CAMILA BRAGGION

O uso do *Caenorhabditis elegans* como modelo alternativo para avaliação da toxicidade de ingredientes cosméticos

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina para obtenção do título de Doutor em ciências

São Paulo

2022

CAMILA BRAGGION

O uso do *Caenorhabditis elegans* como modelo alternativo para avaliação da toxicidade de ingredientes cosméticos

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina para obtenção do título de Doutor em ciências

Orientadora: Profª Dra Jane Zveiter de Moraes

São Paulo

2022

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Antonio Rubino de Azevedo,
Campus São Paulo da Universidade Federal de São Paulo, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Braggion, Camila
O uso do Caenorhabditis elegans como modelo alternativo para avaliação da toxicidade de ingredientes cosméticos / Camila Braggion. - São Paulo, 2022.
XVI, 82f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Pós graduação em Biologia Molecular.

Título em inglês: Use of Caenorhabditis elegans as an alternative model for evaluating the toxicity of cosmetic ingredients..

1. C.elegans. 2. Ingredientes cosméticos. 3. Toxicidade.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA

Chefe do Departamento de Biofísica: Prof. Dr. Ronaldo de Carvalho Araújo

Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular:

Profa. Dra. Marimélia Aparecida Porcionatto

CAMILA BRAGGION

O USO DO *CAENORHABDITIS ELEGANS* COMO MODELO ALTERNATIVO PARA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE INGREDIENTES COSMÉTICOS

Presidente da Banca: Profa. Dra. Jane Zveiter de Moraes

BANCA EXAMINADORA

Titulares:

Profa. Dra. Fernanda Marques da Cunha
Prof. Dr. José Mauro Granjeiro
Dr. Octávio Augusto França Presgrave
Dra. Carolina Bellini Parise

Suplentes:

Dra. Vanessa de Moura Sá Rocha
Prof. Dr. Ronaldo de Carvalho Araújo

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Cintya e Vlamir, meu irmão Matheus e meu esposo Rafael, por todo o apoio nos momentos mais difíceis, pelos conselhos, e por sempre me incentivarem a seguir meus sonhos e minha carreira. Sem vocês com toda a certeza seria bem mais difícil.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Jane Zveiter de Moraes, por ter me orientado desde a iniciação científica até essa tese de doutorado, sempre prezando além dos ensinamentos, amizade, confiança, paciência, dedicação e incentivo, tendo se tornado mais que uma orientadora e sim uma amiga.

Ao pessoal do laboratório: Tábata, Tauane, Enzo, Juliana, minhas eternas IC's Marina, Letícia, Fernanda e Luciana, pelo companheirismo, amizade e ajuda em diversas ocasiões.

Ao Rodrigo e Carol pela paciência e parceria nos ensinamentos dos experimentos e pelo exemplo de profissional, além da amizade.

À Gabriela e Bárbara, pela amizade incrível, pelos almoços longos e cheios de discussões incansáveis sobre ciência e várias outras coisas, pelo apoio nos experimentos, por dividirem as várias xicaras de café durante o dia, e por se tornarem tão especiais.

Aos pós-graduandos do departamento de Biofísica: Lucas, Thiago, Jéssica, Rolf, Laís, Annielle, Elias, Luciana e Luísa, por todo o momento de descontração e conversas científicas durante o proceder do trabalho, empréstimo de reagentes e sugestões.

Aos funcionários do departamento de Biofísica: Carlos, Fernandes, Ilza, Eduardo e Emanuel pela amizade, auxílio burocrático e apoio em todos os momentos.

Aos professores do departamento de Biofísica, em especial a Profa. Maria Aparecida Juliano, Prof. Manoel A. Miranda, Prof. Emerson Silva e Prof. Marcelo Marcondes, que colaboraram com o enriquecimento da minha formação profissional e pessoal.

À Profa. Fernanda Marques da Cunha (UNIFESP) e ao Prof. Marcelo Mori (UNICAMP), que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao CNPQ pela bolsa de doutorado.

À FAPESP pela aquisição de insumos.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS ---------- xii

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS ---------- xiii

RESUMO---------- xv

ABSTRACT----------xvi

1 INTRODUÇÃO----------1

1.1 Dermatites de contato----------1

1.1.1 Dermatite de contato irritante (DCI) ----------2

1.1.2 Dermatite de contato Alérgica (DCA) ----------2

1.2 A proibição de testes em animais e a busca por métodos alternativos ----------3

1.2.1 Via de Desfecho Adverso (do inglês *Adverse Outcome Pathway*, AOP) ----------6

1.3 Resultados anteriores do grupo ----------7

1.4 Modelos mamíferos x modelos alternativos ----------8

1.5 *Caenorhabditis elegans (C. elegans).* ----------9

1.5.1 Estrutura da epiderme do *C. elegans*----------11

1.5.3 Vias de sinalização ----------13

1.5.3.1 p38 PMK-1 MAPK ----------14

1.5.3.2 JNK-1 ----------15

1.5.3.3 TGF-β ----------15

1.5.3.4 *Insulin-IGF* (IIGF) ----------16

1.5.4 *C. elegans* como método alternativo----------17

2 OBJETIVOS ----------19

2.1 Geral ----------19

2.2 Específicos ----------19

3 MATERIAIS E MÉTODOS ----------20

3.1 Materiais ---- 20

3.1.1 Cepas e linhagens ---- 20

3.1.2 Bactéria ---- 21

3.1.3 Químicos ---- 21

3.1.4 Soluções e tampões ---- 21

3.1.5 Reagentes ---- 22

3.1.6 *Primers* ---- 22

3.1.7 Equipamentos ---- 22

3.2 Métodos ---- 23

3.2.1 Preparo das soluções dos químicos ---- 23

3.2.2 Cultura de *C. elegans* ---- 23

3.2.3 Sincronização dos vermes ---- 24

3.2.4 Curva de Crescimento das linhagens ---- 24

3.2.5 Estabelecimento da DL50 (Dose Letal de 50%) ---- 25

3.2.6 Testes de comportamento ---- 25

3.2.6.1 Ensaio de longevidade ---- 25

3.2.6.2 Postura e Viabilidade de ovos ---- 25

3.2.6.3 Bombeamento de Faringe ---- 26

3.2.7 Avaliação da emissão de fluorescência das linhagens geneticamente modificadas quando expostas aos químicos ---- 26

3.2.7.1 Padronização do tempo de exposição dos vermes aos químicos ---- 26

3.2.7.2 Análise por microscopia de fluorescência ---- 26

3.2.7.2.1 Análise das imagens ---- 27

3.2.8 Análise de expressão dos genes alvos avaliados ---- 27

3.2.8.1 Extração de RNA ---- 27

3.2.8.2 Síntese de cDNA e RealTime PCR ---- 28

4.RESULTADOS ---- 29

4.1 Determinação da concentração responsável por 50% de letalidade (DL50). ---------- 29

4.2 Testes de Comportamento ---------- 31

4.2.1. Sobrevivência ---------- 31

4.2.2. Postagem e viabilidade de ovos ---------- 32

4.2.3. Bombeamento de Faringe ---------- 34

4.3 Teste para avaliação da ativação de proteínas relacionadas com injúria cutânea ------ 35

4.3.1 Curva de crescimento das linhagens geneticamente modificadas ---------- 35

4.3.2 Determinação da DL50 de agentes químicos para as linhagens geneticamente modificadas. ---------- 36

4.3.3 Avaliação do melhor tempo de exposição do verme aos químicos ---------- 37

4.3.4 Análise da ativação do promotor de SKN-1 (*gst-4*) e de NLP-29 por microscopia de fluorescência. ---------- 39

4.4 Análise da expressão gênica da via de sinalização p38 PMK1-MAPK. ---------- 42

5 DISCUSSÃO ---------- 47

6 CONCLUSÃO ---------- 56

7 REFERENCIAS ---------- 57

MATERIAL SUPLEMENTAR ---------- 64

ANEXO I – Aprovação da Comissão Interna de Biossegurança ---------- 65

ANEXO II – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa ---------- 66

ANEXO III - Publicações no período. ---------- 67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Via de Desfecho Adverso (AOP) para Sensibilização Cutânea e os testes validados e aprovados.

Figura 2: Uso de modelos alternativos x animais de 1990 a 2015.

Figura 3: Ciclo de Vida *C. elegans.*

Figura 4: Comparação entre a pele de mamíferos e a cutícula de *C. elegans.*

Figura 5: Representação esquemática das vias de sinalização ativadas frente à injúria cutânea em *C. elegans.*

Figura 6: Ensaio de Expectativa de vida.

Figura 7: Ensaio de Postagem e Viabilidade dos ovos.

Figura 8: Ensaio de Bombeamento de Faringe.

Figura 9: Curvas de crescimento.

Figura 10: Avaliação do melhor tempo de exposição das linhagens geneticamente modificadas aos químicos.

Figura 11: Análise da ativação do promotor de SKN-1 (gst-4) e de NLP-29 por microscopia de fluorescência.

Figura 12: Análise da expressão gênica da via de sinalização p38 PMK1-MAPK

Figura S1: Análise da expressão gênica da via de sinalização p38 PMK1-MAPK

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Linhagens utilizadas para o desenvolvimento do trabalho.

Tabela 2: Primers utilizados nos ensaios de *RealTime* PCR.

Tabela 3: Determinação da DL50 de agentes químicos para a linhagem selvagem N2 Bristol.

Tabela 4: Determinação da DL50 do químico DMSO para as linhagens geneticamente modificadas.

Tabela 5: Determinação da DL50 do químico H_2O_2 para as linhagens geneticamente modificadas.

Tabela 6: Determinação da DL50 do químico DNCB para as linhagens geneticamente modificadas.

Tabela 7: Determinação da DL50 do químico FA para as linhagens geneticamente modificadas.

Tabela 8: Determinação da DL50 do químico 2MBT para as linhagens geneticamente modificadas.

Tabela 9: Determinação da DL50 do químico EU para as linhagens geneticamente modificadas.

Tabela 10: Determinação da DL50 do químico PROP para as linhagens geneticamente modificadas.

Tabela 11: Compilação dos Resultados

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPs – do inglês, *Antimicrobial Peptides*

ARE – do inglês, *Antioxidant Response Elements*

AOP - do inglês, *Adverse Outcome Pathway*

BMP5 - do inglês, *Bone Morphogenetic Protein 5*

cDNA – do inglês, Complementary *Deoxyribonucleic Acid*

CLs - Células de Langherans

CONCEA - Conselho Nacional de experimentação Animal

CD86 – do inglês, *Cluster of Differentiation 86*

CD54 – do inglês, *Cluster of Differentiation 54*

DA – Abordagem Definida

DC - Dermatite de contato

DCA - Dermatite de contato alérgica

DCI – Dermatite de contato Irritante

DPRA – do inglês, *Direct Peptide Reactivity Assay*

DMSO - Dimetilsufóxido

DNCB – Dinitroclorobenzeno

EU - Eugenol

FA - Formaldeído

FOXO – do inglês, *Forkhead Box Protein*

FUdr - Fluoxiuridina

GFP – do inglês, *Green Fluorescent Protein*

H_2O_2 – Peróxido de Hidrogênio

IL – Interleucina

JNK (do inglês, *c-Jun N-terminal Kinase*)

HaCaT - linhagem imortalizada de células aderentes de queratinócitos humanos

h-CLAT – do inglês, *human cell line activation test*

LLNA - do inglês *Local Lymph Node Assay*

LC50 – Concentração Letal de 50%

TGF-β - do inglês, *Transforming Growth Factor β*

THP-1 – Linhagem Mielomonocítica Aguda

MAPK *(Mitogen-Activated Protein Kinase)*

MHC – do inglês, *Major Histocompatibility Complex*

RN – Resolução Normativa

RNAm – Ácido Ribonucleico Mensageiro

RT- qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real

Keap1 – do inglês, *Kelch-like ECH associated protein*

NGM – do inglês, *Nematode Growth Medium*

Nrf2 – do inglês, *Nuclear Factor E2–Related Factor 2*

NLPs - do inglês, *neuropeptide-like proteins*

OECD - Organização para o Desenvolvimento e Cooperação Econômica

PROP **-** Isopropanol

2-MBT - β-Mercaptobenzotiazol

RESUMO

Braggion, C. *O uso do Caenorhabditis elegans como modelo alternativo para avaliação da toxicidade de ingredientes cosméticos.* São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2022.

Testes em animais preditivos de toxicidade de ingredientes cosméticos estão proibidos no Brasil desde 2013. Assim, nos últimos anos, houve uma busca intensa pelo desenvolvimento de testes alternativos. Considerando as questões de segurança envolvidas e a complexidade da classificação de um agente químico como tóxico, propusemos avaliar a utilidade do nematóide *C. elegans* na detecção de toxicidade de ingredientes cosméticos. Para tanto, linhagens selvagem e geneticamente modificadas do verme foram expostas a cinco substâncias químicas de potencial tóxico conhecido e classificadas como irritante ou sensibilizadores extremo, forte, moderado e fraco. Foram determinadas as concentrações de cada químico responsáveis por 50% de letalidade do verme para a realização de ensaios comportamentais, bem como para as análises de expressão de alguns genes envolvidos na resposta à injúria cutânea. Os testes de comportamento fertilidade e sobrevivência do verme detectaram a toxicidade de ingredientes cosméticos sensibilizadores avaliados no estudo. A avaliação do bombeamento faríngeo detectou o potencial tóxico dos sensibilizadores. A exposição de *C. elegans* a todos os ingredientes cosméticos avaliados no estudo levou à ativação do peptídeo antimicrobiano NLP-29. No conjunto, a análise de expressão dos genes pesquisados detectou a toxicidade apenas dos sensibilizadores extremo e forte. Nossos resultados até aqui são promissores e sinalizam para a utilidade do modelo *C. elegans* na testagem de ingredientes cosméticos.

Palavras-chave: toxicologia, *C. elegans*, ingredientes cosméticos.

ABSTRACT

Braggion, C. *Use of Caenorhabditis elegans as an alternative model for evaluating the toxicity of cosmetic ingredients*. São Paulo: Federal University of São Paulo; 2022.

Animal testing to predict the toxicity of cosmetic ingredients has been banned in Brazil since 2013. Thus, in recent years, there has been an intense search for the development of alternative tests. Considering the safety issues involved and the complexity of classifying a chemical agent as toxic, we proposed to evaluate the utility of the nematode *C. elegans* in the detection of toxicity of cosmetic ingredients. For this purpose, wild and genetically modified strains of the worm were exposed to five chemical substances of known toxic potential and classified as irritant or sensitizers extreme, strong, moderate, and weak. The concentrations of each chemical responsible for 50% lethality of the worm were determined for the performance of behavioral assays, as well as for the analysis of the expression of some genes involved in the response to skin injury. Worm survival and fertility behavior tests detected the toxicity of sensitizing cosmetic ingredients evaluated in the study. The evaluation of pharyngeal pumping detected the toxic potential of the sensitizers. Exposure of *C. elegans* to all cosmetic ingredients evaluated in the study led to activation of the antimicrobial peptide NLP-29. Altogether, the expression analysis of the searched genes detected the toxicity of only the extreme and strong sensitizers. Our results so far are promising and point to the usefulness of the *C. elegans* model in the testing of cosmetic ingredients.

Keywords: toxicology*, C. elegans*, cosmetic ingredients.

1 INTRODUÇÃO

Para contextualizar a proposta do nosso trabalho, iniciamos o presente capítulo apresentando a fisiopatologia das dermatites de contato (DC), os marcos da história da proibição dos testes em animais em ensino e pesquisa e da busca por métodos alternativos ao uso de animais.

1.1 Dermatites de contato

Células e moléculas da matriz extracelular compõem as diversas camadas da pele, nossa primeira barreira de proteção, e, em conjunto, atuam como vigias do sistema imunológico por participarem de mecanismos essenciais no controle contra infecções. Alguns compostos químicos quando penetram a pele são imunotóxicos e, assim, capazes de iniciar, promover ou exacerbar uma resposta imune que pode agravar-se em alguns indivíduos (Welsch, *et al.,* 2017; Kimber, *et al.,* 2011).

Os ingredientes químicos de produtos cosméticos podem, portanto, induzir um processo de irritação e/ou sensibilização da pele levando à uma reação inflamatória conhecida como dermatite de contato (DC), que é considerada um importante problema de saúde ambiental e ocupacional, representando 90 a 95% das doenças cutâneas ocupacionais (Zirwas, *et al*., 2018; Peiser, *et al.,* 2012; Kimber, *et al.,* 2011; dos Santos, *et al.,* 2009; Megherbi, *et al.,* 2009).

A DC pode ser observada em qualquer idade e a prevalência estimada varia de 1,7% a 6,3%, sendo a ocupação profissional o fator de risco mais importante para o seu desenvolvimento (Elmas, 2019). A DC pode ser classificada como irritante (DCI) ou alérgica (DCA), que são de difícil distinção clínica e/ou histopatológica. A diferença entre ambas é que a DCI é uma resposta imune inata e, portanto, inespecífica e menos grave (Usatine, *et al*., 2010). Já a DCA é uma hipersensibilidade do tipo tardia que provoca uma resposta imune adaptativa, portanto, potencialmente mais grave (Aquino e Rosner, 2019; Welsch, *et al.,* 2017; Hamann, *et al.,* 2017; Bonneville, *et al.,* 2007; Levin e Maibach, 2002).

