresentavam um alto grau de impurezas.

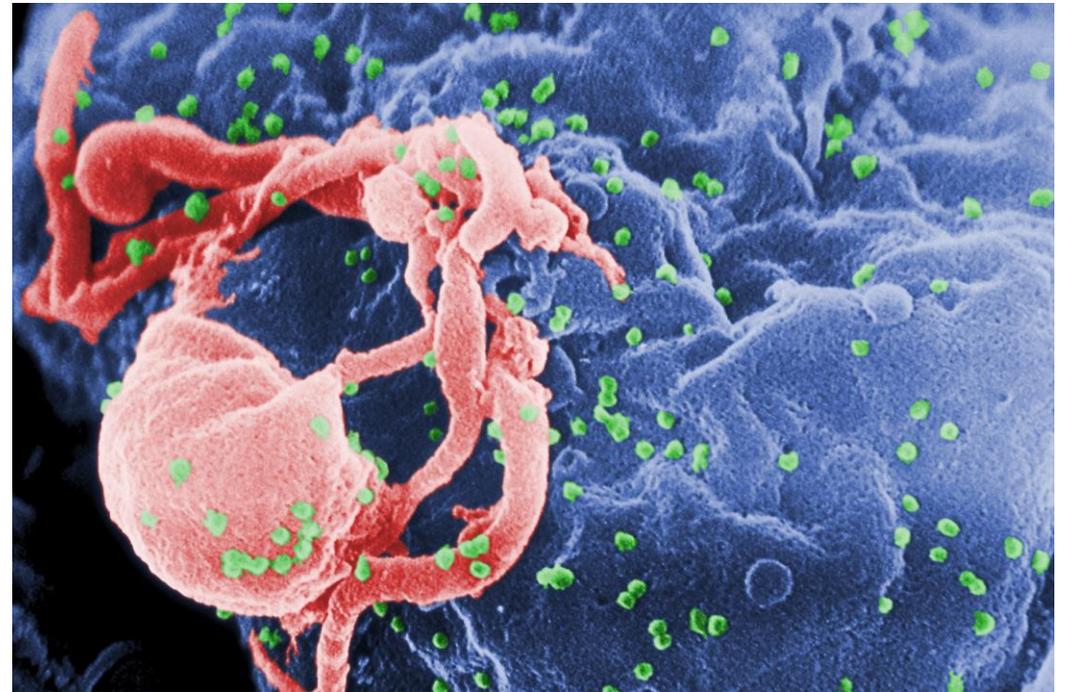


## INTRODUÇÃO

Existem riscos potenciais associados aos contaminantes das células hospedeiras derivadas de bactérias, leveduras, insetos, plantas e células de mamíferos, tais como vírus.

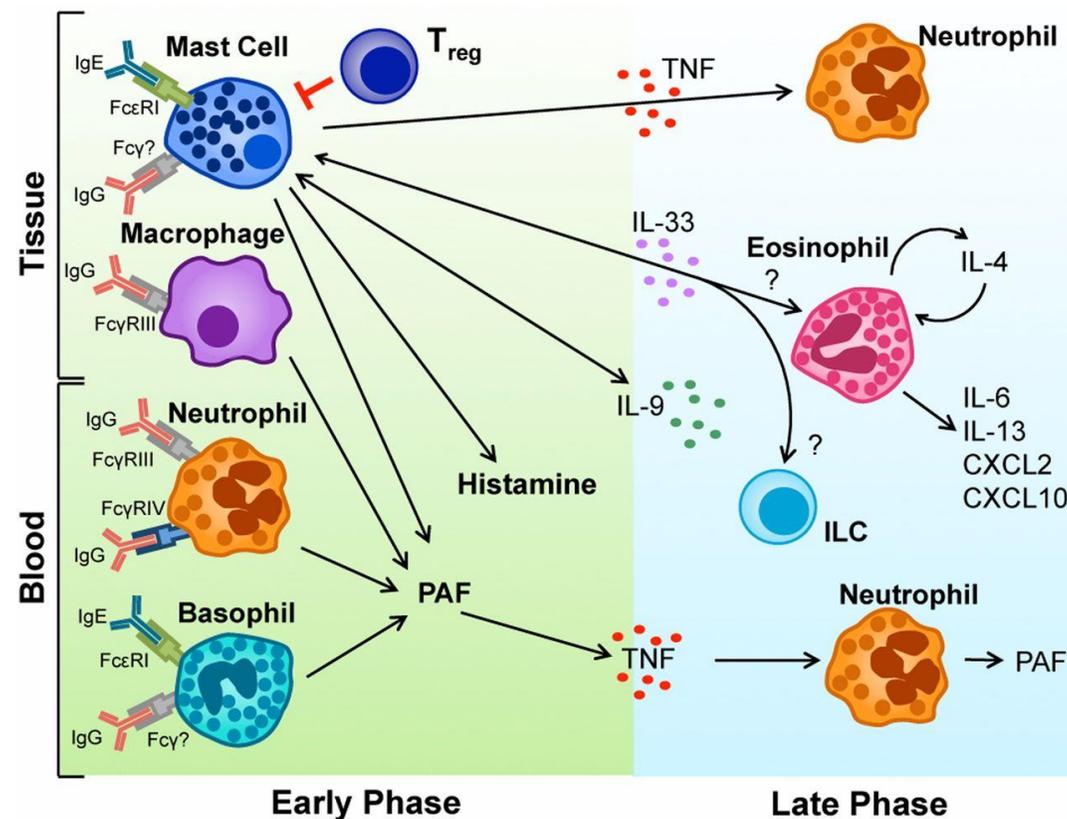
A presença de contaminantes do hospedeiro celular pode resultar em reações alérgicas e outros efeitos imunopatológicos.

Os efeitos adversos associados aos contaminantes de ácidos nucleicos são teóricos, mas incluem uma potencial integração no genoma do hospedeiro