1.1.1 Dermatite de contato irritante (DCI)

A DCI é o resultado da ativação da imunidade inata frente a danos diretos da pele. Cerca de 80% das dermatites ocupacionais são DCI. A substância irritante causa uma reação inflamatória quando aplicada em concentração e por um intervalo de tempo suficientes para causar o dano. Sua forma aguda aparece logo após a exposição, portanto, não depende de uma sensibilização prévia para ocorrer (Slodownik, *et al.,* 2008; Rosmaninho, *et al.,* 2016).

O comprometimento da barreira cutânea, as alterações celulares epidérmicas e a liberação de mediadores pró-inflamatórios, como IL-1α, IL-1β, TNF-α, IL-6 e IL-8, pelos queratinócitos em resposta a estímulos químicos são os principais fatores patogênicos para DCI (Elmas, *et al.,* 2019).

1.1.2 Dermatite de contato Alérgica (DCA)

A fisiopatologia da DCA tem início com o processo de sensibilização que ocorre na primeira exposição ao alérgeno. Inicialmente, um hapteno, molécula de baixo peso molecular (<1kDa), que pode agir como molécula antigênica e alergênica, se associa a uma proteína carreadora de alto peso molecular, circulante ou intracelular, para iniciar uma resposta imune (Adair, *et al*., 2021; Gober, *et al*., 2008).

Células apresentadoras de antígeno, como as dendríticas da pele, também conhecidas como células de Langherans (CLs), migram via vaso linfático para a zona paracortical dos linfonodos que atendem a região atingida da pele. Após o reconhecimento do complexo hapteno-proteína apresentado via Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*, MHC), células do sistema imune proliferam, dando origem a células efetoras e de memória (Nassau, *et al*., 2019; Martins *et al*., 2011).

Numa segunda fase, quando ocorre a reexposição ao alérgeno, o hapteno, aplicado sobre a pele, é captado por células epidérmicas, dentre elas CLs e queratinócitos, que estimulam células imunes específicas, iniciando o processo inflamatório da DCA (Cavani, *et al*., 2008; Kimber, *et al*., 2002; Novak-Biliè, *et al*., 2018).

Alguns fatores podem influenciar a intensidade da DCA, como a natureza dos químicos, suas concentrações e condições de exposição, bem como, características inerentes ao indivíduo exposto ao produto (Adair, 2021; Erkes, 2014; Kimber, *et al.,* 2011).

1.2 A proibição de testes em animais e a busca por métodos alternativos

Durante séculos, acreditava-se que animais eram incapazes de pensar ou ter consciência. Porém no século XIX, o naturalista britânico Charles Darwin propôs que ‘’assim como o homem, os animais também sentem prazer, dor, felicidade e sofrimento’’ (Davis & Cheeke, 1998). A partir da defesa dessa ideia, levanta-se uma série de questionamentos éticos relacionados ao uso despreocupado de animais em prol da ciência. Apesar da eloquência revolucionária do discurso, somente em 1959 surgiu o primeiro conceito que envolve proteção e ética na experimentação animal, os 3Rs (Redução, Refinamento e Substituição, do inglês *Reduction*, *Refinement and Replacement*), proposto por Charles Hume e Willian Russel (Balls,1994). Atualmente já se fala em 6Rs, que incluem Interpretação, do inglês *Read-across*, relacionado com experimentos *in sílico*, Relevância e Roteiros, relacionados com as políticas de implementação das novas técnicas (site AAVS. *Research Alternatives,* acessado em 14/05/2020).

A indústria cosmética durante muitos anos realizou testes em animais na avaliação de seus produtos quanto à possibilidade de desencadearem diferentes desfechos clínicos. No entanto, após diversas manifestações populares, que provocaram calorosas discussões também na academia a cerca do uso de animais em pesquisa e educação, foi imposto o banimento de algumas práticas em vários países. Na Europa, pioneira na adoção das novas medidas, em 2003, ocorreram mudanças na legislação e entrou em vigor uma diretriz que proibiu os testes em animais para avaliação de cosméticos e seus ingredientes: a “7ª Emenda da diretiva de cosméticos” (Adler, *et al*., 2011).

Já no Brasil, vale ressaltar o artigo 32 da Lei 9605, de 1998, que dispõe de multa para crueldade contra animais e para experimentos dolorosos quando existirem alternativas (*site* planalto.gov.br. Acessado em 26/09/2022). O grande marco no entanto se deu com a promulgação da Lei AROUCA, ocorrida em 2008,

foi o grande marco que muda o cenário da utilização de animais no âmbito do ensino, da pesquisa e da indústria (*site JusBrasil*, 2008. acessado em 15/06/2021). Essa lei regulamenta e estabelece um sistema nacional de experimentação animal, com normas para a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa. Em 2009, foi criado o Conselho Nacional de experimentação Animal (Concea). Os protestos contra o uso de animais em pesquisa no país tiveram início nos anos 2000, e a invasão e depredação do Instituto de Pesquisa Royal por ativistas, em 2013 (*site* Portal Brasil, acessado em 15/04/2021), levou o governo do estado de São Paulo a sancionar uma lei que proíbe a utilização de animais para desenvolvimento, experimentação e testes de produtos cosméticos, higiene pessoal, perfumes e seus componentes (*site* Assembleia Legislativa do Estado de São Paulo, acessado em 15/06/2021). Hoje, no Brasil, 10 estados possuem leis que proíbem a utilização de animais para testes de produtos cosméticos, são eles: São Paulo, Santa Catarina, Rio de Janeiro, Pernambuco, Paraná, Pará, Minas Gerais, Mato Grosso, Paraíba e Distrito Federal.

Por meio da Resolução Normativa (RN) Nº 18, de 2014, o Concea dispõe sobre o reconhecimento no Brasil de métodos alternativos validados que tenham por finalidade a redução, a substituição ou o refinamento do uso de animais em atividades de pesquisa. Em 2019, o teste alternativo tornou-se obrigatoriamente o método de escolha para todas as atividades de pesquisa básica ou aplicada no Brasil. Até 2021, 24 métodos, envolvendo nove desfechos toxicológicos, foram aprovados: potencial de irritação e corrosão da pele; potencial de irritação e corrosão ocular; potencial de fototoxicidade; toxicidade reprodutiva; contaminação pirogênica em produtos injetáveis; absorção cutânea; potencial de sensibilização cutânea; toxicidade aguda e genotoxicidade (Site MCTIC Ministério da Ciência Tecnologia Inovação e Comunicações, acessado em 15/06/2021).

Vale ressaltar que o método alternativo precisa ser o método prioritário de escolha, porém, caso exista alguma justificativa científica que sustente a sua não adequação para se atingir os fins, é possível a realização de outra versão do ensaio (site invitro.com, acessado em 15/06/2021).

Assim, nos últimos anos tornou-se premente o desenvolvimento de testes alternativos ao uso de animais, o que certamente representa um desafio

científico. Com grandes esforços, também financeiros, feitos por diferentes instituições públicas e privadas na Europa e EUA, alguns testes foram recentemente validados tanto para o potencial de irritação cutânea quanto para avaliação do potencial alergênico e sensibilização de agentes químicos. São exemplos de testes validados: Irritação cutânea - *Reconstructed Human Epidermis Test* - EPISKIN™, EpiDerm™, SkinEthic™ e LabCyte EPIModel24 (OECD 439); Sensibilização cutânea - *in chemico Direct Peptide Reactivity Assay* (DPRA) OECD 442C; *in vitro* KeratinoSens™ (HaCaT) OECD 442D; *in vitro* U-SENS™ (U-937) e h-CLAT OECD 442E; *in silico* DEREK Nexus e OECD (*Quantitative) Structure-Activity Relationships* (Q)SARs toolbox (Wong, *et al*., 2015; Cesati, *et al*., 2013; Mehling, *et al*., 2012; Fitzpatrick, *et al*., 2019; site OECD, acessado em 12/05/2022), entre outros em desenvolvimento.

Entretanto, mesmo os testes validados, ou em processo de validação, apresentam resultados divergentes quando comparados com dados clínicos e/ou ensaios feitos em animais (Robinson, 2019; Vukmanovic & Sadrieh, 2017). Desse modo, para uma abordagem robusta e confiável na avaliação de segurança de um ingrediente químico, é necessário criar uma bateria de testes *in vitro*. Estes testes devem mimetizar as complexas interações dos químicos com os diferentes compartimentos do sistema imune e espera-se que, em conjunto, possam advertir sobre a segurança ou não de um dado ingrediente cosmético (Robinson, 2019; Johansson, 2014; Aeby *et al*., 2010).

A última atualização sobre sensibilização cutânea foi a Diretriz No. 497, publicada pela OECD em 14 de junho de 2021. Trata-se de uma Abordagem Definida (DA), que consiste em fontes de informação selecionadas, por exemplo, previsões *in silico*, *in chemico* e dados *in vitro*, usadas em uma combinação específica. Os dados resultantes obtidos das fontes de informação são interpretados por meio de um procedimento fixo de interpretação de dados (DIP), como por exemplo, uma regra matemática ou um modelo baseado em regras. DAs destinam-se a superar algumas limitações dos métodos individuais. As DAs incluídas nesta Diretriz demonstraram fornecer ao menos o mesmo nível de informação que o ensaio para predição do potencial alergênico de químicos, realizado em camundongos e denominado de linfonodo linfático local (LLNA, do inglês *Local Lymph Node Assay*) (Vukmanovic & Sadrieh, 2017) (OECD TG 429) para identificação de perigos, como na avaliação sensibilizador *versus* não

sensibilizador. Além disso, duas DAs fornecem informações para categorização de potência de sensibilização que são equivalentes às informações de categorização de potência fornecidas pelo LLNA (site OECD, acessado em 01/12/2021). É importante mencionar que, embora o método alternativo deverá ser sempre a escolha, em alguns casos os testes em animais, como o LLNA, ainda são realizados (site AAVS. *Research Alternatives,* acessado em 14/05/2021).

1.2.1 Via de Desfecho Adverso (do inglês *Adverse Outcome Pathway*, AOP)

A concepção dos testes alternativos, para que sejam eficientes em predizer um determinado desfecho clínico, tem acontecido a partir do desenho de um processo de validação chamado via de desfecho adverso (AOP, do inglês *Adverse Outcome Pathway*). As AOPs são eventos tipicamente representados de forma sequencial, passando de um evento-chave a outro, como mecanismos interdependentes e compensatórios (Bilsen, *et al*., 2017; Maxwell, *et al*., 2014; MacKay, *et al*., 2013;).

Para o processo de sensibilização da pele foi desenvolvida uma AOP com cinco eventos-chave: o **primeiro** deles é o de iniciação molecular, que consiste na ligação covalente de substâncias a proteínas da pele ou haptenização, que pode ser abordado usando-se o DPRA *in chemico*, diretriz 442C. 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 elemento de resposta antioxidante (*antioxidant response element* - ARE) e elemento de resposta eletrofílica (*electrophile response element* - EpRE). Este evento-chave pode ser abordado usando-se os métodos de teste de luciferase ARE-Nrf2 *in vitro* (KeratinoSens™ ou LuSens), DIRETRIZ 442D. O **terceiro** evento-chave é a ativação de CDs, tipicamente avaliadas pela expressão de marcadores específicos de superfície celular e pela indução de secreção de quimiocinas e de citocinas, e pode ser abordado usando-se os testes *in vitro* h-CLAT e U-SENS™ ou o ensaio *IL-8 LUC Assay*, como descrito na DIRETRIZ 442E. O **quarto** evento-chave é a proliferação de células T, que é avaliada indiretamente nos ensaios *in vivo* LLNA em camundongos (**Figura 1**). O desfecho da AOP culmina

na doença, nesse caso, DCA (Delaine, *et al*., 2011; Strickland, *et al*.,2018; Leist, *et al*., 2017; OECD 2017, Acessado em 01/12/2021).

Entende-se que a robustez da predição de alergenicidade para um dado agente químico será dependente da confirmação de mais de um evento-chave da AOP.

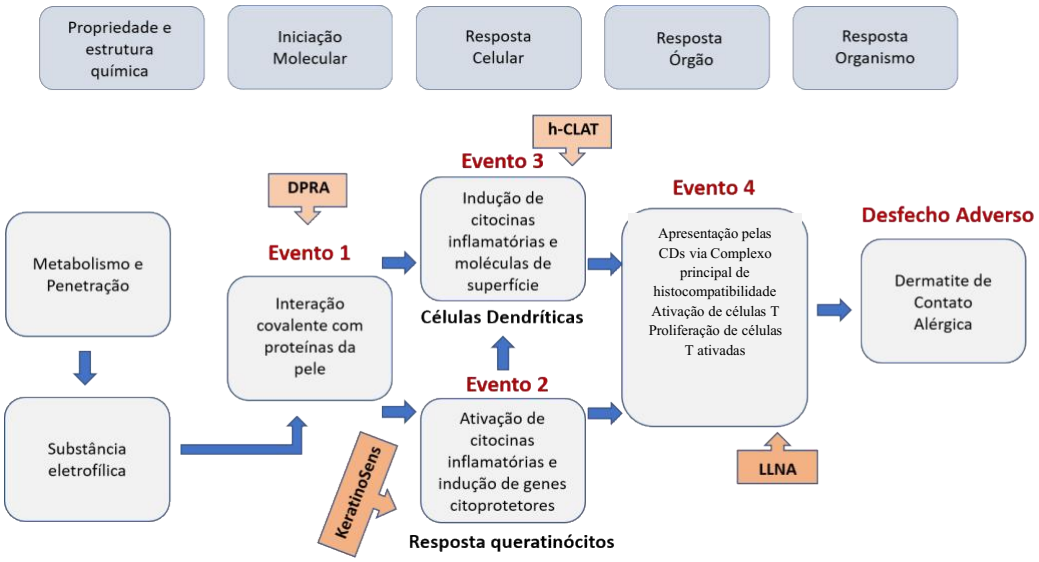


Figura 1: Via de Desfecho Adverso (AOP) para Sensibilização Cutânea e os testes validados e aprovados: A AOP para sensibilização cutânea é composta por quatro eventos chaves que culminam na doença, DCA. O primeiro evento é chamado haptenização e o teste alternativo relacionado é o DPRA, já validado. O segundo é a resposta dos queratinócitos e indução da expressão de genes citoprotetores. Um dos testes validados para esse fim é o KeratinoSens. Já o terceiro evento compreende a mobilização de células dendríticas e o teste alternativo correspondente é o h-CLAT. O último evento-chave para essa AOP avalia a proliferação de células T. Para esta etapa não existe teste alternativo, sendo LLNA o único teste validado disponível (Adaptado de Strockland *et al*., 2018).

1.3 Resultados anteriores do grupo

Nosso laboratório, associado à rede nacional de métodos alternativos (RENAMA), em 2010 fez uma parceria com a empresa Natura, envolvida com produção e elaboração de artigos cosméticos e, portanto, alvo de impacto das mudanças na legislação sobre o uso de animais. Propusemos o desenvolvimento e padronização de um teste alternativo *in vitro*, preditivo de alergenicidade, com base no evento-chave 3, a mobilização de células dendríticas (Parise et al.,2015). Assim, estabeleceu-se a utilização da linhagem celular humana mielomonocítica THP-1, a partir das mesmas premissas do teste de ativação de linhagem celular humana, h-CLAT, que analisa a expressão dos marcadores de ativação CD86 (presente em células apresentadoras de

antígeno) e CD54 (marcador de leucócitos), que passam a ser expressos na superfície das células THP-1 quando expostas a sensibilizadores. Foram avaliados 31 químicos (23 sensibilizadores e oito não sensibilizadores) e, em nossas condições, as análises de expressão de CD54 exibiram fraca eficiência para discriminar agentes químicos sensibilizadores de não-sensibilizadores. Porém, mostramos que a combinação das análises da expressão de CD86 e da secreção da interleucina (IL)-8 no sobrenadante da cultura celular permitiu prever a alergenicidade (Parise, *et al*., 2015).

Embora nosso grupo não esteja especialmente dedicado às questões de substituição do uso de animais em pesquisa, essa é uma preocupação constante nos desenhos dos projetos que são desenvolvidos. Assim, além do trabalho citado acima, estabelecemos novos protocolos para reduzir o uso de animais e dispensar o uso de soro fetal bovino no cultivo de algumas células (Soares, 2020).

1.4 Modelos mamíferos x modelos alternativos

Como um reflexo ou consequência das mudanças na legislação sobre a utilização de animais em pesquisa, temos os resultados animadores publicados em 2016 (Freires, *et al.*, 2016) e destacados na **Figura 2**.

O estudo mostra que em um período de 25 anos observou-se um aumento significativo (909%) do uso de modelos alternativos, utilizando principalmente *Drosophila melanogaster* (41.89%), *Danio rerio* (zebrafish) (29.74%) e *Caenorhabditis elegans* (26.53%). O nematóide *C. elegans* apresenta características apropriadas para os propósitos em questão e sobre as quais descrevemos a seguir. (Freires, *et al.*, 2016, Leung, *et.al*., 2008).

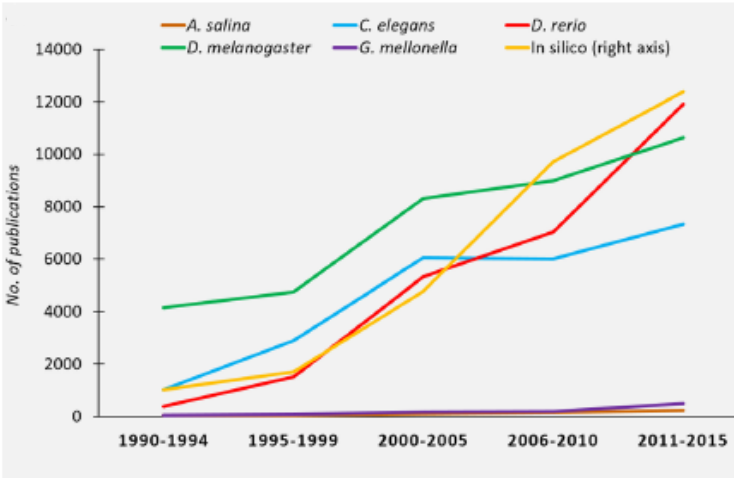


Figura 2: Uso de modelos alternativos x animais de 1990 a 2015: Observam-se os dados sobre o uso de modelos alternativos. (Freires, *et al*., 2016).

1.5 *Caenorhabditis elegans (C. elegans).*

Em 1963, o pesquisador Sydney Brenner propôs que nematóides (vermes redondos), das espécies *Caenorhabditis briggsae* ou *Caenorhabditis elegans,* seriam um sistema ideal para resolver problemas futuros relacionados a estudos clássicos de biologia molecular. Mais tarde, ele estabeleceu o *Caenorhabditis elegans* como o foco de seus esforços, porque a linhagem *C. elegans* cresceu melhor do que a *C. briggsae*, ambas isoladas em seu laboratório. A linhagem tornou-se, portanto, um importante modelo, a partir da década de 70 (Wood, *et al*.,1988), para estudos de biologia do desenvolvimento, genética, envelhecimento e de ecotoxicologia (Schierenberg & Wood 1985). Hoje, o *C. elegans* é utilizado ativamente por mais de mil laboratórios em todo o mundo, com mais de 1200 artigos de pesquisa publicados a cada ano nos últimos 5 anos (site wormbase.org, 2019).

Caenorhabditis elegans (Caeno-recente; rhabditis-redondo; elegans-elegante) é um nematoide da família *Rhabditidae,* que na vida adulta mede cerca de 1 milímetro de comprimento e vive normalmente no solo. Durante o desenvolvimento pós-embrionário passa por quatro fases larvares (L1-L4) até atingir o estágio adulto, dando origem a uma extensa descendência (>200 ovos) por autofecundação, conforme ciclo mostrado na **Figura 3** (Brenner, 1974).

O verme tem um ciclo de vida rápido, do ovo ao adulto, que põe ovos, quando cultivado por 2 dias a 25°C. É de fácil manipulação, cresce e é mantido em placas de Petri, alimentando-se de estirpes de bactéria *Escherichia coli*. O *C. elegans* adulto vive cerca de 1 mês, em condições de crescimento normais, porém seu crescimento pode variar se submetido a variações nas condições de vida (site wormbook.org).

Na ausência de alimento, o desenvolvimento em fase larval é interrompido e as larvas na fase 2 entram em um estágio alternativo chamado ‘’dauer’’, no qual a cutícula dessa larva envolve completamente o verme fechando sua boca e impedindo a alimentação. Como resultado, ao entrar nessa fase, os vermes podem sobreviver por pelo menos um mês. Vermes em dauer, mantidos em placas, podem permanecer viáveis por até seis meses se conservados a 15°C. Sempre que são necessários animais para novos experimentos, basta uma parte do ágar antigo ser transferido para uma nova placa com bactérias e os animais retomam seu desenvolvimento. (Strange, *et al*., 2003).

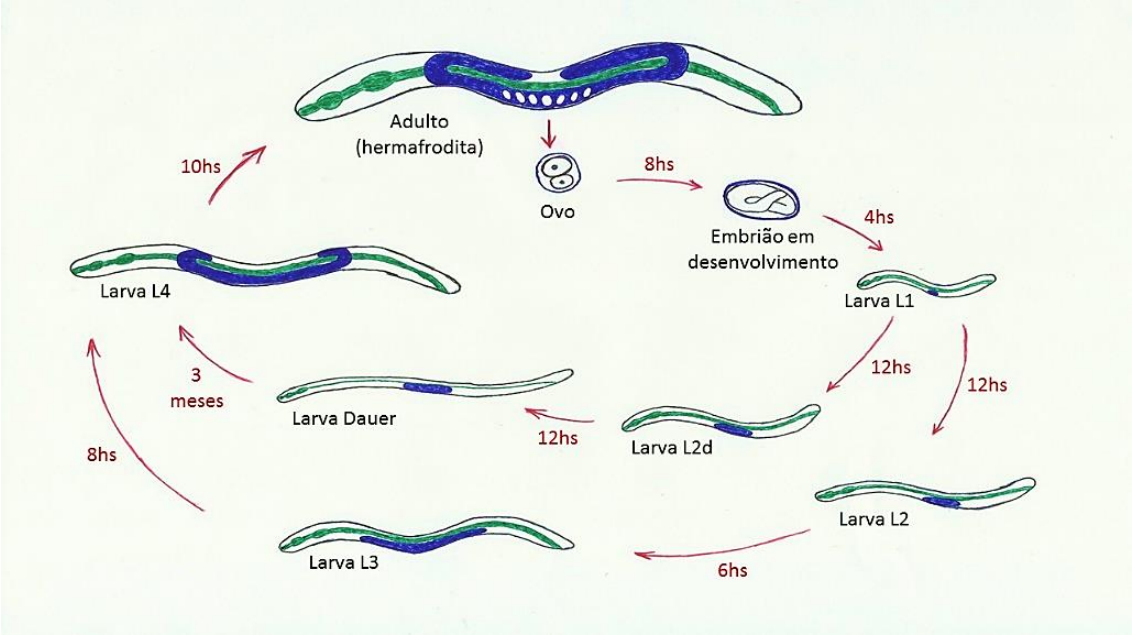


Figura 3: Ciclo de vida do *C. elegans:* Um verme adulto hermafrodita põe em média 200 ovos por vida. Do ovo para a primeira fase larval são necessárias 12 horas. Da fase L1 para L2 levam-se mais 12 horas. De L2 para L3 adiciona-se 6 horas. De L3 para L4 somam-se mais 8 horas e de L4 para o verme adulto, mais 10 horas, totalizando um ciclo de 48 horas. Caso as larvas L2 estejam em uma condição de privação de alimento, ela pode entrar na fase dauer (L2d), e permanecer por 6 meses até que esteja novamente em presença de alimento, quando dá continuidade ao seu desenvolvimento (Adaptado de Strange, et al., 2003).

O *C. elegans* apresenta dismorfismo sexual. Os vermes possuem a forma hermafrodita e machos, sendo que os machos ocorrem numa frequência bastante inferior, <0,2% (Teotónio, *et al.,* 2017). A possibilidade de serem estocados em nitrogênio líquido ou a -80°C confere à espécie mais uma vantagem importante, comparativamente a outros modelos normalmente utilizados em laboratório (Epstein & Shakes, 1995). Outra característica conveniente é a transparência de sua cutícula, que possibilita a detecção de proteínas fluorescentes *in vivo*. Além disso, como a espécie tem um ciclo de vida curto, seu uso torna-se econômico e permite a obtenção de resultados de forma rápida (Castro, *et al.,* 2011).

No que diz respeito à genética, sabe-se que ao menos 38% dos genes que codificam proteínas do *C. elegans* possuem ortólogos no genoma humano (Shaye & Greenwald, 2011) e 60-80% dos genes humanos possuem um ortólogo no genoma do *C. elegans* (Kaletta & Hengartner, 2006; Culetto & Satelle, 2000). Assim, muitas descobertas em *C. elegans* têm relevância para os estudos da saúde e das doenças humanas.

1.5.1 Estrutura da epiderme do *C. elegans*

Embora as camadas da pele da maioria dos mamíferos e dos nematoides pareçam ser muito diferentes, elas apresentam semelhanças fundamentais, mostradas na **Figura 4**. Ambas são tecidos epiteliais, sendo a pele dos mamíferos composta por um epitélio escamoso estratificado de várias camadas (epiderme) e uma camada subjacente de tecido conjuntivo (derme), enquanto no nematóide é formada por uma camada epitelial simples, denominada cutícula (Xu, *et al*., 2012). A epiderme de mamíferos é gerada a partir de queratinócitos especializados que se dividem na camada basal e cuja progênie sofre diferenciação no estrato córneo. O estrato córneo forma a barreira de permeabilidade primária da pele e é composto por corneócitos e uma matriz extracelular rica em lipídios (Chisholmand & Xu, 2012).

Já a cutícula do *C. elegans* é composta por uma camada fina unicelular com barreira epitelial que envolve os órgãos internos (boca, faringe, intestino e gônada) e é formada principalmente por um sincício-nuclear. A forma e a espessura da cutícula *do C. elegans* é suportada principalmente pelo

exoesqueleto, no lado apical, e os quatro quadrantes de músculo largo, no lado basal. Os microtúbulos dos citoesqueletos formam pacotes longos e grossos que abrangem toda a cutícula e proporcionam suporte mecânico intracelularmente (Zhang & Labouesse, 2010). Em alguns aspectos, a cutícula do *C. elegans* é análoga ao estrato córneo de mamíferos, pois é também um compartimento extracelular composto por colágenos reticulados, proteínas insolúveis, glicoproteínas e lipídios (Xu, *et al*., 2012; Chisholmand & Xu, 2012; Chisholmand & Hsiao, 2012).

No *C. elegans*, a cutícula possuí células de defesa autônoma contra patógenos invasores ou danos físicos. A maior parte dos receptores ainda não foi identificada. Também não está claro como o sistema imunológico e toda a epiderme reconhecem sinais produzidos por lesão física (Zhang, *et al*., 2015; Zou, *et al*., 2013). Um ferimento mecânico sobre a epiderme de humanos, ou sobre a cutícula do verme, pode provocar uma resposta imune inata, o que leva à elevada produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs) por células epidérmicas (Patterson *et al*., 2013). A cutícula de *C. elegans* fornece, portanto, um excelente modelo de estratégias básicas de defesa do epitélio.

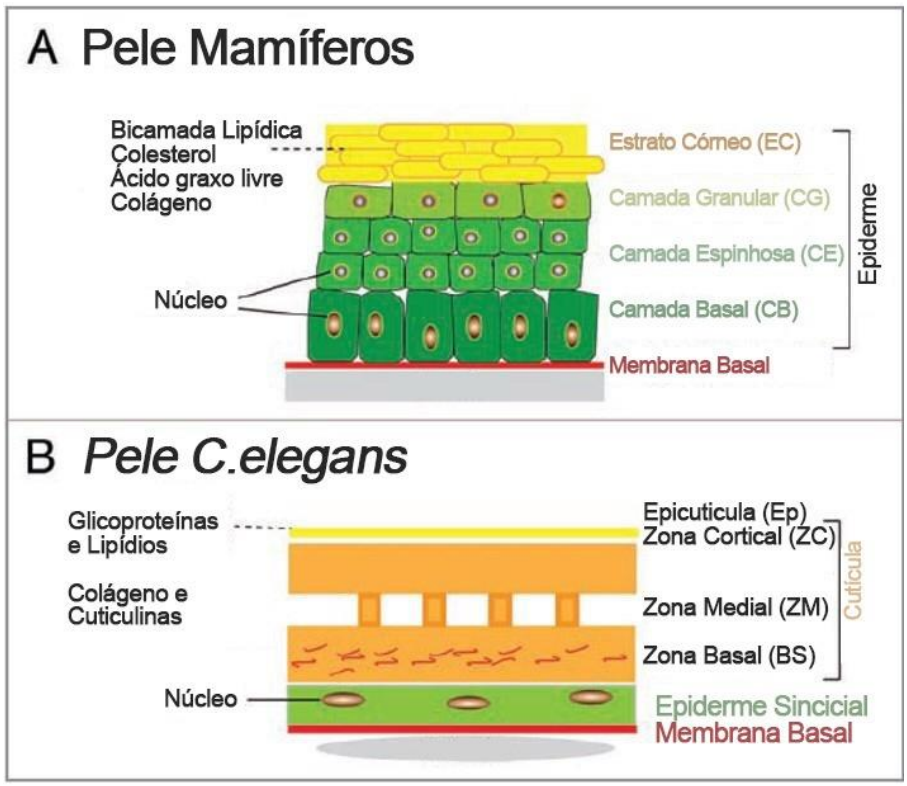


Figura 4: Comparação entre a pele de mamíferos e a cutícula de *C. elegans:* (A) A pele da maioria dos mamíferos consiste em duas camadas: epiderme e derme, separadas por uma membrana basal. A epiderme é composta por várias camadas celulares, incluindo a camada

basal que repousa sobre a membrana basal, e as camadas celulares diferenciadas da camada espinhosa, camada granular e estrato córneo. O extrato córneo é uma camada rica em lipídios composta por colesterol, ácidos graxos livres, ceramidas e colágeno, que juntos fornecem a função de barreira de impermeabilidade da pele. (B) A pele do *C. elegans* consiste em epiderme e cutícula. A epiderme é um epitélio simples, cuja superfície basal repousa sobre uma membrana basal. A superfície apical do epitélio epidérmico secreta a cutícula, uma matriz extracelular colágena. A cutícula é uma barreira flexível composta predominantemente por colágenos reticulados. Externo à cutícula há uma epicutícula rica em lipídios que também pode funcionar como uma barreira de impermeabilidade (Xu, *et al*., 2012).

1.5.2 A avaliação do comportamento do *C. elegans*

O comportamento do verme, além de refletir a atividade do sistema nervoso, é dependente de múltiplos fatores como estímulos externos, estrutura neuronal e mudanças no meio interno do animal. Portanto, ensaios comportamentais oferecem ao pesquisador ferramentas simples, sensíveis e poderosas. O sistema nervoso do *C. elegans* é formado por 302 neurônios e é capaz de executar uma variedade de comportamentos. A simplicidade do sistema nervoso, que é muito bem caracterizado, os conjuntos de comportamentos bem definidos e seu *background* isogênico, responsável por gerar populações estáveis e homogêneas, fazem do *C. elegans* um organismo modelo atraente para estudar não só a genética do comportamento (Hobert, 2003), como também a resposta do verme a situações adversas. Assim, testes realizados em *C. elegans* que avaliam sobrevivência, locomoção, alimentação, fertilidade, postagem de ovos, termorregulação, quimiossensação, entre outros, são denominados testes de comportamento. Estes ensaios têm sido utilizados para desvendar a contribuição de genes específicos para o comportamento, na caracterização do papel de determinadas substâncias na biologia do envelhecimento e no metabolismo e, mais recentemente, começam a ser propostos na avaliação de toxicidade de medicamentos e diversas substâncias (Avery, 2012; Flavell, 2020; Park, 2017).

1.5.3 Vias de sinalização

Como já mencionado, uma gama de genes em *C. elegans* possuem ortólogos em mamíferos, o que possibilita o estudo de vias de sinalização importantes em casos de resposta do sistema imune inato do verme frente a injúrias causadas na cutícula. Descrevemos a seguir as quatro vias de

sinalização mais comuns que podem estar envolvidas nesse processo: p38 PMK1 MAPK, JNK-1, TGF-β e *Insulin-IGF*.

1.5.3.1 p38 PMK-1 MAPK

Uma via de sinalização conhecida pelo envolvimento em processos de sensibilização da pele é a *Keap1* (*Kelch-like ECH associated protein*) -*Nrf2* (fator 2 de NF-E2 relacionados com p45) -*ARE* (elemento de resposta antioxidante), na qual se baseia também o teste validado KeratinoSens™. Essa via é a principal reguladora das respostas citoprotetoras do estresse oxidativo em mamíferos. Químicos sensibilizadores da pele têm sido relatados como indutores de genes que são regulados pelo elemento de resposta antioxidante (ARE) (Natsch, *et al*., 2010; Emter, *et al.,* 2010). Pequenas substâncias eletrofílicas podem atuar sobre o sensor proteína Keap1, resultando na sua dissociação do fator de transcrição Nrf2, que, uma vez dissociado, pode então ativar genes dependentes de ARE, tais como os que codificam para as enzimas de desintoxicação de fase II (Braun, *et al.,* 2002; Kaumann, *et al*., 2014; site OECD 2017, acessado em 01/12/2021).

No nematoide *C. elegans*, as proteínas Nrf/CNC (Nrf2) são representadas pelo seu ortólogo SKN-1, que apresenta uma conservação funcional notável e regula muitos genes das mesmas famílias (Landis & Murphy, 2010). Estudos em *C. elegans* indicam que a regulação de SKN-1 é surpreendentemente complexa e influenciada por numerosos sinais de crescimento, nutrientes e metabólicos. (Blackwell, *et al.,* 2015). Durante o estresse oxidativo, a ativação de SKN-1 requer a sua fosforilação pela PMK-1, uma quinase conservada pertencente à via de sinalização da p38 MAPK *(Mitogen-Activated Protein Kinase*). SEK-1, a MAP quinase que fosforila PMK-1, é necessária para ativar a translocação de SKN-1 para o núcleo celular e ativar a expressão do promotor *gst-4* (Zhao, *et al*., 2016; Detienne, *et al*., 2016).