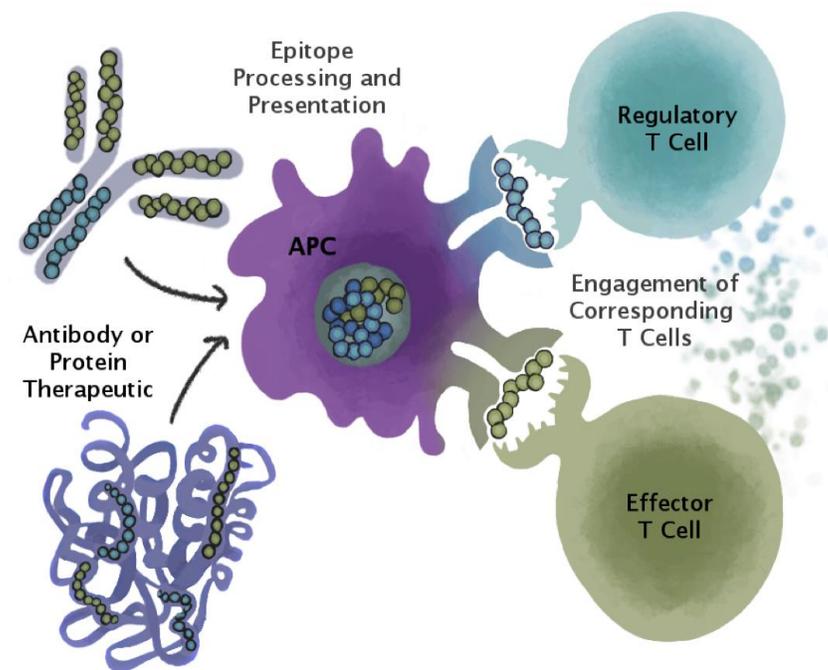
## ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DOS BIOFÁRMACOS

- Respostas imunológicas adversas dificultam severamente a aplicação bem-sucedida de proteínas terapêuticas.
- Um produto biofarmacêutico é imunogênico quando estimula uma resposta imune seguida pela geração de anticorpos que reagem especificamente com o produto.
- A administração repetida a pacientes por um longo período de tempo geralmente aumenta o risco de produzir mais anticorpos contra um biofármaco.



## ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DOS BIOFÁRMACOS

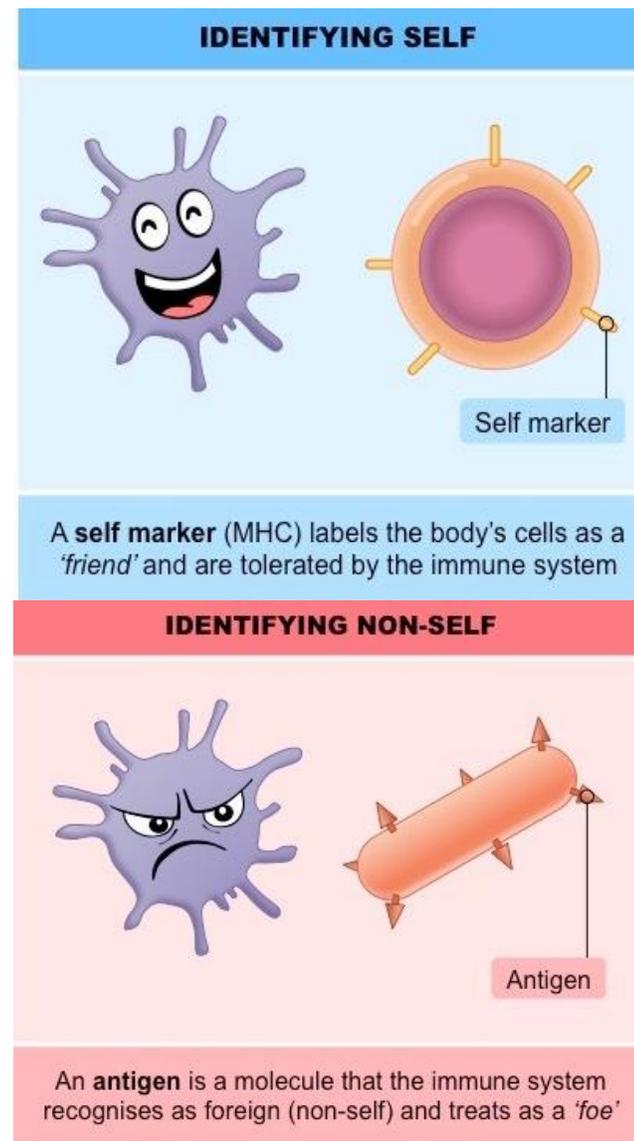
- A imunogenicidade é definida como a capacidade de um composto de provocar uma resposta imune.
- Uma proteína terapêutica pode ser imunogênica porque o sistema imunológico humano a categoriza como não-própria.
- Uma proteína injetada nos pacientes será absorvida pelas células apresentadoras de antígenos.
- As células T geradas no timo são capazes de se ligar aos peptídeos apresentados no complexo de histocompatibilidade na superfície das células apresentadoras de antígenos.



## ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DOS BIOFÁRMACOS

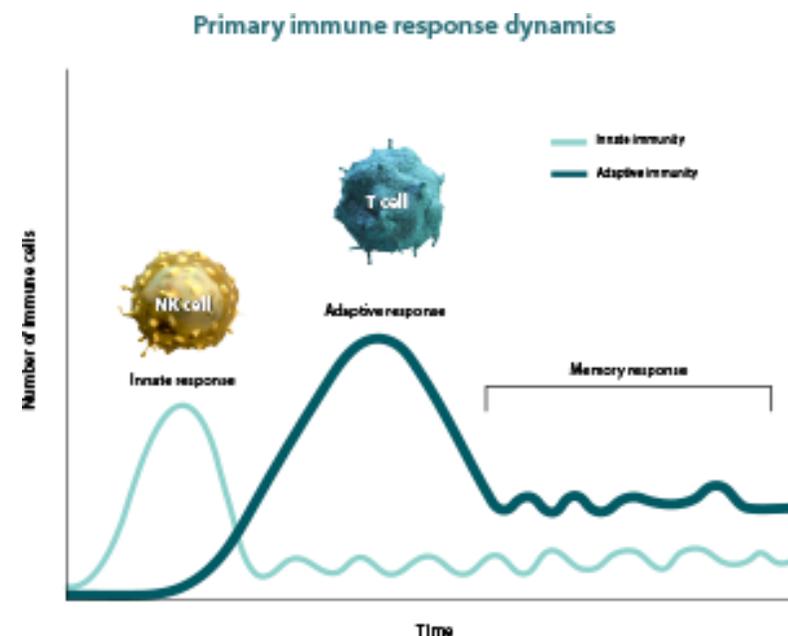
Por outro lado, vertebrados desenvolvem tolerância imunológica a proteínas produzidas por seu próprio organismo (autoproteínas) no início da vida embrionária, a fim de impedir respostas imunes a proteínas endógenas.

Através de um mecanismo chamado seleção negativa, as células T que reagem com autoproteínas sofrem apoptose durante o desenvolvimento no timo antes de poderem completar a maturação.



## ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DOS BIOFÁRMACOS

- Muitos produtos farmacêuticos derivados da biotecnologia destinados ao ser humano são imunogênicos em animais.
- Portanto, a medição de anticorpos associados à administração desses tipos de produtos deve ser realizada ao realizar estudos de toxicidade de dose repetida, a fim de auxiliar na interpretação desses estudos.
- As respostas de anticorpos devem ser caracterizadas (por exemplo, título, número de animais respondentes, neutralizantes ou não neutralizantes), e sua aparência deve ser correlacionada com quaisquer alterações farmacológicas e / ou toxicológicas.



## ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DOS BIOFÁRMACOS

- Na maioria dos casos, a resposta imune aos biofarmacêuticos é variável, como a observada em humanos.
- Se a interpretação dos dados do estudo de segurança não for comprometida por esses problemas, nenhum significado especial deverá ser atribuído à resposta do anticorpo.
- A indução da formação de anticorpos em animais não é preditiva de um potencial para a formação de anticorpos em humanos.



## ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DOS BIOFÁRMACOS

- Os seres humanos podem desenvolver anticorpos séricos contra proteínas humanizadas, e frequentemente a resposta terapêutica persiste em sua presença.
- A ocorrência de respostas anafiláticas graves a proteínas recombinantes é rara em humanos.
- A esse respeito, os resultados dos testes de anafilaxia da cobaia, geralmente positivos para produtos proteicos, não são preditivos de reações em humanos;
- Portanto, esses estudos são considerados de pouco valor para a avaliação rotineira desses tipos de produtos.

## USO DE ANIMAIS NOS ENSAIOS DE COMPARABILIDADE DE BIOFÁRMACOS

- A atividade biológica, juntamente com a espécie e/ou a especificidade do tecido de muitos produtos farmacêuticos derivados da biotecnologia, muitas vezes impede projetos de testes de toxicidade padrão em espécies comumente usadas (por exemplo, ratos, cães e primatas não humano).
- Os programas de avaliação de segurança devem incluir o uso de espécies relevantes.
- Uma espécie relevante é aquela em que o material de teste é farmacologicamente ativo devido à expressão do receptor ou de um epítopo (no caso de anticorpos monoclonais).

## USO DE ANIMAIS NOS ENSAIOS DE COMPARABILIDADE DE BIOFÁRMACOS

- Os programas de avaliação de segurança devem normalmente incluir duas espécies relevantes.
- No entanto, em certos casos justificados, uma espécie relevante pode ser suficiente (por exemplo, quando apenas uma espécie relevante pode ser identificada ou onde a atividade biológica do biofarmacêutico é bem compreendida).
- Além disso, mesmo quando duas espécies podem ser necessárias para caracterizar a toxicidade em estudos de curto prazo, pode ser possível justificar o uso de apenas uma espécie para estudos subsequentes de toxicidade a longo prazo (por exemplo, se o perfil de toxicidade nas duas espécies for comparável no termo curto).

## USO DE ANIMAIS NOS ENSAIOS DE COMPARABILIDADE DE BIOFÁRMACOS

- Os estudos de toxicidade em espécies não relevantes podem ser enganosos e desencorajados.
- Quando não houver espécies relevantes, deve-se considerar o uso de animais transgênicos relevantes que expressam o receptor humano ou o uso de proteínas homólogas.
- As informações obtidas com o uso de um modelo animal transgênico que expressa o receptor humano são otimizadas quando a interação do produto e do receptor humanizado tem consequências fisiológicas semelhantes às esperadas em seres humanos.

## USO DE ANIMAIS NOS ENSAIOS DE COMPARABILIDADE DE BIOFÁRMACOS

- Nos últimos anos, houve muito progresso no desenvolvimento de modelos animais que são considerados semelhantes ao desenvolvimento de doenças humana.
- Esses modelos animais incluem modelos induzidos e espontâneos de doença, nocaute genético (s) e animais transgênicos.
- Esses modelos podem fornecer informações adicionais, não apenas na determinação da ação farmacológica do produto, farmacocinética e dosimetria, mas também podem ser úteis na determinação da segurança (por exemplo, avaliação de promoção indesejável da progressão da doença).
- A justificativa científica para o uso desses modelos animais devem ser fornecida.

## ASPECTOS REGULATÓRIOS DA IMUNOTOXICIDADE

RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 301, DE 21 DE AGOSTO DE 2019 - Dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 36, DE 21 DE AGOSTO DE 2019 - Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação complementares a Insumos e Medicamentos Biológicos.

Não faz nenhuma menção a necessidade de testes Imunogênicos ou de Imunotoxicidade.



## ASPECTOS REGULATÓRIOS DA IMUNOTOXICIDADE

RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº 55, DE 16 DE DEZEMBRO DE 2010 -

Dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências

Item XII definição de imunogenicidade: é a habilidade de uma substância ativar uma resposta ou reação imune, tais como o desenvolvimento de anticorpos específicos, respostas de células T, reações alérgicas ou anafiláticas.

§4º art. 19 A segurança e a imunogenicidade do produto biológico devem estar suficientemente caracterizadas.

Art. 28. Independentemente da via de desenvolvimento utilizada, no ato do protocolo do pedido de registro de um produto biológico novo ou produto biológico, a empresa deverá apresentar relatório do estudo de imunogenicidade.



# ASPECTOS REGULATÓRIOS DA IMUNOTOXICIDADE PORTANTO DA ONDE SAIU A NECESSIDADE DE ENSAIOS DE IMUNOTOXICIDADE?

Members & Observers | Google Tradutor | Immunotoxicity - Pe | Minimizing immuno | Sci-Hub | Minim

ich.org/about/members-observers.html

Apps | Nfe — Nota do Mil... | COMO FAZER AS C... | Google Tradutor

## Members & Observers / About ICH / ↑

### Current Members and Observers

As of November 2018, the ICH Association comprises the following Members and Observers:

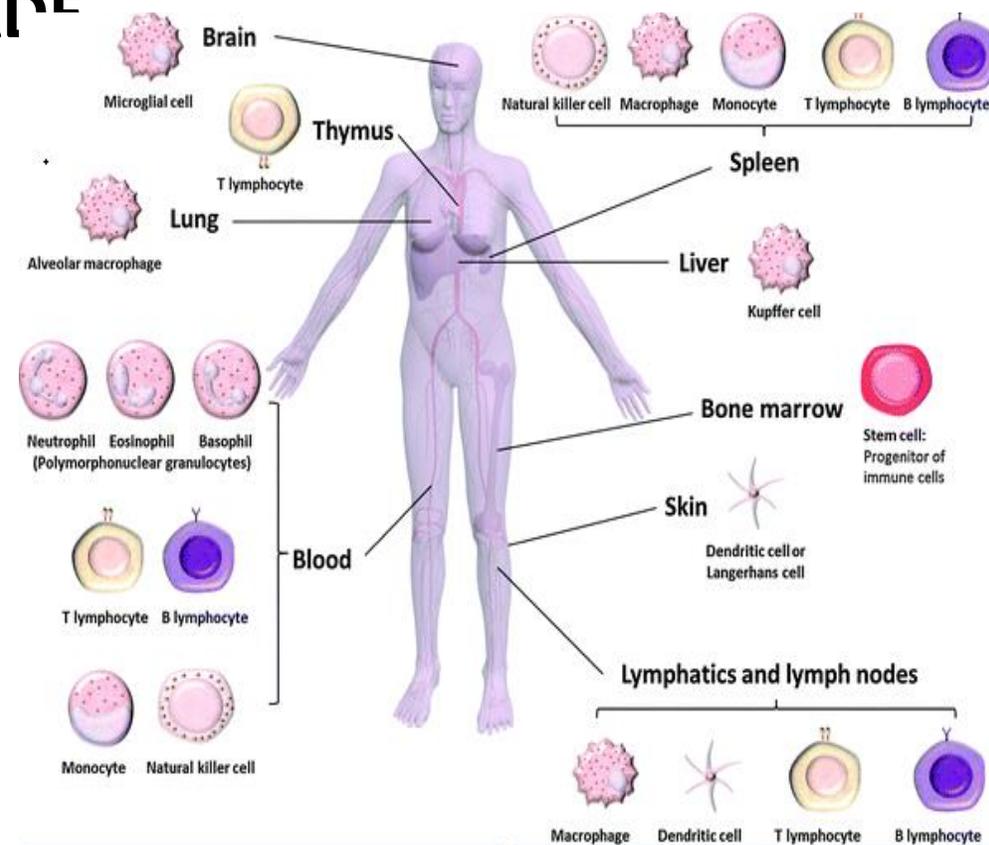
<b>MEMBERS</b> Click here for the list	<b>OBSERVERS</b> Click here for the list
<p><b>Founding Regulatory Members</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ EC, Europe</li> <li>▪ FDA, United States</li> <li>▪ MHLW/PMDA, Japan</li> </ul> <p><b>Founding Industry Members</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ EFPIA</li> <li>▪ JPMA</li> <li>▪ PhRMA</li> </ul> <p><b>Standing Regulatory Members</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Health Canada, Canada</li> <li>▪ Swissmedic, Switzerland</li> </ul> <p><b>Regulatory Members</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ANVISA, Brazil</li> <li>▪ MFDS, Republic of Korea</li> <li>▪ HSA, Singapore</li> <li>▪ NMPA, China</li> <li>▪ TFDA, Chinese Taipei</li> </ul> <p><b>Industry Members</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ BIO</li> <li>▪ Global Self-Care Federation</li> <li>▪ IGBA</li> </ul>	<p><b>Standing Observers</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ IFPMA</li> <li>▪ WHO</li> </ul> <p><b>Legislative or Administrative Authorities</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ANMAT, Argentina</li> <li>▪ CDSCO, India</li> <li>▪ CECMED, Cuba</li> <li>▪ COFEPRIS, Mexico</li> <li>▪ CPED, Israel</li> <li>▪ INVIMA, Colombia</li> <li>▪ JFDA, Jordan</li> <li>▪ MMDA, Moldova</li> <li>▪ National Center, Kazakhstan</li> <li>▪ NPRA, Malaysia</li> <li>▪ NRA, Iran</li> <li>▪ Roszdravnadzor, Russia</li> <li>▪ SAHPRA, South Africa</li> <li>▪ SCDMTE, Armenia</li> <li>▪ SFDA, Saudi Arabia</li> <li>▪ TGA, Australia</li> <li>▪ TITCK, Turkey</li> </ul> <p><b>Regional Harmonisation Initiatives (RHIs)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ APEC</li> <li>▪ ASEAN</li> <li>▪ EAC</li> <li>▪ GHC</li> <li>▪ PANDRH</li> <li>▪ SADC</li> </ul> <p><b>International Pharmaceutical Industry Organisation</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ APIC</li> </ul>

## ASPECTOS REGULATÓRIOS DA IMUNOTOXICIDADE

PRECLINICAL SAFETY EVALUATION OF BIOTECHNOLOGY-DERIVED PHARMACEUTICALS S6(R1) 16/07/1997  
adendo incorporado em junho de 2011

### 4.5 Imunotoxicidade

Muitos produtos farmacêuticos derivados da biotecnologia visam estimular ou suprimir o sistema imunológico e, portanto, podem afetar não apenas a imunidade humoral, mas também mediada por células.



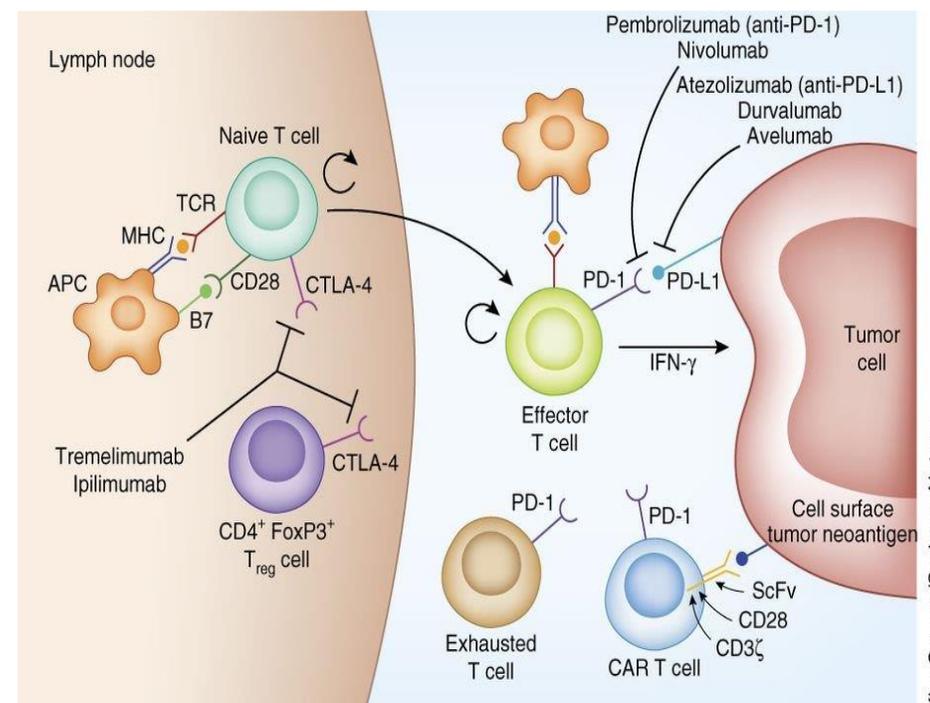
## ASPECTOS REGULATÓRIOS DA IMUNOTOXICIDADE

PRECLINICAL SAFETY EVALUATION OF BIOTECHNOLOGY-DERIVED PHARMACEUTICALS S6(R1) 16/07/1997  
adendo incorporado em junho de 2011

### 4.5 Imunotoxicidade

A expressão de antígenos de superfície nas células-alvo pode ser alterada, o que tem implicações no potencial auto-imune.