Em muitos seres vivos do reino animal, incluindo o nematóide *C. elegans,* a epiderme está em contato permanente com o meio ambiente e representa a primeira linha de defesa contra patógenos e lesões. Infecção por patógenos induzem a expressão na epiderme de genes que codificam peptídeos antimicrobianos (AMP), como NLPs (do inglês, *neuropeptide-like proteins*) (Pujol, N. e*t al.*, 2008). A via p38 MAPK, envolvendo PMK1 e SEK1, também está

presente na resistência do verme a infecções, porém com a ativação final do gene *nlp-29* (Pujol, N. e*t al.*, 2008; Lezi, *et al.*, 2018).

Durante uma lesão física na cutícula do verme, o nível aumentado da expressão de *nlp-29* é mediado por uma molécula, presente na epiderme, chamada STA-2, que fica localizada próximo a um receptor apical (hemidesmossomo), e consegue regular de forma rápida e direta a expressão do AMP, antes que uma lesão por patógeno ocorra (Zhang, *et.al*, 2015).

1.5.3.2 JNK-1

A família de fatores de transcrição FOXO (do inglês, *Forkhead Box Protein*) tem uma função evolutivamente conservada na regulação de sensores de nutrientes e respostas ao estresse. Estudos demonstraram que as proteínas FOXO controlam a expressão de genes específicos do sistema imunológico em linfócitos T naïve e regulatórios (Treg), que são reguladores cruciais da homeostase e tolerância dos linfócitos T (Leenders, *et al.* 2000). Proteínas FOXO são importantes reguladoras do metabolismo energético, de respostas ao estresse e são altamente conservadas durante a evolução (Ouyang & Li, 2011). Em *C. elegans*, a proteína FOXO tem um ortólogo chamado DAF16, que participa da via de sinalização JNK (do inglês, *c-Jun N-terminal Kinase*), que atua como um sensor molecular para diversos tipos de estresse. Em *C. elegans*, a proteína JNK está relacionada ao aumento de longevidade e da resistência aos estresses térmico e oxidativo (Wang, *et al*., 2005). A MAPKKK NSY-1 é responsável por ativar a MAPKK JJK1, que ativa JNK-1, capaz de fosforilar o fator de transcrição DAF-16 e modula sua translocação para o núcleo. Uma vez no núcleo, DAF-16 aumenta a expressão de numerosos alvos de forma a prevenir danos celulares, incluindo a ativação de mecanismos de defesa antioxidante, conferindo maior resistência ao estresse e ajudando na manutenção da vida normal do verme (Oh *et al*., 2005; Wolf *et al*., 2007).

1.5.3.3 TGF-β

A via canônica de transdução de sinal TGF-β (do inglês, *Transforming Growth Factor β*) é composta por dois receptores tirosina quinase transmembrana e três transdutores de sinal SMAD (do inglês, *Small Mothers*

Against Decapentaplegic) intracelular. Os ligantes da superfamília TGF-β desempenham papeis relacionados com o desenvolvimento, crescimento e fisiologia de diversas espécies. Em *C. elegans* existem vários genes que são ativados por essa via, e um deles é o *dbl-1* (Clark, *et al*., 2018).

A proteína DBL-1 é um ligante do receptor SMA-6, que está diretamente relacionado ao desenvolvimento do tamanho do verme. A perda de dbl-1 resulta em um animal menor, enquanto a superexpressão resulta em animais mais longos e, em ambos os casos, uma cutícula defeituosa (Clark, *et al*., 2018; Elkabti, 2018).

1.5.3.4 *Insulin-IGF* (IIGF)

Receptores nucleares (NRs), como DAF-12, atuam como fatores de transcrição tipicamente regulados por hormônios lipofílicos, que coordenam o metabolismo, o desenvolvimento e a homeostase. Um gene relacionado com o desenvolvimento larval de *C. elegans* é o *daf-9,* que foi demonstrado ter uma relação direta com o NR DAF-12. Mutações nesse gene resultam em um fenótipo dauer, que tem um metabolismo lento e anormal. DAF-9 está bastante expressa na epiderme do verme e é ortólogo da proteína citocromo P450, que está relacionada com a biossíntese de hormônios esteroides em mamíferos (Gerisch, *et al.*, 2004; Jia *et al*., 2002).

Nos casos de injúria cutânea, as vias de sinalização descritas acima podem se comunicar entre si como vemos na **Figura 5**. A quinase NSY-1 está presente nas vias de sinalização P38 PMK1 MAPK (ativando SEK-1) e JNK1 (ativando JKK-1). Já DAF-12, presente na via IIGF, pode ativar DAF-16, o fator de transcrição ativado pela via JNK1 (Roseli, *et al*., 2019).

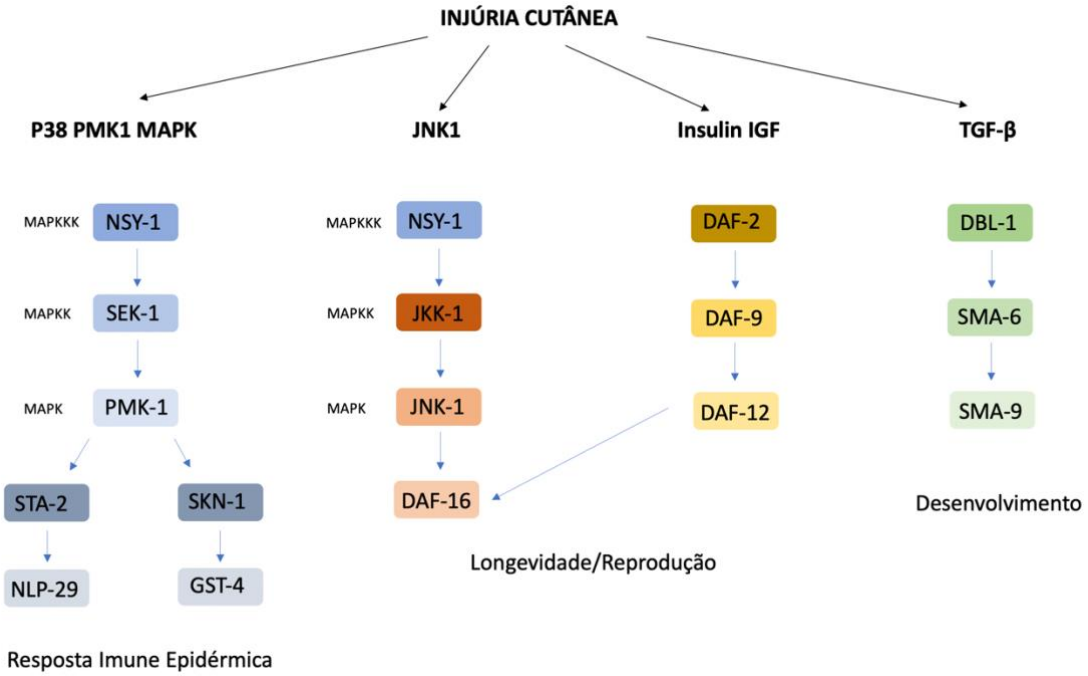


Figura 5: Representação esquemática das vias de sinalização ativadas frente à injúria cutânea em *C. elegans*: Após a epiderme do *C. elegans* sofrer algum tipo de dano, quatro vias de sinalização ativadas já foram descritas: P38 PMK1 MAPK, responsável pela resposta imune epidérmica; JNK1 e Insulin IGF, ativas em casos de danos que comprometem longevidade e reprodução e, por fim, TGF-β, via responsiva a danos que afetam o desenvolvimento do verme. Adaptado de: Roseli, M. *et al.*, 2019.

1.5.4 *C. elegans* como método alternativo

A legislação que regulamenta o uso de animais para fins científicos em geral protege os seres vertebrados por considerá-los dotados da capacidade de ter experiências subjetivas como dor e sofrimento. No entanto, no que diz respeito aos invertebrados não existe um consenso sobre o assunto (Oliveira & Goldim, 2014). É definido como senciente, ou consciente, aquele organismo capaz de sentir sensações como dor e prazer (Oliveira & Goldim, 2014). Existem três critérios gerais para definir a senciência de um ser vivo: comportamentais, que envolvem reações positivas ou negativas frente a situações que ameacem a vida; evolutivas, relacionadas à capacidade de sentir, o que surge na história evolutiva em conexão com a capacidade de agir de uma determinada forma; e fisiológicas, diretamente ligadas à presença de sistema nervoso central (Rollin, *et al.,* 1989; site: animal-ethics.org, acessado em 12/06/2020).

Estudos demonstraram que os nematoides, mais especificamente o *C. elegans*, não apresentaram evidências comportamentais e fisiológicas de que

possam sentir dor ou angústia, o que o torna um modelo alternativo ao uso de mamíferos (Oliveira & Goldim, 2014).

1.6 Proposição do presente estudo

Considerando as questões de segurança envolvidas e a complexidade da classificação de um agente químico como tóxico, principalmente a partir de testes alternativos ao uso de animais, propomos avaliar a utilidade do *C. elegans* na detecção de toxicidade de ingredientes cosméticos. Artigos recentemente publicados têm mostrado sucesso do modelo na avaliação de algumas categorias de químicos, tais como óleos essenciais (Lanzerstorfer *et al.,* 2020) e surfactantes não-iônicos (De la Parra-Guerra *et al.,* 2020). Dado o grande número de reagentes para os quais há poucos dados sobre toxicidade e o fato de os testes *in vitro*, até o momento validados, serem complexos, por vezes caros e demorados, seria interessante o estabelecimento de um modelo simples, rápido e menos oneroso, que permitisse uma seleção inicial, distinguindo o agente químico tóxico do não-tóxico. Nesse sentido, o *C. elegans* pode vir a constituir-se em um modelo experimental valioso para esse fim.

Propusemos duas abordagens: a primeira, utilizando a linhagem selvagem N2 Bristol, a fim de verificar se existe alteração de parâmetros comportamentais mensuráveis do verme e da expressão de genes em *C. elegans* relacionados com injúria cutânea após exposição a químicos tóxicos; e a segunda, identificar se existe uma ou mais linhagens geneticamente modificada para expressar gene repórter de ativação de genes relacionados com o processo de injúria cutânea.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o modelo experimental do nematóide *C. elegans* na detecção de toxicidade de ingredientes cosméticos.

2.2 Específicos

-Avaliar se a exposição do *C. elegans* a ingredientes cosméticos sensibilizadores ou irritante altera o comportamento do verme, por meio da análise da expectativa de vida, postagem e viabilidade de ovos e bombeamento de faringe;

-Avaliar se a exposição do *C. elegans* a ingredientes cosméticos sensibilizadores ou irritante interfere na ativação de genes relacionados com injúria cutânea, por meio da análise de expressão/ativação de genes ortólogos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Edifício de Ciências Biomédicas (ECB) e no Instituto de Farmacologia – INFAR (laboratório multiusuário 10), no Departamento de Biofísica da UNIFESP.

3.1 Materiais

3.1.1 Cepas e linhagens

Tabela 1 – Linhagens de *C. elegans* e seus ortólogos

LINHAGEM	ORTÓLOGO *C. elegans*	ORTÓLOGO MAMÍFEROS
CL2166 – *pgst4*::GFP	SKN-1	Nrf2
CF1553 - *psod3*::GFP	DAF-16	FOXO
AA278 - *daf-9*::GFP	DAF-9	Citocromo P450
BW1935 - *dbl-1*::GFP	DBL-1	BMP5
CH1445 - *bli-1*::GFP	BLI-1	Colágeno
IG274 - *nlp-29p*::GFP	NLP-29	AMP
N2 Bristol	Selvagem	---

As linhagens N2 Bristol, CL2166 *Pgst-4::GFP::* e CF1553 *Psod-3::GFP* + *rol-6* foram doadas pelo Prof. Dr. Marcelo Alves da Silva Mori, LaBE (Laboratório de Biologia do Envelhecimento), UNICAMP. As linhagens AA278 DAF-9::GFP; BW1935 dbl-1::GFP; CH1445 bli-1::GFP e IG274 nlp-29p::GFP foram adquiridas do *Caenorhabditis Genetic Center* (CGC) (University of Minnesota, Minneapolis, EUA).

3.1.2 Bactéria

Como fonte de alimentação do *C. elegans*, foi utilizada a linhagem *Escherichia coli* OP501, cedida pelo Prof. Dr. Marcelo Alves da Silva Mori, LaBE–UNICAMP.

3.1.3 Químicos

Os agentes químicos analisados foram adquiridos da Sigma Aldrich (*Sigma Aldrich Inc.*, St. Louis, EUA). Foram utilizados como referências no estudo, os seguintes químicos:

Sensibilizadores: extremo: dinitroclorobenzeno (DNCB, CAS 97-00-7), forte: formaldeído (FA, CAS 50-00-0), moderado: β-mercaptobenzotiazol (2-MBT CAS 149-30-4), fraco: eugenol (EU, CAS 97-53-0).

Irritante: isopropanol (PROP, CAS 67-63-0)

Veículo: dimetilsulfóxido (DMSO, CAS 67-68-5).

Controle Positivo: peróxido de hidrogênio (H_2O_2, CAS 7722-84-1).

Número CAS - número com um registro único no banco de dados do *Chemical Abstracts Service* (CAS). A classificação dos químicos considerada foi obtida por meio dos testes de sensibilização da pele em camundongos – *Local Lymph Node Assay* (LLNA) e de contato com fitas adesivas em humanos (Patch) (dos Santos e cols., 2009).

3.1.4 Soluções e tampões

Tampão M9 - 3g de KH_2PO_4, 6g de Na_2HPO_4, 5g de NaCl, 1ml de $MgSO_4$ 1M, H_2O para 1 litro.

Meio de multiplicação de bactérias Luria Bertani (LB) obtido da Kasvi (São José dos Pinhais, Paraná, Brasil).

Nematoide Growth Medium (NGM) ágar - 3g de NaCl, 2,5g de peptona, 17g de ágar e 975 mL de água destilada, acrescido de estreptomicina (1mg/mL), tampão fosfato - KPO_4 1M, colesterol (5mg/mL), $CaCl_2$ 1M e $MgSO_4$ 1M.

Todos os sais mencionados foram obtidos da Synth (Diadema, São Paulo, Brasil). O ágar e a peptona foram obtidos da Kasvi (São José dos Pinhais,

Paraná, Brasil), e a estreptomicina da *Life Technologies* (*Carsbad*, Califórnia, EUA).

3.1.5 Reagentes

Os reagentes utilizados foram:

- TRIzol® e *SybrGreen* obtidos da *Life Technologies*.
- Isopropanol, etanol, clorofórmio, dimetilsulfóxido (DMSO), hipoclorito de sódio, acetato de sódio, hidróxido de sódio, cloreto de sódio, sulfato de magnésio, cloreto de cálcio, fosfato de potássio monobásico, fosfato de sódio bibásico, todos obtidos da *Synth*.
- Fluoxiuridina (FUdr), glycerol e cholesterol obtidos da *Sigma*.

3.1.6 *Primers*

Os primers foram obtidos da Exxtend (Exxtend, Campinas, Brasil).

Tabela 2: *Primers* utilizados para realização do RealTimePCR

Gene	*Foward*	*Reverse*
gst4	5′ TGC TCA ATG TGC CTT ACG AG 3′	5′ AGT TTT TCC AGC GAG TCC AA 3’
skn1	5′ AGT GTC GGC GTT CCA GAT TTC 3′	5′ GTC GAC GAA TCT TGC GAA TCA 3′
nlp29	5´ CGA GGA ATG TAT GGA GGC TAT G 3’	5’ TCC ATG TAT TTA CTT TCC CCA TCC 3’
his10	5′ GCA ATT CGT CGT CTC GC 3′	5′ GAC TCC ACG GGT TTC CT 3′
pmk1	5’ CGA CTC CAC GAG AAG GAT 3’	5’ ATA TGT ACG ACG GGC ATG 3’
sek1	5’ TGC TCA ACG AGC TAG ACG 3’	5’ ATG TTC GAC GGT TTC ACG 3’
sta2	5’ CTT GGT TTA TGG GTT TTG CAG 3’	5’ ATC GAC GTC GGA GAA CTT GT 3’
nsy1	5’ TGC GAT GAA CTA CTA CGG 3’	5’ CAC CCA AAT GAC CAA ATA 3’

****** *His-10 foi usado como controle endógeno*

3.1.7 Equipamentos

Os equipamentos utilizados no trabalho foram:

Nanodrop® 2000, Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA), Centrífugas 5804 R, 5415 R, e 5424, Eppendorf (Hamburgo, Alemanha),

Homogeneizador vórtex mixer, Labnet (New Jersey, EUA), Freezer -80ºC modelo *advantage*, Incubadoras 20ºC e 15°C, Lupa OPTON Anatomic (Cotia, São Paulo, Brasil), Microscópio invertido AxioObserver Z1, Carl Zeiss MicroImaging (Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemanha), Termociclador *mastercycler nexus* gradiente (Eppendorf), RealTime PCR Applied Biosystems 7500 (Thermo Fisher Scientific), Espectrofotômetro *Spectramax,* Molecular Devices (San José, Califórnia, EUA), Precellys®, Bertin Instruments (Montigny-le-Bretonneux, França).

3.1.8 Material Descartável

Os plásticos utilizados no cultivo do *C. elegans,* como as microplacas de 6, 24 e 96 poços e os criotubos foram obtidos da Corning (*Corning Inc*., Nova Iorque, EUA). Os tubos de microcentrífuga de 0,6 e 1,5 mL, os tubos cônicos de 15 e 50 mL e as ponteiras de 0,01, 0,1 e 1 mL para micropipetas foram obtidos da Axygen (*Axygen Inc., Union City*, Califórnia, EUA). As placas de PCR em tempo real, o selante para placas e os tubos de rosca foram obtidos da Sarsted (*Sarsted AG & Co*., Numbrecht, Alemanha). As microesferas de zircônia foram obtidas da BioSpec (*BioSpec Products*, Inc., Bartlesville, EUA).

3.2 Métodos

3.2.1 Preparo das soluções dos químicos

O agente químico hidrossolúvel, PROP, foi diluído em meio M9. Os químicos lipossolúveis, DNCB, FA, 2-MBT e EU, foram solubilizados em meio M9 contendo até 1% de DMSO.

3.2.2 Cultura de *C. elegans*

Placas de Petri foram preparadas com NGM ágar. Um litro de ágar foi autoclavado a 120°C durante 45 minutos e deixados em uma câmara de fluxo laminar para esfriar. Após atingir a temperatura de 55°C, foram acrescentados: 1mL de solução de colesterol (5mg de colesterol/mL de etanol), 1mL de solução de $CaCl_2$ 1M, 1mL de solução de $MgSO_4$ 1M, 25mL de solução de KH_2PO_4 1M,

pH = 6,0 e 1mL de antibiótico estreptomicina 1mg/mL. Foram então adicionados 10 mL de ágar por placa.

Para a multiplicação da *Escherichia coli* OP50, foi usado o meio LB. A cepa de *E. coli* foi repicada em meio LB liquído acrescido de estreptomicina, por 18 horas, a 37°C, sob agitação constante. Foram adicionados 500 µl da suspensão de OP501 em cada placa NGM, aguardando-se cerca de 2 horas para o seu secamento em fluxo laminar. Em seguida 20µl de ovos sincronizados (descrito na sessão 3.2.3) foram adicionados sobre o meio contendo *E. coli*, e as placas foram incubadas a 15ºC.

3.2.3 Sincronização dos vermes

Vermes sincronizados foram usados para todos os testes biológicos. Para este fim, as placas contendo vermes adultos foram lavadas com 1 mL de meio M9 e os vermes transferidos para um tubo cônico de 15 mL. À suspensão de vermes foram adicionados mais 4 mL de meio M9, 500 µL de NaOH 5M e 1 mL de hipoclorito de sódio a 2,5%. A suspensão foi homogeneizada em vórtex por no máximo 10 min, com pausas a cada 2 minutos até o rompimento completo dos vermes dando origem à suspensão de ovos. Essa suspensão foi então centrifugada a 1.800 x g durante 1 min, o sobrenadante foi descartado e ao sedimento foram adicionados 15 mL de meio M9. Foi feita uma nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 1mL. Após homogeneização, foram plaqueados 20 µl de suspensão de ovos em placas NGM + OP50, que depois foram incubadas a 20ºC por 48h para então serem iniciados os testes.

3.2.4 Curva de Crescimento das linhagens

Placas com aproximadamente 80% de confluência de hermafroditas das linhagens N2 Bristol, CL2166 e CF1553 foram sincronizadas e cerca de 50 ovos foram colocados por placa, que continha ágar NGM e OP50. Durante 4 dias, sempre no mesmo horário, as larvas, jovens adultos e adultos foram contados. O ensaio foi feito em triplicatas.

3.2.5 Estabelecimento da DL50 (Dose Letal de 50%)

Os vermes adultos sincronizados no dia zero foram transferidos após 48h para uma placa de 96 poços (12 animais/poço), em meio M9 contendo concentrações variadas dos químicos, por 24h a 20ºC. Após o tempo de incubação, foram contados os vermes mortos e vivos, chegando então à concentração responsável por matar 50% dos vermes para cada químico. Para a completa certeza da morte do animal, são feitos 3 toques sobre a cabeça do verme com o auxílio de uma alça de platina e, na ausência de movimento, o animal é considerado morto.

3.2.6 Testes de comportamento

3.2.6.1 Ensaio de tempo de vida

Os ensaios para avaliação do tempo de vida, também conhecidos como *Lifespan*, foram realizados a 20ºC, utilizando a linhagem selvagem N2 Bristol. Dessa forma, para cada grupo, foram transferidos 25 vermes em estágio L4/poço (para placas de 6 poços contendo ágar NGM, OP50, e o reagente FUdR (12 µg/mL), que inibe o crescimento da progênie, além do químico a ser testado na DL50. A cada dois dias foi verificada a sobrevivência dos vermes, sendo os mortos retirados da placa.

3.2.6.2 Postura e Viabilidade de ovos

Doze vermes, no dia 1 de vida adulta, por grupo, da linhagem N2 Bristol, foram colocados individualmente em um poço de placa de 24 poços, contendo 1 mL de NGM, uma camada de *E. coli* OP50 e o químico na DL50. Os vermes foram mantidos a 20ºC e transferidos diariamente para um novo poço e o número de ovos postados foi contado e registrado, com o auxílio de uma lupa. A postura dos ovos foi monitorada durante 7 dias e a quantidade total de ovos depositados por verme foi utilizada para compor a média de cada grupo e permitir a comparação entre eles. A viabilidade dos ovos foi determinada através da porcentagem de ovos que eclodiram após 24h.

3.2.6.3 Bombeamento de Faringe

Dez vermes por grupo, nos dias 1 ou 2 de vida adulta, da linhagem N2 Bristol, foram colocados em placas NGM contendo ou não os químicos testados. As placas foram incubadas em estufa a 20ºC, e após 48h, o número total de bombeamentos por verme foi determinado, com o auxílio de uma lupa. Foi realizada uma medida de duas contagens independentes de 10 segundos para cada animal. Ao final, foi feita a média desses valores e multiplicada por seis, para que a taxa de bombeamento pudesse ser expressa por minuto. Este experimento foi realizado em triplicatas.

3.2.7 Avaliação da emissão de fluorescência das linhagens geneticamente modificadas quando expostas aos químicos

3.2.7.1 Padronização do tempo de exposição dos vermes aos químicos

Os vermes adultos sincronizados no dia zero foram transferidos após 48h para uma placa de 96 poços (12 animais/poço) preta com fundo transparente, em meio M9, contendo os químicos na concentração determinada DL50, pelos tempos considerados de curta exposição (15 min, 30 min, 1h, 2h, 4h), média exposição (10h) e longa exposição (24h, 32h e 48h). A placa foi mantida a 20ºC e, ao final de cada tempo, foi medida a intensidade de fluorescência no comprimento de onda de 525nm, no leitor *Spectramax*.

3.2.7.2 Análise por microscopia de fluorescência

Os vermes adultos sincronizados no dia zero foram transferidos, após 48h, para uma placa de 96 poços preta com fundo transparente (8 a 10 animais/poço), que continha os químicos na concentração e por tempo padronizados. Após a incubação a 20ºC, os vermes foram fotografados no microscópio invertido de fluorescência, no aumento de 5X. As imagens foram analisadas posteriormente, como descrito no item 3.2.7.2.1., para avaliação da fluorescência emitida pelos vermes expostos aos diferentes químicos. No momento da aquisição da imagem foi adicionado acetato de sódio 2% para imobilização dos vermes.

3.2.7.2.1 Análise das imagens

Pelo menos 5 vermes de cada poço foram fotografados. O ensaio foi realizado em triplicatas, totalizando um n=15 por condição. As imagens adquiridas como descrito no item 3.2.7.2 foram analisadas, utilizando o software ImageJ Fiji, que nos permite determinar a intensidade média ou densidade integrada de fluorescência de cada verme.

3.2.8 Análise de expressão dos genes alvos avaliados

3.2.8.1 Extração de RNA

Aproximadamente 80 vermes por grupo, previamente incubados com os químicos nos tempos determinados, foram adicionados em tubos com tampa de rosca contendo 1 mL de TRIzol ® e microesferas de zircônia. Os tubos foram mantidos sob agitação no equipamento Precellys durante 1 min e 15 segundos (divididos em dois ciclos de 30 segundos em agitação e 15 segundos de pausa) para romper os vermes e lisar suas células. As amostras foram centrifugadas a 14000 x g por 10 minutos, a 4ºC, e o sobrenadante transferido para um novo tubo ao qual foram adicionados 200µl de clorofórmio. Essa mistura foi mantida sob agitação leve por 15 segundos e, após 3 min à temperatura ambiente, seguiu-se nova centrifugação a 14000 x g, por 15 minutos a 4ºC. O próximo passo foi retirar 500µl da fase aquosa superior de cada amostra e transferir para um novo tubo. Foram então adicionados 500µl de isopropanol e as amostras homogeneizadas e incubadas por 10 min à temperatura ambiente. Em seguida, foi feita nova centrifugação (14000 x g, 10 minutos, a 4ºC) e os sobrenadantes foram vertidos em novo tubo para receber 250µl de etanol 75%. As amostras foram homogeneizadas, antes de serem submetidas a mais uma centrifugação (7500 x g, 5 minutos, 4ºC). Dessa vez, o sobrenadante foi vertido em papel absorvente. O material sedimentado contendo o RNA foi deixado secar por alguns minutos. Após a secagem foram adicionados 50µl de água autoclavada livre de RNAse e os tubos incubados a 60ºC por 10 minutos. O RNA então foi quantificado pelo método de absorbância no aparelho NanoDrop, sendo

considerado de boa qualidade quando a relação A_{260}/A_{280} estava entre 1,8 e 2,0. As amostras de RNA foram então armazenadas a -80ºC.

3.2.8.2 Síntese de cDNA e RealTime PCR

A PCR em tempo real (RT-PCR) foi conduzida com o *kit High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) da seguinte maneira: 1 µg de RNA total, 1 µL *RT Buffer* (10x), 0,4 µL dNTP (100 mM), 0,5 µL *RT primer mix* (1 µM de cada *stem-loop primer* específico), 0,25 µL oligo-dT (100 µM), 0,5 µL *Multiscribe RT* (50U/ µL) e água livre de RNAse para um volume total de reação de 20 µL. A programação utilizada no termociclador foi: 16°C- 30 min, 37°C- 2 h, 85°C- 10s, e 4°C – por 1 hora, quando então são retirados os tubos para armazenamento em freezer -20°C.

Para a realização da PCR em tempo real foram utilizadas sequências de *primers* e parâmetros experimentais definidos previamente pelo grupo do Prof. Dr. Marcelo Alves da Silva Mori, LaBE – UNICAMP, e com base em dados da literatura (Shih, 2019; Zhao, 2018; Zhou, 2018; Ferraz, 2016; Jeong, 2010; Martinez-Finley, 2010; Nishi, *et al*., 2009; Pujol, 2008). O gene utilizado como controle endógeno foi o *his-10*. Utilizamos na reação 100 nM de cada *primer* (senso e antisenso), 4µl de cDNA e 4µl de *SYBR-Green Master Mix* (1x), para um volume final de reação de 10 µL. A expressão gênica foi avaliada em um sistema de detecção e sequências ABI 7500 (*Applied Biosystems*) sob as seguintes condições: 50°C- 2 min, 95°C- 10 min, e 40 ciclos de 95°C- 15s, 60°C- 20s, e 72°C- 30s.

3.2.9 Análise estatística dos resultados

As análises estatísticas foram realizadas com o programa *GraphPad Prism*, versão 7.0 (*GraphPad Software*, La Jolla, CA, USA). Os dados foram analisados pelo teste de variância de uma via (do inglês, *one-way ANOVA*) seguido pelo pós-teste de *Tukey* para comparação múltipla. A diferença entre as amostras foi considerada estatisticamente significante quando *p* foi menor que 0,05 ($p<0,05$).

4.RESULTADOS

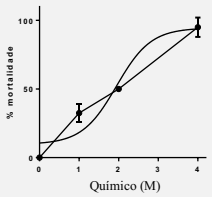
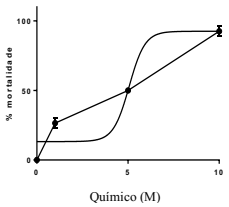
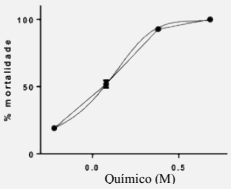
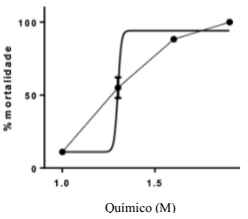
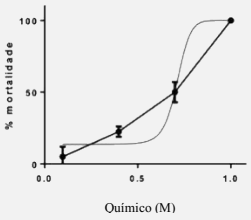
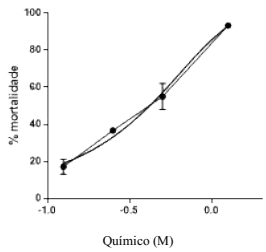
Inicialmente cabe destacar que os experimentos foram iniciados após a aprovação do projeto pela Comissão Interna de Biossegurança (CiBio) (N° 02/2017) (Anexo 01) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) (N° 5590240417) (Anexo 02) da UNIFESP. Foram feitos estoques de todas as linhagens em ultra freezer (-80ºC). O cultivo que objetivou a manutenção das linhagens foi mantido em estufa a 15°C, enquanto nos experimentos as placas foram cultivadas em estufa a 20°C. Em todos os ensaios os vermes foram sincronizados antes de iniciar os testes.

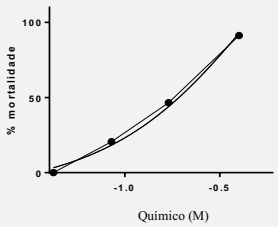
4.1 Determinação da concentração responsável por 50% de letalidade (DL50).

Como primeiro passo, foi determinada a dose letal de 50%, ou DL50, de cada químico para a linhagem selvagem N2 bristol. Para isso, os vermes foram sincronizados e colocados em placa de 96 poços contendo concentrações crescentes dos químicos (n=12/poço, em triplicatas). Após 24h foram contados os vermes mortos em cada poço até que foi determinada a concentração responsável por matar 50% dos vermes. Foi obtida uma curva de mortalidade para cada situação, analisada estatisticamente por regressão não linear.

Os resultados obtidos são apresentados na **Tabela 3**, onde o DMSO (dimetilsulfóxido), veículo empregado na dissolução dos químicos, foi utilizado como controle negativo, o H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), como controle positivo, e os químicos testados foram: DNCB (dinitroclorobenzeno) - sensibilizador extremo, FA (formaldeído) - sensibilizador forte, 2MBT (β-mercaptobenzotiazol) – sensibilizador moderado, EU (eugenol) – sensibilizador fraco e PROP (isopropanol) – irritante

Tabela 3: Determinação da DL50 de agentes químicos para a linhagem selvagem N2 Bristol

Químico	DL50 (M)	95%CI (M)	Valor R^2	Gráfico
DMSO	$1,95x10^{-3}$	$0,81x10^{-3}$ a $2,77x10^{-3}$	0,9193	
H_2O_2	$5,10x10^{-3}$	$4,33x10^{-3}$ a $5,80x10^{-3}$	0,9213	
DNCB	$1,17x10^{-3}$	$1,02x\ 10^{-3}$ a $1,24x10^{-3}$	0.9984	
FA	$2,00\ x\ 10^{-3}$	$1,966x10^{-3}$ a $2,250x10^{-3}$	0,9851	
2MBT	$4,95x10^{-3}$	$4,71x10^{-3}$ a $5,45x10^{-3}$	0.9604	
EU	$3,18x10^{-3}$	$2,22x10^{-3}$ a $4,57x10^{-3}$	0.9101	

PROP	$2,17x10^{-1}$	$2,01x10^{-1}$ a $2,86x10^{-1}$	0.9703	

* **DL50 (M):** valor da concentração responsável por 50% de letalidade em molaridade. **IC** (Intervalo de Confiança): **R^2:** Valor obtido após análise por regressão não linear das curvas de mortalidade.

4.2 Testes de Comportamento

A partir da determinação da DL50 para os químicos, foi possível a realização de três testes que avaliam o comportamento do *C. elegans* na presença dos químicos*:* sobrevivência (*lifespan)*, postagem e viabilidade de ovos e bombeamento de faringe.

4.2.1. Tempo de vida

O teste que avalia o tempo de vida dos nematóides foi realizado utilizando placas contendo meio acrescido de um inibidor de mitose e os químicos na concentração letal de 50%. Os vermes na fase L1 foram distribuídos em placas e as contagens de vivos e mortos foram realizadas a cada 2 dias durante o experimento, que durou em média 30 dias. Pode-se observar que os vermes expostos aos químicos, **Figura 6**, apresentaram morte precoce em relação à exposição ao veículo e na ausência de químico, controles negativos do ensaio. Os poços contendo vermes incubados com o veículo DMSO ou na ausência de químico apresentaram 100% de morte no 31º dia do experimento. Já naqueles em que os vermes foram incubados com o DNCB, assim como com o controle positivo H_2O_2, isso ocorreu no 23º dia. Quando os vermes foram incubados com FA, 100% de morte ocorreu no 24º dia. Com o químico 2MBT, 100% de morte foi observada no dia 28, com o químico EU, no dia 30, e para PROP, no dia 31. Avaliando o 23º dia de experimento, os químicos DNCB (5,655 ± SD 6,967%), FA (1,190 ± SD 2,381%) e controle positivo (9,439 ± 7,024%) mostraram uma diferença estatística de $p<0,0001$ se comparado com o veículo DMSO (72,472 ± SD 6,404%). Para os químicos 2MBT (50,417 ± SD 16,798%) e EU (68,910 ±

SD 10,039%), p<0,01. Não foi observada diferença estatística entre o irritante PROP (73,551 ± SD 12,446%) e o veículo.