Estratégias de testes imunotoxicológicos podem exigir estudos de rastreamento seguidos por estudos mecanismos para esclarecer tais questões.



## ASPECTOS REGULATÓRIOS DA IMUNOTOXICIDADE

ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE NONCLINICAL EVALUATION FOR ANTICANCER PHARMACEUTICALS S9 Current Step 4 version dated 29 October 2009

### 1.3 Scope

... The guideline applies to both small molecule and biotechnology-derived pharmaceuticals (biopharmaceuticals), regardless of the route of administration....

### 2.8 Immunotoxicity

For most anticancer pharmaceuticals, the design components of the general toxicology studies are considered sufficient to evaluate immunotoxic potential and support marketing. For immunomodulatory pharmaceuticals, additional endpoints (such as immunophenotyping by flow cytometry) might be included in the study design.

## Métodos Gerais de Toxicidade e Antigenicidade

PRECLINICAL SAFETY EVALUATION OF BIOTECHNOLOGY-DERIVED PHARMACEUTICALS S6(R1)

16/07/1997 adendo incorporado em junho de 2011

O objetivo dos estudos de farmacologia de segurança deve ser o de revelar quaisquer efeitos funcionais nos principais sistemas fisiológicos (por exemplo, sistemas cardiovascular, respiratório, renal e nervoso central).

As investigações também podem incluir o uso de órgãos isolados ou outros sistemas de teste que não envolvam animais intactos.

Todos esses estudos podem permitir uma explicação mecanicamente baseada em toxicidades específicas de órgãos, que devem ser consideradas cuidadosamente com relação ao uso e indicação (ões) humanos.

## Métodos Gerais de Toxicidade e Antigenicidade

PRECLINICAL SAFETY EVALUATION OF BIOTECHNOLOGY-DERIVED PHARMACEUTICALS S6(R1)

16/07/1997 adendo incorporado em junho de 2011.

- Farmacocinética e Toxicocinética
- Metabolismo
- Estudo de Toxicidade em dose única
- Estudo de toxicidade em dose repetida
- **Estudo de Imunotoxicidade**

## Métodos Gerais de Toxicidade e Antigenicidade

### PRECLINICAL SAFETY EVALUATION OF BIOTECHNOLOGY-DERIVED PHARMACEUTICALS S6(R1)

16/07/1997 adendo incorporado em junho de 2011.

- Estudos de desempenho reprodutivo e toxicidade no desenvolvimento - Método OECD TG 421 - Teste de triagem para toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento; Método OECD TG 422 - Estudo de toxicidade repetida combinado com teste de toxicidade reprodutiva; e
- Estudo de Genotoxicidade - Método OECD TG 487 - Teste do Micronúcleo em Célula de Mamífero *in vitro*
- **Estudo de Carcinogenicidade**
- Estudo de Tolerância Local - Método OECD TG 429 - Sensibilização Cutânea: Ensaio do Linfonodo Local; e Método OECD TG 442A e 442B - Versões não radioativas do Ensaio do Linfonodo Local.

## LOGO É CONSIDERADO IMUNOTOXICIDADE

- Um estudo de imunogenicidade , porém não é apenas um ensaio de antígeno - anticorpo, mas um estudo complexo que envolve a quebra da tolerância aos próprios antígenos (self-antigens);
- Também consiste em verificar a antigenicidade, ou produção de anticorpos à epítopos de diferentes sequências tanto do material de referência como do material a ser comparado;
- Consiste determinar o desequilíbrio das concentrações de citocinas do sistema imunológico desencadeando respostas inflamatórias graves.
- Determinação de agregados proteicos (super antígenos – liberação de IL-1) atividade pirogênica.

## Classificação Fisiopatológica

## Classificação Imunotxicológica

### Tipo $\alpha$

- Altos níveis de citocinas  
(\*administração de citocinas (aumento farmacológico primário))
- Liberação de citocinas

Imunoestimulação adversa

### Tipo $\beta$

Imunogenicidade (resposta imune contra o biofármaco)

- Hipersensibilidade (alergia ao medicamento) incluindo tipo IV (mediada por célula T)
- Anticorpos neutralizantes ou não neutralizantes contra anticorpos anti medicamentos

Hipersensibilidade

Imunogenicidade

### Tipo $\gamma$

Desvio Imunológico

- Imunossupressão, Imunodeficiência
- Desequilíbrio ou aprimoramento imunológico  
Autoimunidade  
Exacerbação da atopia existente  
Indução a atopia

Imunossupressão

Autoimunidade



# MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA ENSAIOS DE IMUNOTOXICIDADE

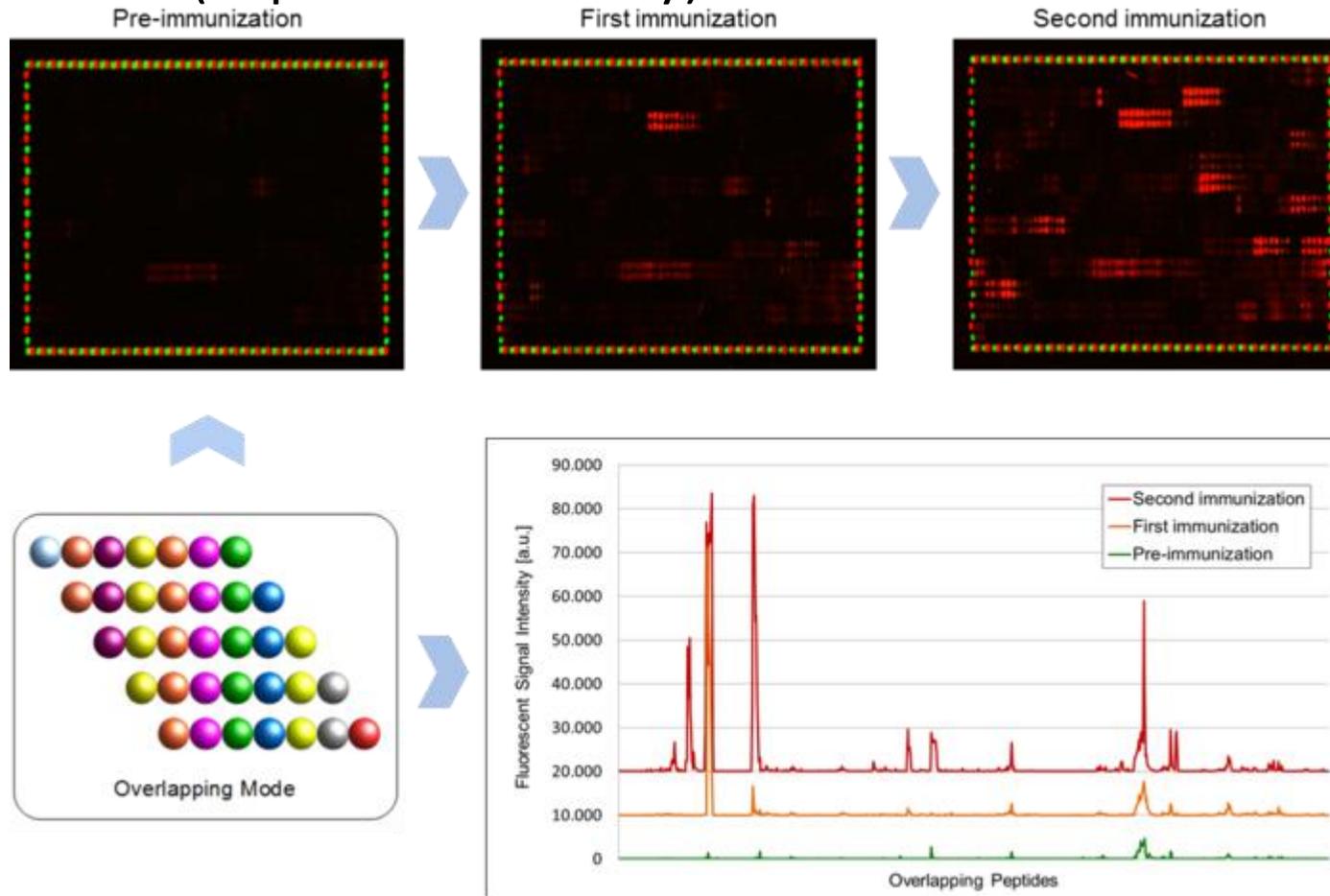
## DOENÇAS AUTOIMUNES (Principais)