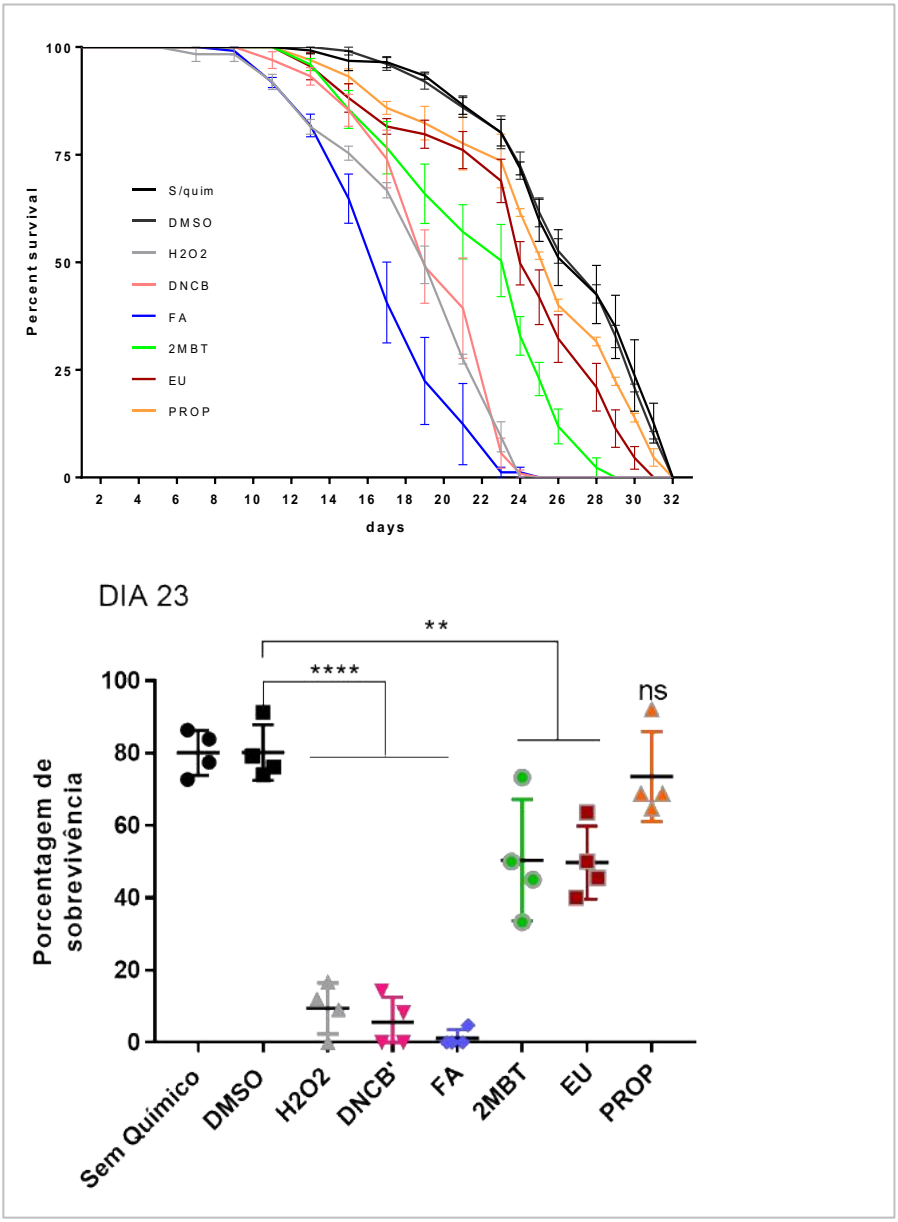


Figura 6: Ensaio de tempo de vida: Foram sincronizados vermes N2 Bristol no dia 0 e, após 12h, as larvas L1 foram colocadas em placas contendo os químicos na DL50 e o inibidor de mitose FuDR. A cada 2 dias foram contados os vermes vivos e mortos, n=25/poço. Ensaio feito em quadruplicata e realizado 3 vezes de forma independente. *One-way ANOVA* – pós-teste de *Tukey*.

4.2.2. Postura e viabilidade de ovos

Para o teste de postura e viabilidade de ovos, que avalia a fertilidade dos vermes, os nematoides foram sincronizados no dia 0 e, após 24 horas, no dia 1 de vida adulta, foi colocado apenas 1 animal em cada poço de uma placa de 24

poços contendo meio acrescido ou não de um ou outro químico. A contagem de ovos foi feita a cada dia, por 7 dias, após a transferência do animal para um novo poço. Na **Figura 7A**, observamos que nos dias 2 e 3 de vida adulta, os animais cultivados em presença do controle positivo H_2O_2 postaram menos ovos (dia 2 = 72,0 ± SD 2,9 ovos; dia 3 = 57,8 ± SD 5,0 ovos), quando comparados com os controles negativos, DMSO (dia 2 = 85,5 ± SD 5,8 ovos; dia 3 = 87,3 ± SD 5,3 ovos) e nenhuma adição de químico (dia 2 = 93,0 ± SD 3,7 ovos; dia 3 = 85,5 ± SD 3,7 ovos). A diferença estatística encontrada quando comparamos o controle positivo com os controles negativos, nos dias 2 e 3, foi de $p<0,0001$. Na **Figura 7B**, são mostrados os resultados obtidos no dia 3 do experimento, para todos os químicos DNCB (56,0 ± SD 5,4 ovos), FA (28,8 ± SD 6,4ovos), 2MBT (59,0 ± SD 8,7), EU (48,0 ± SD 7,2 ovos) e PROP (53,0 ± SD 6,1 ovos), comparados com os controles negativos. A viabilidade dos ovos foi mensurada pelo número de ovos que eclodiram e foi de 100% para todos os casos em todos os dias.

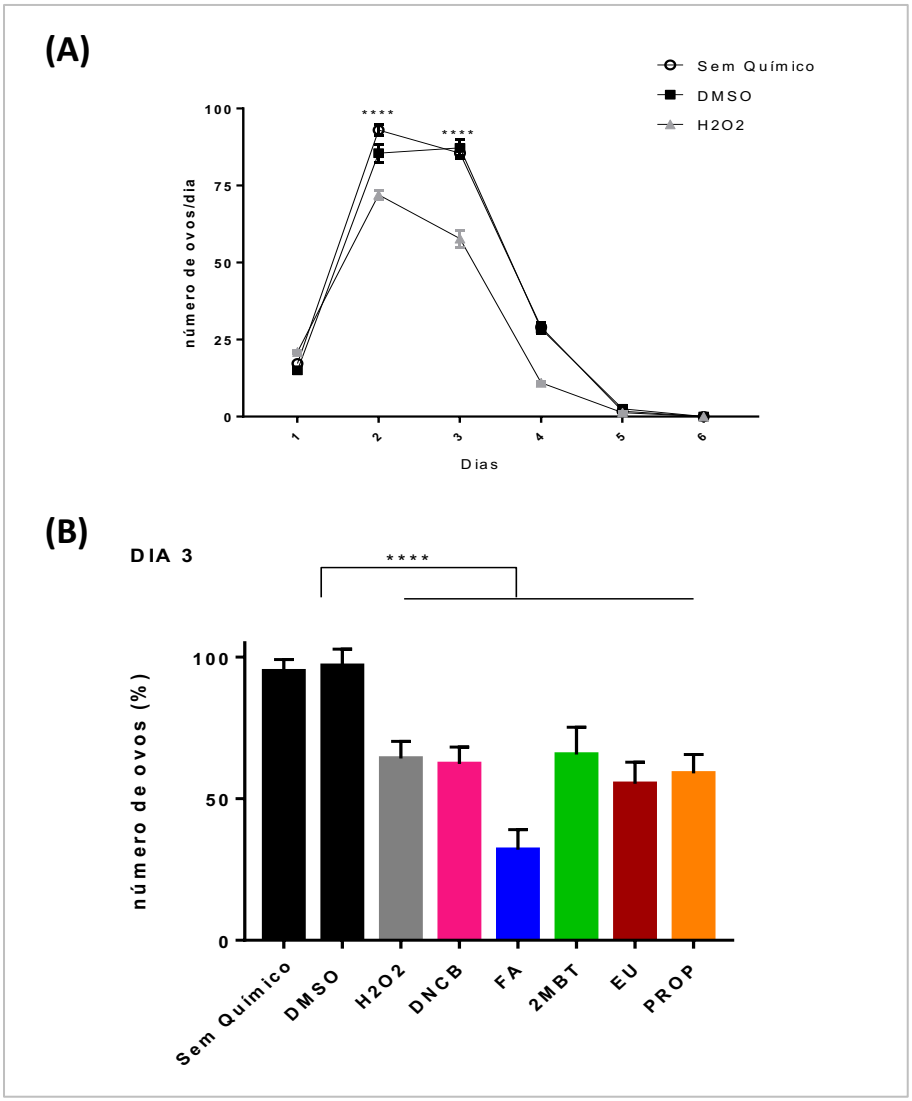


Figura 7: Ensaio de Postura e Viabilidade de ovos: Foram sincronizados vermes N2 Bristol no dia 0 e, no dia 1 da vida adulta, foi colocado 1 verme por poço de uma placa de 24 poços, que continha meio de cultivo + químicos. Os vermes foram transferidos de poço, de forma a permitir a contagem de ovos postados a cada dia para cada animal. Esse procedimento se repetiu por mais 6 dias. Em (A) observamos os números de ovos por dia para cada controle e em (B) o número de ovos total postados no dia 3 do experimento em cada condição. N=12/poço. O ensaio foi realizado em triplicatas e 3 vezes de forma independente. *One-way anova* – pós-teste de *Tukey*.

4.2.3. Bombeamento de Faringe

O teste de bombeamento de faringe avalia a capacidade de se alimentar do verme, que sabidamente é alterada em presença de agente estressor (Schüler, 2015). Os animais foram sincronizados e distribuídos em placas preparadas com meio contendo ou não cada um dos químicos. Após 48h, foram contados os bombeamentos da faringe de cada animal por minuto. Com os dados apresentados na **Figura 8**, podemos notar a diferença dos químicos sensibilizadores DNCB (109,6 ± SD 5,1 bombeamentos), FA (124,8 ± SD 5,4 bombeamentos) e 2MBT (144,2 ± SD 2,6 bombeamentos) quando comparados com os controles negativos, s/químico (197,6 ± SD 3,1 bombeamentos) e DMSO (190,6 ± SD 6,5 bombeamentos) ($p<0,0001$). Para o químico sensibilizador EU (157,6 ± SD 3,7 bombeamentos) a diferença foi menor ($p<0,001$), e para o químico irritante PROP (198,6 ± SD 2,3 bombeamentos), não houve diferença estatística.

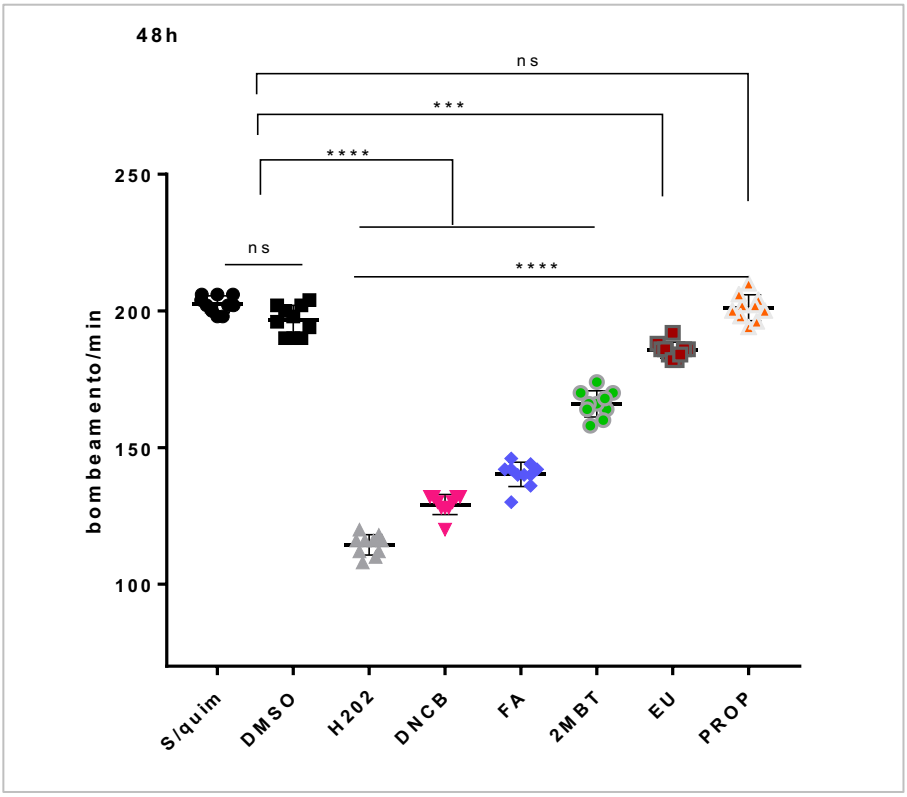


Figura 8: Ensaio de Bombeamento de faringe: Foram sincronizados vermes N2 Bristol e, no dia 1 de vida adulta, os vermes foram colocados em ágar NGM contendo ou não os químicos. O bombeamento de faringe por minuto foi contado após 48h, n=10/poço. O ensaio foi realizado em triplicatas e 3 vezes de forma independente. *One-way ANOVA* – pós-teste de *Tukey.*

4.3 Teste para avaliação da ativação de proteínas relacionadas com injúria cutânea

Na pesquisa de *C. elegans*, a ativação transcricional de um promotor é frequentemente usada como uma leitura da atividade de uma proteína (Detienne, 2016). Dito isso, para a realização dos próximos testes, utilizamos linhagens de *C. elegans* geneticamente modificadas, que possuem a proteína verde fluorescente (GFP, do inglês *Green Fluorescent Protein*) como gene repórter de expressão de proteínas importantes no combate à injúria cutânea. Foram utilizadas seis linhagens: CF1553, que possui o GFP acoplado ao promotor *sod3,* que é ativado pela proteína DAF-16, que faz parte da via de sinalização JNK; CL2166, que possui o GFP acoplado ao promotor *gst4* que é ativado pela proteína SKN-1, proteína que participa da via de sinalização p38 PMK1-MAPK; AA278, o GFP nesta linhagem está acoplado ao gene de DAF-9, proteína ativada pela via de sinalização insulina-IGF; BW1935, linhagem com GFP acoplado ao gene de DBL-1, uma proteína que faz parte da via de sinalização de TGF-β; CH1445, que possui o GFP acoplado ao gene de BLI-1, uma proteína análoga ao colágeno, e por fim a linhagem IG274, que possui o GFP acoplado ao gene do peptídeo antimicrobiano NLP-29, que é ativado pela via de sinalização p38 PMK1-MAPK. Para avaliação da ativação das proteínas de interesse, foram realizados experimentos prévios para o estabelecimento das condições apropriadas para o ensaio propriamente dito, os quais reportamos a seguir.

4.3.1 Curva de crescimento das linhagens geneticamente modificadas

Foram selecionadas ao acaso, duas das seis linhagens geneticamente modificadas, CF1553 e CL2166, para serem comparadas com a cepa selvagem N2 Bristol, com o objetivo de verificar se apresentavam alguma diferença em seu ciclo de vida. Para isso, avaliamos o tempo de desenvolvimento de larva (L1 a L4) até verme adulto para cada linhagem.

As quantidades de larvas, jovens adultos e adultos foram contadas diariamente, por um período de 4 dias a partir do cultivo de 50 ovos por linhagem.

Como pode ser observado na **Figura 9**, não houve diferença significativa no ciclo de vida e crescimento entre as linhagens.

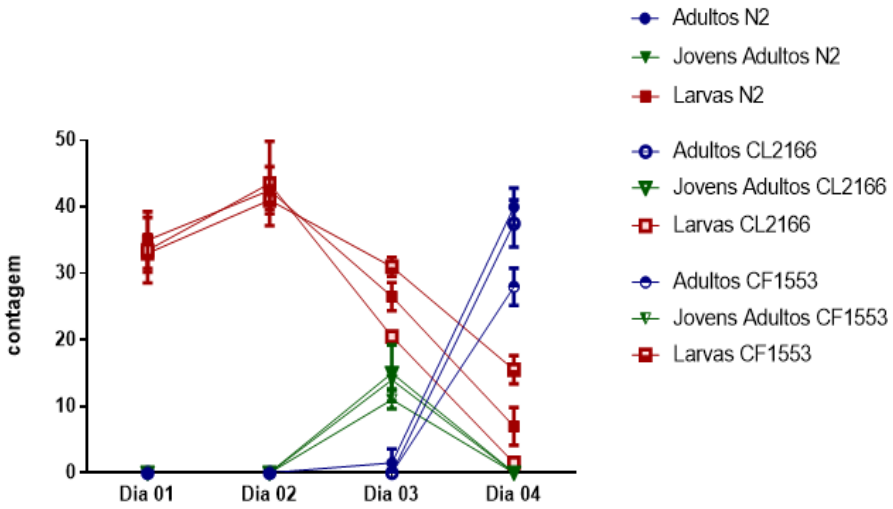


Figura 9: Curvas de crescimento: As linhagens N2 Bristol, CL2166 e CF1553 foram sincronizadas no dia 0 e incubadas a 20ºC. Foram feitas as contagens de larvas (em vermelho), jovens adultos (em verde) e adultos (em azul) por 4 dias, sempre no mesmo horário. N=50 ovos/placa. O ensaio foi realizado em triplicatas, 3 vezes de forma independente. *One-way ANOVA* – pós-teste de *Tukey*.

4.3.2 Determinação da DL50 de agentes químicos para as linhagens geneticamente modificadas.

Assim como foi realizado para a linhagem selvagem N2 Bristol, foi determinada a DL50 de todos os químicos para as linhagens geneticamente modificadas a serem utilizadas no estudo. Foi feita análise estatística por regressão não linear. Os resultados obtidos para cada uma das linhagens são apresentados nas **Tabelas 4 a 10**, mostradas abaixo.

Tabela 4: Determinação da DL50 do químico DMSO para as linhagens geneticamente modificadas.

DMSO	DL50 (M)	Intervalo de confiança 95% (M)
CL2166 *pgst4*::GFP	$2{,}05\times10^{-3}$	$1{,}83\times10^{-3} – 3{,}14\times10^{-3}$
IG274 *nlp-29*::GFP	$2{,}05\times10^{-3}$	$1{,}76\times10^{-3} – 2{,}87\times10^{-3}$
CF1553 *psod3*::GFP	$2{,}05\times10^{-3}$	$1{,}64\times10^{-3} – 2{,}59\times10^{-3}$
CH1445 *bli-1*::GFP	$2{,}05\times10^{-3}$	$1{,}38\times10^{-3} – 3{,}22\times10^{-3}$
BW1935 *dbl-1*::GFP	$2{,}05\times10^{-3}$	$1{,}81\times10^{-3} – 2{,}98\times10^{-3}$
AA278 *daf-9*::GFP	$2{,}05\times10^{-3}$	$1{,}73\times10^{-3} – 3{,}14\times10^{-3}$

Tabela 5: Determinação da DL50 do químico H_2O_2 para as linhagens geneticamente modificadas.

H_2O_2	DL50 (M)	Intervalo de confiança 95% (M)
CL2166 *pgst4*::GFP	$0{,}25\times10^{-3}$	$0{,}12\times10^{-3} – 0{,}58\times10^{-3}$
IG274 *nlp-29*::GFP	$0{,}30\times10^{-3}$	$0{,}18\times10^{-3} – 0{,}63\times10^{-3}$
CF1553 *psod3*::GFP	$0{,}25\times10^{-3}$	$0{,}14\times10^{-3} – 0{,}42\times10^{-3}$
CH1445 *bli-1*::GFP	$0{,}25\times10^{-3}$	$0{,}16\times10^{-3} – 0{,}71\times10^{-3}$
BW1935 *dbl-1*::GFP	$0{,}25\times10^{-3}$	$0{,}15\times10^{-3} – 0{,}64\times10^{-3}$
AA278 *daf-9*::GFP	$0{,}25\times10^{-3}$	$0{,}18\times10^{-3} – 0{,}72\times10^{-3}$

Tabela 6: Determinação da DL50 do químico DNCB para as linhagens geneticamente modificadas.

DNCB	DL50 (M)	Intervalo de confiança 95% (M)
CL2166 *pgst4*::GFP	$2{,}28\times10^{-3}$	$1{,}33\times10^{-3} – 3{,}52\times10^{-3}$
IG274 *nlp-29*::GFP	$2{,}30\times10^{-3}$	$1{,}87\times10^{-3} – 3{,}21\times10^{-3}$
CF1553 *psod3*::GFP	$2{,}62\times10^{-3}$	$1{,}74\times10^{-3} – 3{,}43\times10^{-3}$
CH1445 *bli-1*::GFP	$2{,}50\times10^{-3}$	$1{,}98\times10^{-3} – 3{,}03\times10^{-3}$
BW1935 *dbl-1*::GFP	$2{,}30\times10^{-3}$	$1{,}64\times10^{-3} – 3{,}11\times10^{-3}$
AA278 *daf-9*::GFP	$2{,}30\times10^{-3}$	$1{,}59\times10^{-3} – 2{,}97\times10^{-3}$

Tabela 7: Determinação da DL50 do químico FA para as linhagens geneticamente modificadas.

FA	DL50 (M)	Intervalo de confiança 95% (M)
CL2166 *pgst4*::GFP	$4{,}01\times10^{-2}$	$4{,}00\times10^{-2} – 4{,}04\times10^{-2}$
IG274 *nlp-29*::GFP	$4{,}06\times10^{-2}$	$3{,}87\times10^{-2} – 4{,}18\times10^{-2}$
CF1553 *psod3*::GFP	$4{,}93\times10^{-2}$	$4{,}54\times10^{-2} – 5{,}89\times10^{-2}$
CH1445 *bli-1*::GFP	$4{,}00\times10^{-2}$	$3{,}91\times10^{-2} – 4{,}32\times10^{-2}$
BW1935 *dbl-1*::GFP	$4{,}00\times10^{-2}$	$3{,}85\times10^{-2} – 4{,}20\times10^{-2}$
AA278 *daf-9*::GFP	$4{,}00\times10^{-2}$	$3{,}96\times10^{-2} – 4{,}49\times10^{-2}$

Tabela 8: Determinação da DL50 do químico 2MBT para as linhagens geneticamente modificadas.

2MBT	DL50 (M)	Intervalo de confiança 95% (M)
CL2166 *pgst4*::GFP	$2{,}55\times10^{-3}$	$2{,}24\times10^{-3} – 4{,}79\times10^{-3}$
IG274 *nlp-29*::GFP	$2{,}55\times10^{-3}$	$1{,}86\times10^{-3} – 2{,}42\times10^{-3}$
CF1553 *psod3*::GFP	$2{,}55\times10^{-3}$	$2{,}01\times10^{-3} – 3{,}21\times10^{-3}$
CH1445 *bli-1*::GFP	$2{,}55\times10^{-3}$	$1{,}98\times10^{-3} – 3{,}04\times10^{-3}$
BW1935 *dbl-1*::GFP	$2{,}55\times10^{-3}$	$1{,}75\times10^{-3} – 3{,}47\times10^{-3}$
AA278 *daf-9*::GFP	$2{,}55\times10^{-3}$	$2{,}01\times10^{-3} – 4{,}21\times10^{-3}$

Tabela 9: Determinação da DL50 do químico EU para as linhagens geneticamente modificadas.

EU	DL50 (M)	Intervalo de confiança 95% (M)
CL2166 *pgst4*::GFP	$0{,}50\times10^{-3}$	$0{,}39\times10^{-3} – 0{,}63\times10^{-3}$
IG274 *nlp-29*::GFP	$0{,}25\times10^{-3}$	$0{,}12\times10^{-3} – 1{,}89\times10^{-3}$
CF1553 *psod3*::GFP	$0{,}50\times10^{-3}$	$0{,}38\times10^{-3} – 0{,}87\times10^{-3}$
CH1445 *bli-1*::GFP	$0{,}50\times10^{-3}$	$0{,}34\times10^{-3} – 0{,}96\times10^{-3}$
BW1935 *dbl-1*::GFP	$0{,}25\times10^{-3}$	$0{,}11\times10^{-3} – 1{,}02\times10^{-3}$
AA278 *daf-9*::GFP	$0{,}25\times10^{-3}$	$0{,}09\times10^{-3} – 0{,}85\times10^{-3}$

Tabela 10: Determinação da DL50 do químico PROP para as linhagens geneticamente modificadas.

PROP	DL50 (M)	Intervalo de confiança 95% (M)
CL2166 *pgst4*::GFP	$1{,}70\times10^{-1}$	$0{,}54\times10^{-1} – 1{,}83\times10^{-1}$
IG274 *nlp-29*::GFP	$1{,}80\times10^{-1}$	$0{,}98\times10^{-1} – 1{,}98\times10^{-1}$
CF1553 *psod3*::GFP	$1{,}70\times10^{-1}$	$0{,}76\times10^{-1} – 1{,}90\times10^{-1}$
CH1445 *bli-1*::GFP	$1{,}70\times10^{-1}$	$0{,}86\times10^{-1} – 1{,}92\times10^{-1}$
BW1935 *dbl-1*::GFP	$1{,}70\times10^{-1}$	$0{,}65\times10^{-1} – 1{,}81\times10^{-1}$
AA278 *daf-9*::GFP	$1{,}70\times10^{-1}$	$0{,}92\times10^{-1} – 1{,}90\times10^{-1}$

4.3.3 Avaliação do melhor tempo de exposição do verme aos químicos

Com o objetivo de avaliar a toxicidade dos químicos por meio do aumento da atividade das vias de sinalização, foram feitos testes de detecção de ativação de fluorescência, utilizando-se as seis linhagens geneticamente modificadas. Inicialmente, estabelecemos o melhor tempo de exposição dos vermes aos químicos. Foram testados os tempos de 4h,10h, 24h, 32h e 48h para todas as linhagens, a fim de avaliar a toxicidade aguda, moderada e tardia. Exclusivamente para o gene NLP-29 (avaliado pela linhagem IG274) que,

sabidamente apresenta uma resposta rápida (Pujol, 2008), foram analisados também tempos mais curtos: 15min, 30min, 1h e 2h.

Ao final de cada tempo, foi feita uma leitura espectrofotométrica em comprimento de onda apropriado para a detecção de fluorescência. Para as quatro linhagens, AA278, BW1935, CH1448 e CF1553, mostradas na **Figura 10A**, não conseguimos observar qualquer correlação entre os vermes cultivados em presença de químico e a fluorescência. Contudo, na **Figura 10B**, pudemos observar que para a linhagem CL2166, que analisa o promotor de SKN1, no tempo de 24h, houve um aumento na detecção de fluorescência na presença dos químicos quando comparamos com os controles negativos, sendo possível observar uma correlação positiva entre a ativação de SKN-1 e toxicidade. Do mesmo modo, para a linhagem IG274, que analisa a ativação da proteína NLP-29, cujo tempo estabelecido foi de 4h de exposição, a presença dos químicos provocou uma fluorescência mais intensa, quando feita a comparação com o observado no controle negativo.

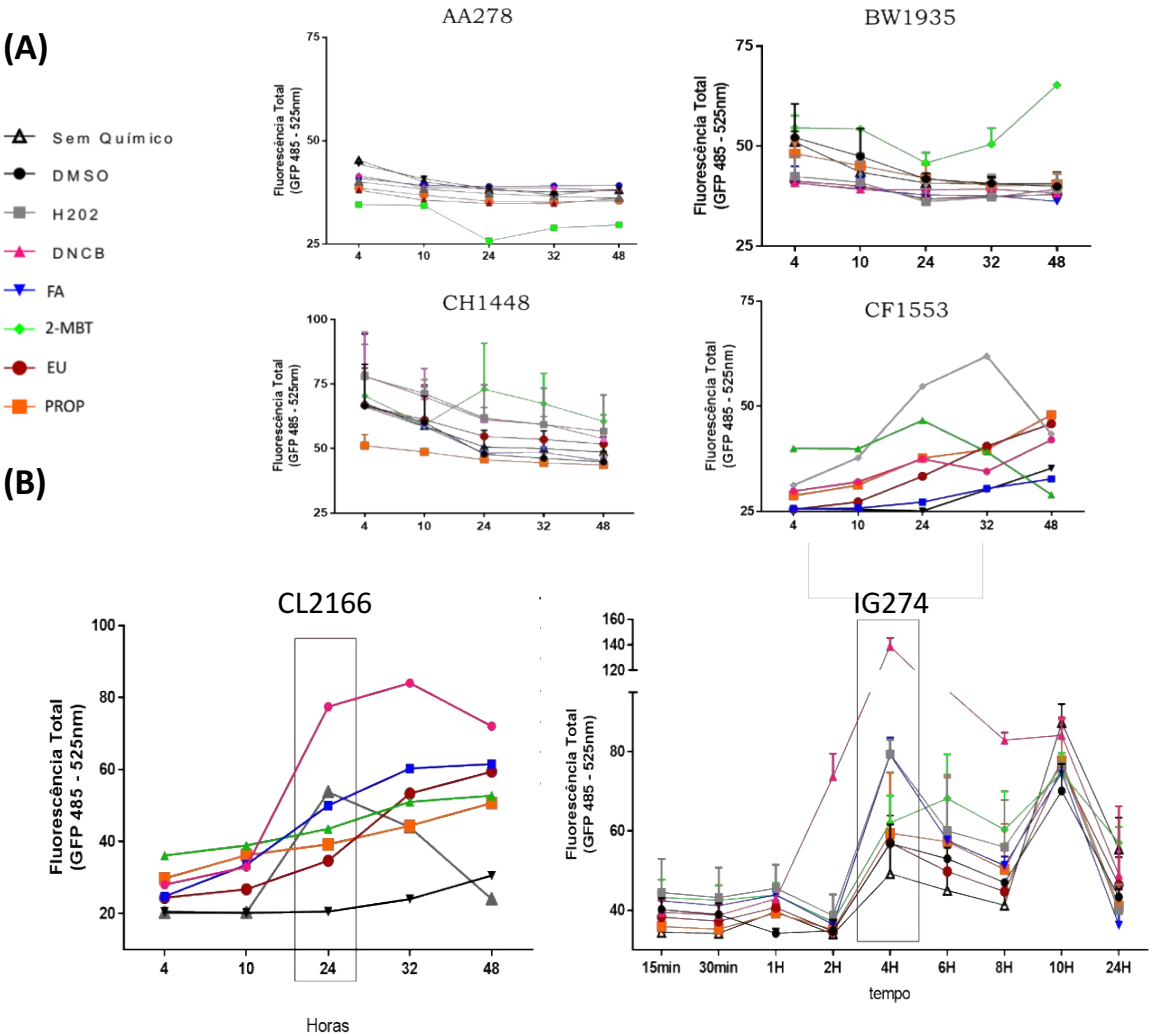


Figura 10: Avaliação do melhor tempo de exposição das linhagens geneticamente modificadas aos químicos: Foram sincronizados vermes de todas as linhagens. Em (A), os resultados para as linhagens AA278; CH1448; BW1935; CF1553. Em (B), os resultados para as linhagens CL2166 e IG274. Em todos os casos, os vermes foram incubados no dia 1 da vida adulta em placas de 96 poços preta com fundo transparente contendo o químico designado na concentração DL50. Foi avaliada intensidade de fluorescência de GFP (590nm) em diferentes tempos de incubação. N=10/poço. O ensaio foi feito em triplicatas e realizado 2 vezes de forma independente. *One-way ANOVA* – pós-teste de *Tukey*.

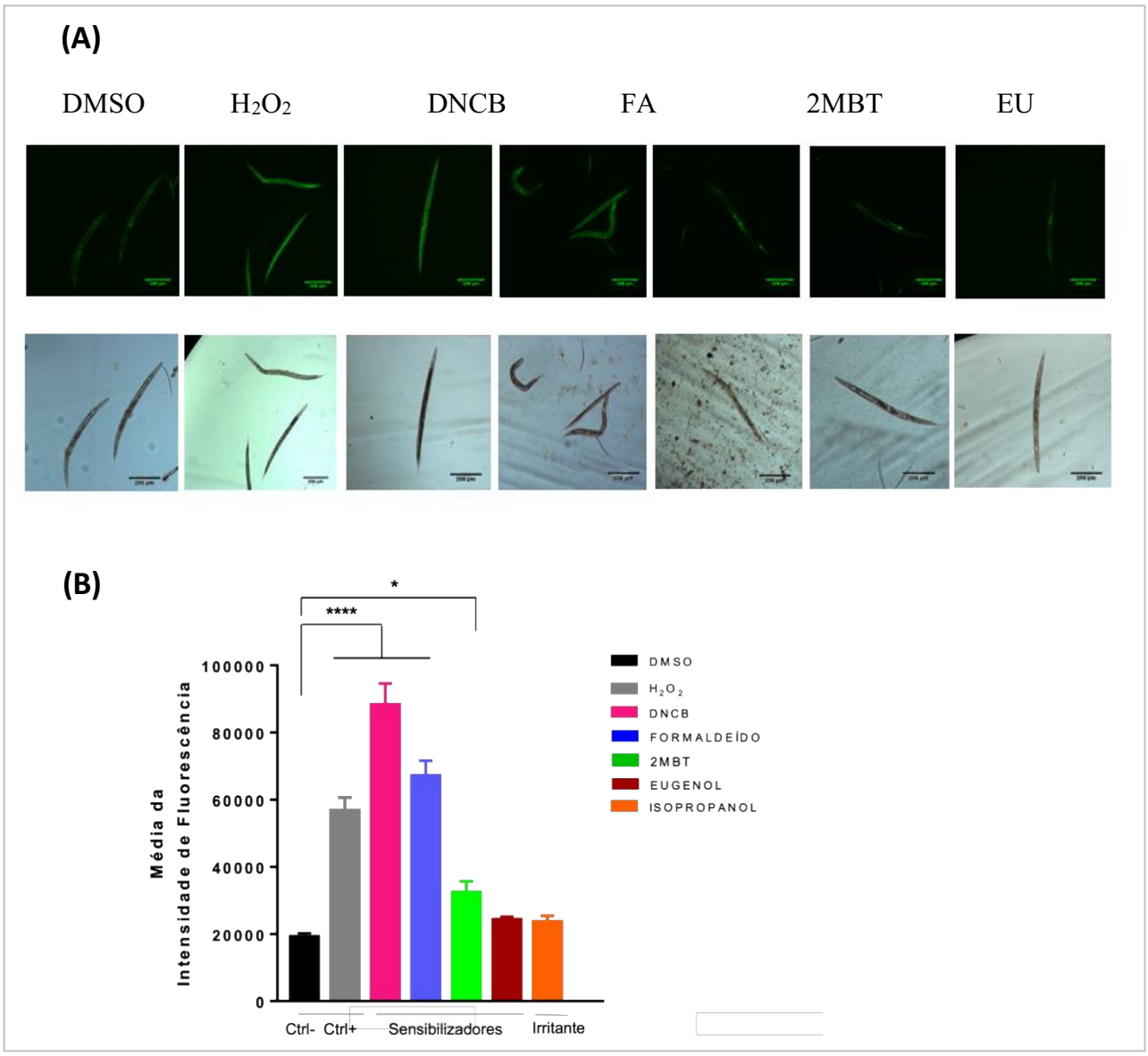
4.3.4 Análise da ativação do promotor de SKN-1 (*gst-4*) e de NLP-29 por microscopia de fluorescência.