- Lúpus Eritematoso Sistémico (LES)
- Síndrome de Sjögren
- Síndrome Antifosfolípidos
- Doença de Behçet
- Esclerodermias
- Artrite Reumatóide
- Artrite Psoriática
- Psoríase
- Espondilite Anquilosante
- Polimiosite e Dermatomiosite
- Vasculites (Grandes Vasos-Arterite de Células Gigantes ou temporal; arterite de Takayasu); Médios Vasos-Poliarterite Nodosa (PAN); Doença de Kawasaki)
- Sarcoidose
- Miastenia Gravis
- Vitiligo
- Esclerose Múltipla
- Doença de Crohn
- Anemia Hemolítica
- Granulomatose de Wegener
- Doença Celíaca
- Hepatite Auto-Imune
- Púrpura (Auto-Imune e Trombocitopénica Idiopática)
- Tiroidite de Hashimoto



## MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA ENSAIOS DE IMUNOTOXICIDADE

### Peptídeo auto imune (Peptide Microarray)





- trato urogenital
- sangue (por exemplo, síndrome antifosfolípide)
- sistema cardiovascular
- sistema nervoso central (por exemplo, esclerose múltipla)
- sistema endócrino (por exemplo, diabetes mellitus)
- sistema exócrino (por exemplo, síndrome de Sjögren)
- olhos, nariz e garganta
- trato gastrointestinal (por exemplo, doença de Crohn)
- sistema músculo-esquelético (por exemplo, artrite reumatóide)
- Sistema nervoso periférico
- Pele e tecido conjuntivo (por exemplo, vitiligo)
- doença auto-imune sistêmica (por exemplo, lúpus eritematoso sistêmico)

<https://www.pepperprint.com/>

# MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA ENSAIOS DE IMUNOTOXICIDADE AGREGADO PROTEÍCOS

Agregados proteicos podem ocorrer por vários motivos, entre eles:

- pH da solução (mudança das características iônicas)
- Exposição de sítios hidrofóbicos durante o *refolding*
- Presença de traços da membrana fosfolipídica da célula de origem (eucariota)
- Presença de LPS da célula de origem (procariota gram - )
- Presença de oligossacarídeos

Forma de detecção

Cromatografia

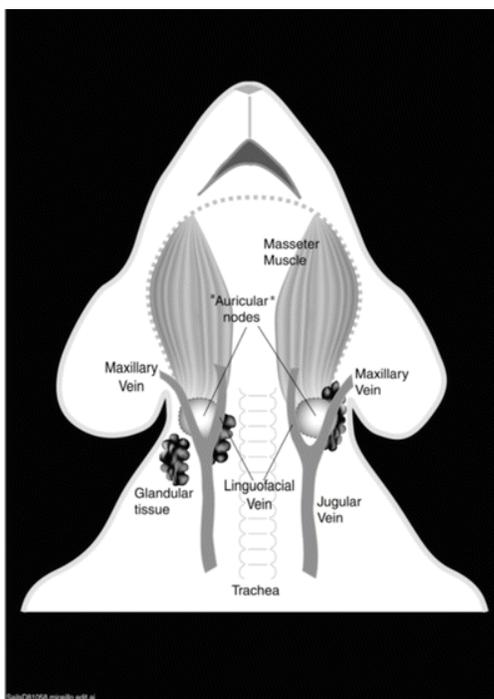
- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) – c/ coluna de fracionamento molecular (até 60kDa)
- Cromatografia Líquida e Fluxo Eficiente (FPLC) – coluna com fase fixa de acrilamida ou mista para moléculas maiores que 60kDa.
- Ensaio de ativação em monócito humano (MAT) – liberação de IL-1 e IL-6.

# MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA ENSAIOS DE IMUNOTOXICIDADE

## MODULAÇÃO DE CITOCINAS

### 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 .



# MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA ENSAIOS DE IMUNOTOXICIDADE

## MODULAÇÃO DE CITOCINAS

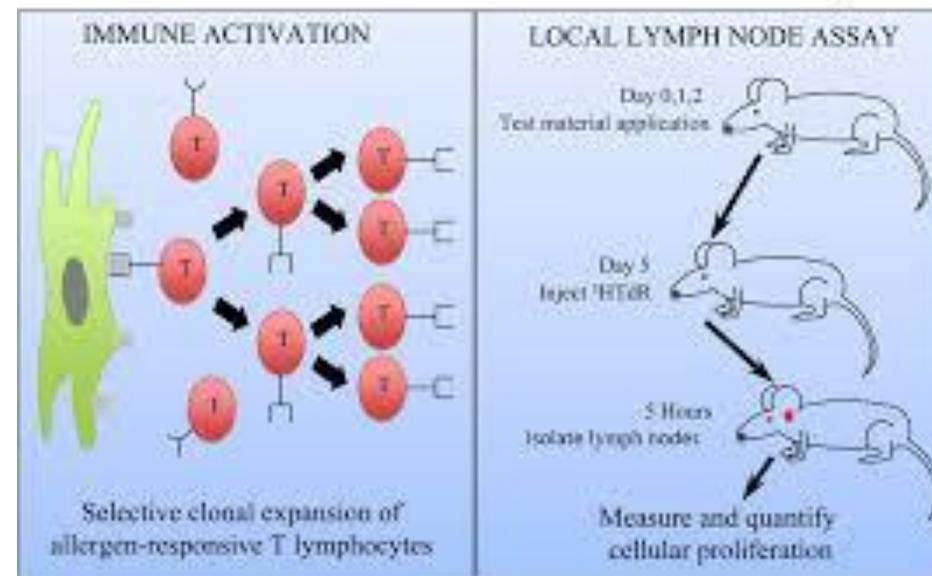
### Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas - 429

#### 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)

#### The mouse local lymph node assay (LLNA)





# MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA ENSAIOS DE IMUNOTOXICIDADE

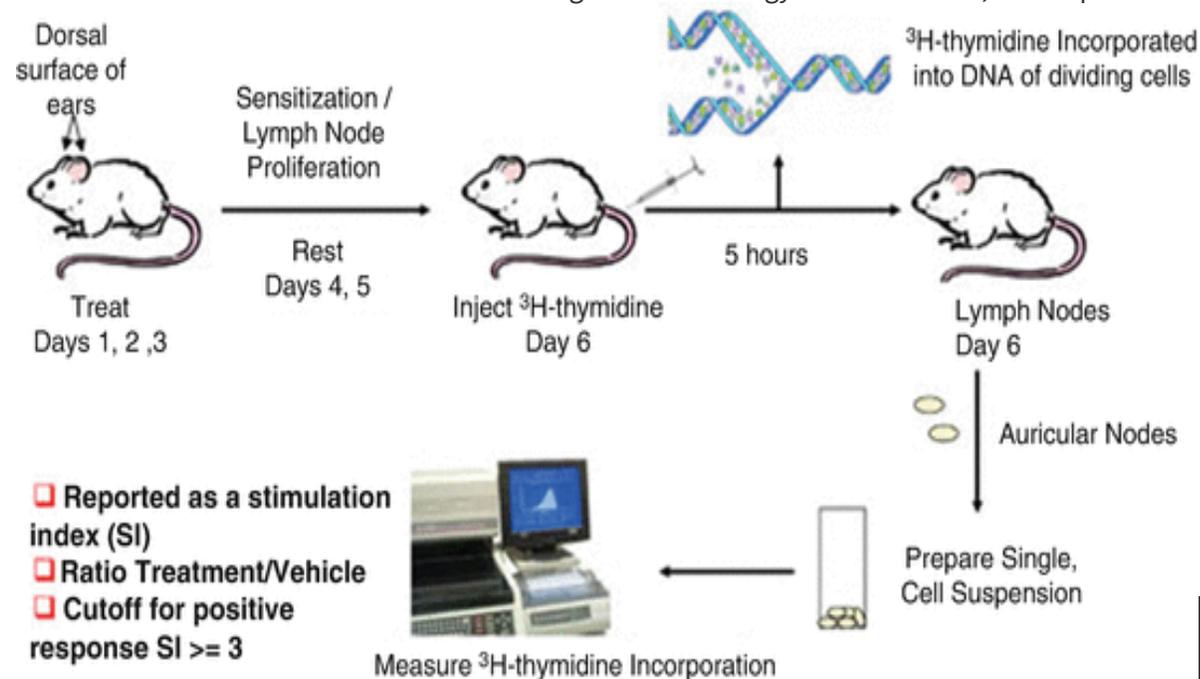
## MODULAÇÃO DE CITOCINAS

### 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 PARA ENSAIOS DE IMUNOTOXICIDADE

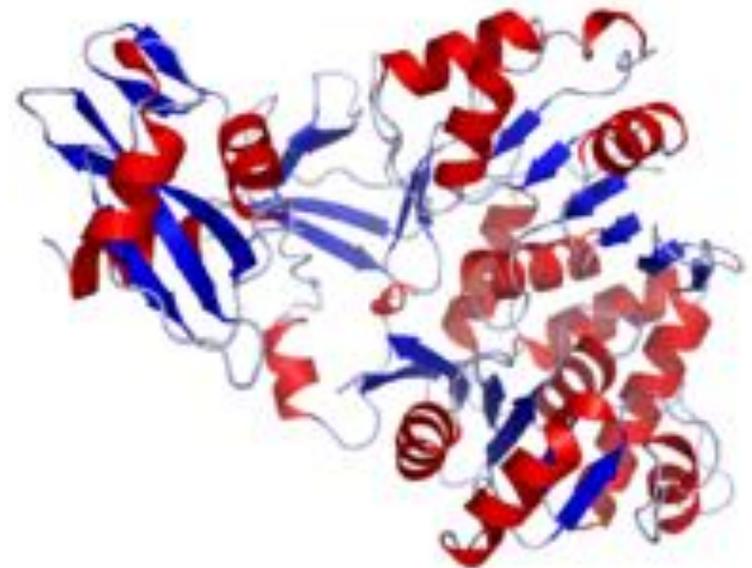
## MODULAÇÃO DE CITOCINAS

**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 PARA ENSAIOS DE IMUNOTOXICIDADE

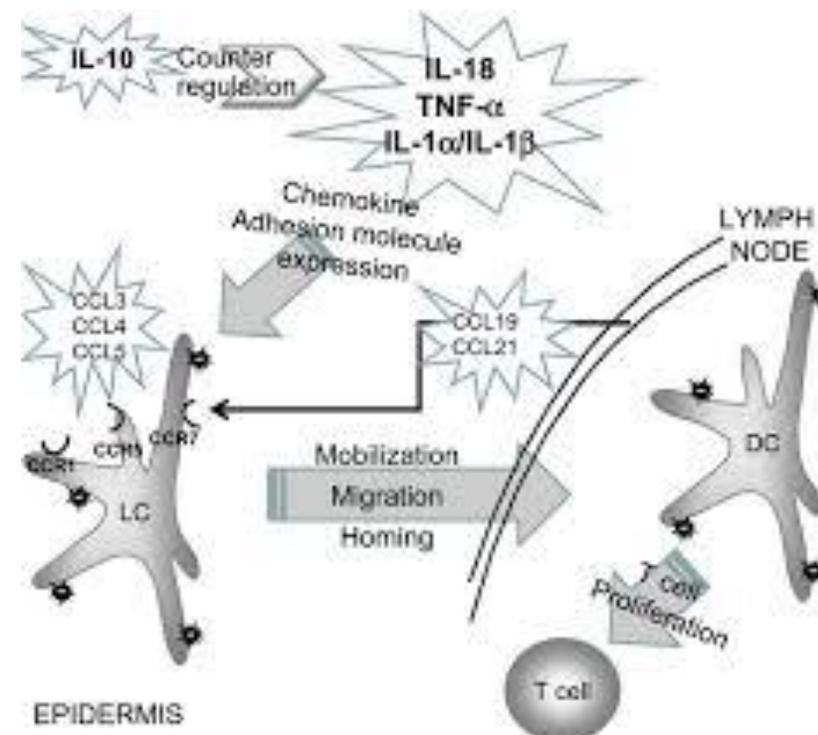
## MODULAÇÃO DE CITOCINAS

**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 PARA ENSAIOS DE IMUNOTOXICIDADE

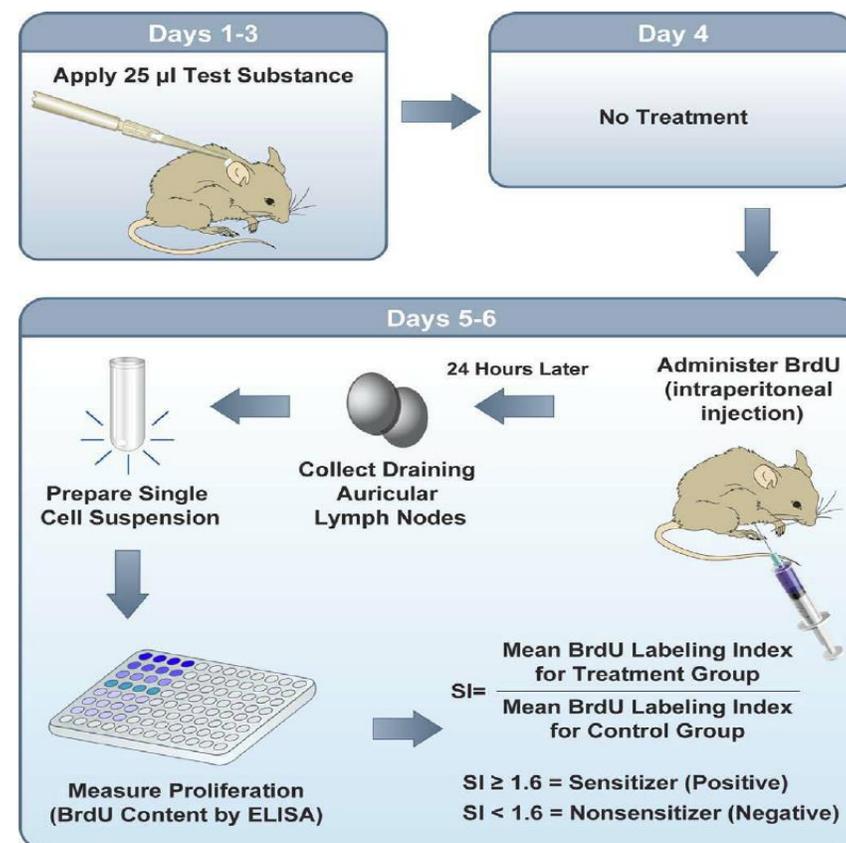
## MODULAÇÃO DE CITOCINAS

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 PARA ENSAIOS DE IMUNOTOXICIDADE

## MODULAÇÃO DE CITOCINAS

**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:

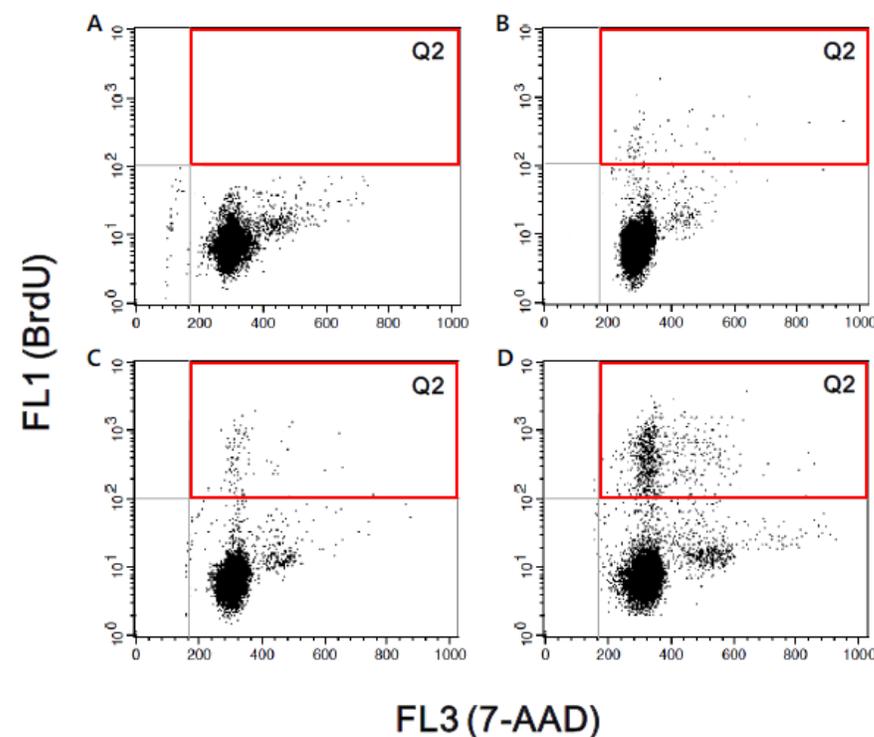
- O ensaio de gânglio linfático local: BrdU-ELISA;
- O ensaio de gânglio linfático local: BrdU-FCM;

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 PARA ENSAIOS DE IMUNOTOXICIDADE ANTIGENICIDADE

- Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas – 429 Sensibilização cutânea: ensaio do gânglio linfático local.
- Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas – 442A Sensibilização cutânea: ensaio dos gânglios linfáticos locais: DA
- Diretrizes OECD para teste de substâncias químicas – 442B Ensaio de gânglio linfático local: BRDU-ELISA

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)



## CONCLUSÃO

- Atualmente os ensaios de imunotoxicidade são recomendados somente para produtos que atuam como imunomoduladores e para o tratamento de câncer (citocinas, antagonista de citocinas e monoclonais para câncer.
- Ensaio Alternativos (em relevância aos 3Rs) da OECD podem ser aplicados para estudos de imunotoxicidade, porém são preditivos e em caso de resultados negativos, ensaios mais complexos deverão ser utilizados.
- Não existe nenhum ensaio que assegure que um medicamento não leve a uma síndrome autoimune. Sistemas “in vitro” e “in vivo” podem não ser o mesmo nos ensaios clínicos. Porém também serão preditivos em caso de resultado negativo.