Após determinarmos o melhor tempo de exposição dos vermes aos químicos nas seis linhagens, foram selecionadas para análise de microscopia fluorescente a CL2166 e a IG274, que apresentaram uma correlação positiva entre a intensidade de fluorescência e a toxicidade dos químicos. Para a linhagem CL2166, foi estabelecido o tempo de exposição de 24h e, para a linhagem IG274, o de 4h.

Nas **Figuras 11A** e **11B** são apresentados os resultados obtidos para a linhagem CL2166. Na **Figura 11A**, estão as imagens representativas para cada químico e, na **Figura 11B**, a análise individual da média de intensidade de fluorescência detectada em cada verme, em relação ao *background*. Com o resultado, foi possível observar que para os sensibilizadores extremo e forte, DNCB (88255 $\pm$ SD 4697) e FA (67047 $\pm$ SD 4122), respectivamente, houve um aumento significativo na intensidade de fluorescência detectada ($p<0,0001$). Já para o químico sensibilizador com potência moderada 2MBT (32318 $\pm$ SD 4173), o aumento observado foi menor, porém significativo ($p<0,01$). Para o EU (24215 $\pm$ SD 4507), sensibilizador de intensidade fraca, e para o PROP (23606 $\pm$ SD 4031), irritante, não houve diferenças estatísticas em relação ao controle negativo, DMSO.

Nas **Figuras 11C** e **11D**, mostramos os resultados obtidos para a linhagem IG274. Na **Figura 11C**, as imagens representativas para cada condição e, na **Figura 11D**, a análise estatística da fluorescência detectada em cada verme ajustada pelo *background* e em relação ao controle negativo. Observamos nesse caso que houve uma diferença estatística para todos os químicos testados, sensibilizadores e irritante, sendo a maior diferença para o DNCB, 79812 $\pm$ SD 6243 ($p<0,0001$); seguido de FA, 71386 $\pm$ SD 6722

(p<0,001); 2MBT, 60288 ± SD 6535; EU, 62988 ± SD 6923 e PROP, 62552 ± SD 6535 (p<0,01).



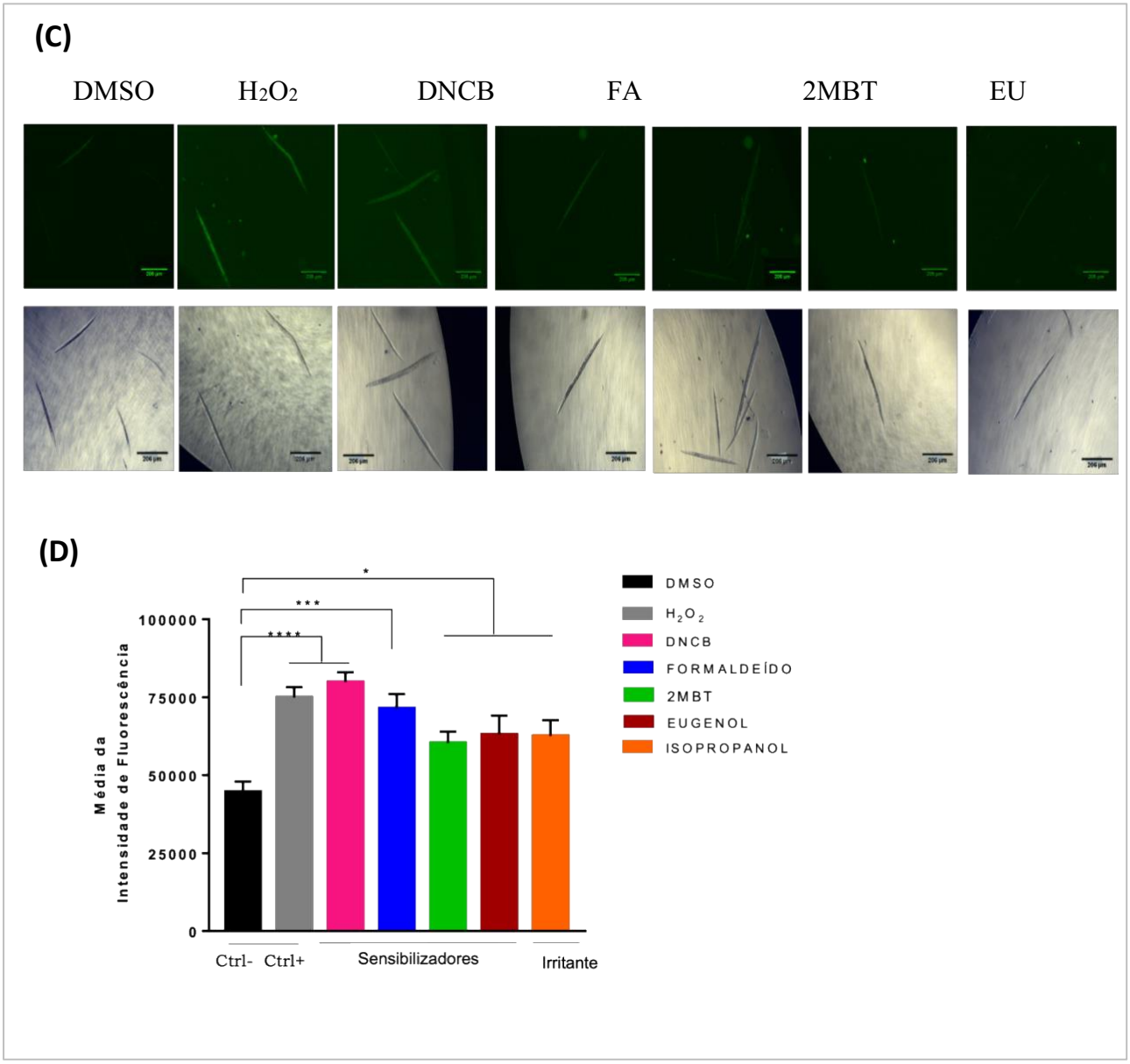


Figura 11: Análise da ativação do promotor de SKN-1 (*gst-4*) e de NLP-29 por microscopia de fluorescência: Foram sincronizados vermes das linhagens CL2166 e IG2744. No dia 1 da vida adulta, os vermes foram plaqueados em placa de 96 poços preta com fundo transparente contendo ou não os químicos na DL50 (5 vermes/poço). Após 4h (IG274) e 24h (CL2166), os vermes foram fotografados em microscópio de fluorescência, no aumento de 5x, em comprimento de onda de 525nm. Em (A), apresentamos imagens representativas da linhagem CL2166 exposta aos químicos, e, em (B), o gráfico correspondente mostrando a quantificação da intensidade de fluorescência média dos vermes em cada situação. Em (C), apresentamos imagens representativas da linhagem IG274 exposta aos químicos, e em (D) o gráfico correspondente, que mostra a quantificação da intensidade de fluorescência média dos vermes em cada situação. Total de 15 imagens por condição foram analisadas pelo software ImageJ e normalizadas pelo *background*. Ensaio feito em triplicatas e realizado 3 vezes de forma independente. *One-way ANOVA* – pós-teste de *Tukey*.

4.4 Análise da expressão gênica da via de sinalização p38 PMK1-MAPK.

Após as análises por fluorescência, avaliamos a expressão gênica (RNAm) dos principais genes envolvidos na via p38 PMK1-MAPK. Isso porque as duas linhagens, CL2166 e IG274, que permitiram detecção de toxicidade pela emissão de fluorescência do GFP observada no ensaio anterior, estão relacionadas com as proteínas SKN-1 e NLP-29, respectivamente, que fazem parte dessa mesma via de sinalização.

Os genes selecionados para serem avaliados foram: *nsy1; sek1; pmk1; sta2; nlp29; gst4* e *skn1.* Os tempos escolhidos foram de 3h (resposta aguda) e 20h (resposta tardia). Os vermes da linhagem selvagem N2 Bristol, após sincronização, foram plaqueados e expostos aos químicos na DL50. Ao final de cada tempo examinado, os vermes foram retirados dos poços para posterior lise e extração do RNAm. Após serem extraídas amostras de RNAm de boa qualidade, foi obtido o cDNA e com ele foram realizados ensaios de RealTimePCR. O controle endógeno utilizado foi o gene da histona 10 (HIS-10), e o controle interno do ensaio, o veículo DMSO. Os dados foram normalizados por ambos os controles. A sequência dos *primers*, bem como os parâmetros experimentais da reação foram definidos previamente e seguiram as seguintes referências: Shih, *et.al*., 2019; Zhao, *et.al*., 2018; Zhou, *et.al*., 2018; Jeong, *et.al*., 2010; Martinez-Finley, *et.al*., 2010; Pujol, *et.al*., 2008, destacando-se o trabalho publicado pelo grupo do Prof. Marcelo Mori, Ferraz, et al., 2016, que serviu como base para a realização desse experimento. Apresentamos os resultados obtidos individualmente nos dois experimentos realizados independentemente nas **Figuras 12** e **S1**. Na **Figura 12A,** apresentamos os dados adquiridos para os genes correspondentes ao início da via de sinalização, *nsy1; sek1 e pmk1*, nos dois tempos determinados, 3h e 20h, e na **Figura 12B**, são apresentados os dados para os genes correspondentes à fase final da via de sinalização, *sta2* e *nlp29* (3h); *gst4* e *skn1* (20h).

Assim, inicialmente, descrevendo os resultados para cada um dos genes encontrados em relação ao controle negativo, observamos que com a expressão do gene *pmk1* foi possível detectar a toxicidade de DNCB e FA nos dois tempos avaliados ($p<0,0001$) e, apesar de diferentes, a análise estatística dos resultados da exposição aos demais químicos mostrou não serem significativos.

Já com a expressão do gene *sek1* foi possível detectar a toxicidade de DNCB ($p<0,001$) nos dois tempos e de FA ($p<0,01$) somente no tempo de 20h. Para FA (3h), 2MBT, EU (3h) e PROP (3h), apesar da diferença encontrada, não houve significância estatística. Por fim para EU e PROP (20h) não foi detectada expressão gênica.

A expressão de *nsy1* após a exposição aos químicos foi baixa, porém ainda assim conseguimos detectar a toxicidade de DNCB ($p<0,01$) nos dois tempos. Para os demais químicos não foi detectada expressão do gene.

Com a expressão de *sta2* detectamos a toxicidade de DNCB ($p<0,0001$) e FA ($p<0,001$). Para EU e PROP a diferença encontrada não foi significativa e para 2MBT não foi detectada expressão gênica.

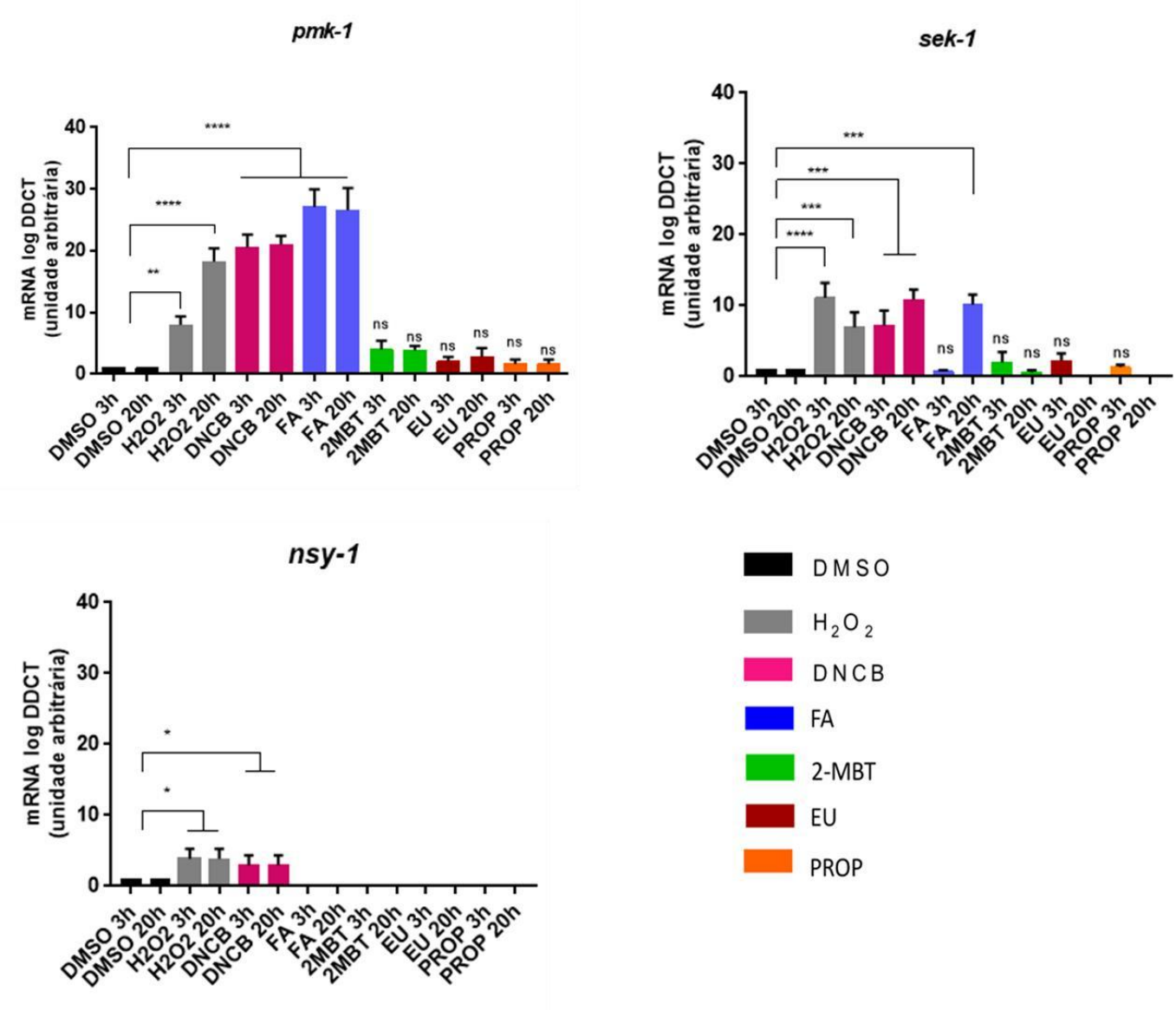
A expressão de *nlp29* foi observada após exposição ao DNCB ($p<0,001$) e FA ($p<0,0001$) e para os outros químicos, 2MBT, EU e PROP, a diferença encontrada não foi significativa.

A detecção da expressão do gene *gst4* foi significativa após exposição ao DNCB ($p<0,0001$) e ao FA ($p<0,001$); a diferença encontrada para 2MBT e PROP não foi significativa, e para EU não detectamos expressão.

Por fim, a avaliação da expressão do gene *skn1* também detectou apenas a toxicidade de DNCB ($p<0,001$) e FA ($p<0,01$) e para os outros químicos a diferença encontrada não foi significativa.

Em resumo, os dados nos mostram que, comparando com o controle negativo, para o químico sensibilizador extremo DNCB, assim como para o controle positivo H_2O_2, ocorreu um aumento de expressão no RNAm de todos os genes avaliados, nos 2 tempos. A presença do químico FA aumentou a expressão de quase todos os genes, exceto *nsy-1* e *sek-1* em 3h, e a presença dos químicos 2MBT, EU e PROP não promoveu aumento significativo da expressão gênica de nenhum dos genes testados, em nenhum dos tempos.

(A)


pmk-1
sek-1
nsy-1
mRNA log DDCT (unidade arbitrária)
DMSO 3h
DMSO 20h
H2O2 3h
H2O2 20h
DNCB 3h
DNCB 20h
FA 3h
FA 20h
2MBT 3h
2MBT 20h
EU 3h
EU 20h
PROP 3h
PROP 20h
ns
DMSO
H2O2
DNCB
FA
2-MBT
EU
PROP

(B)

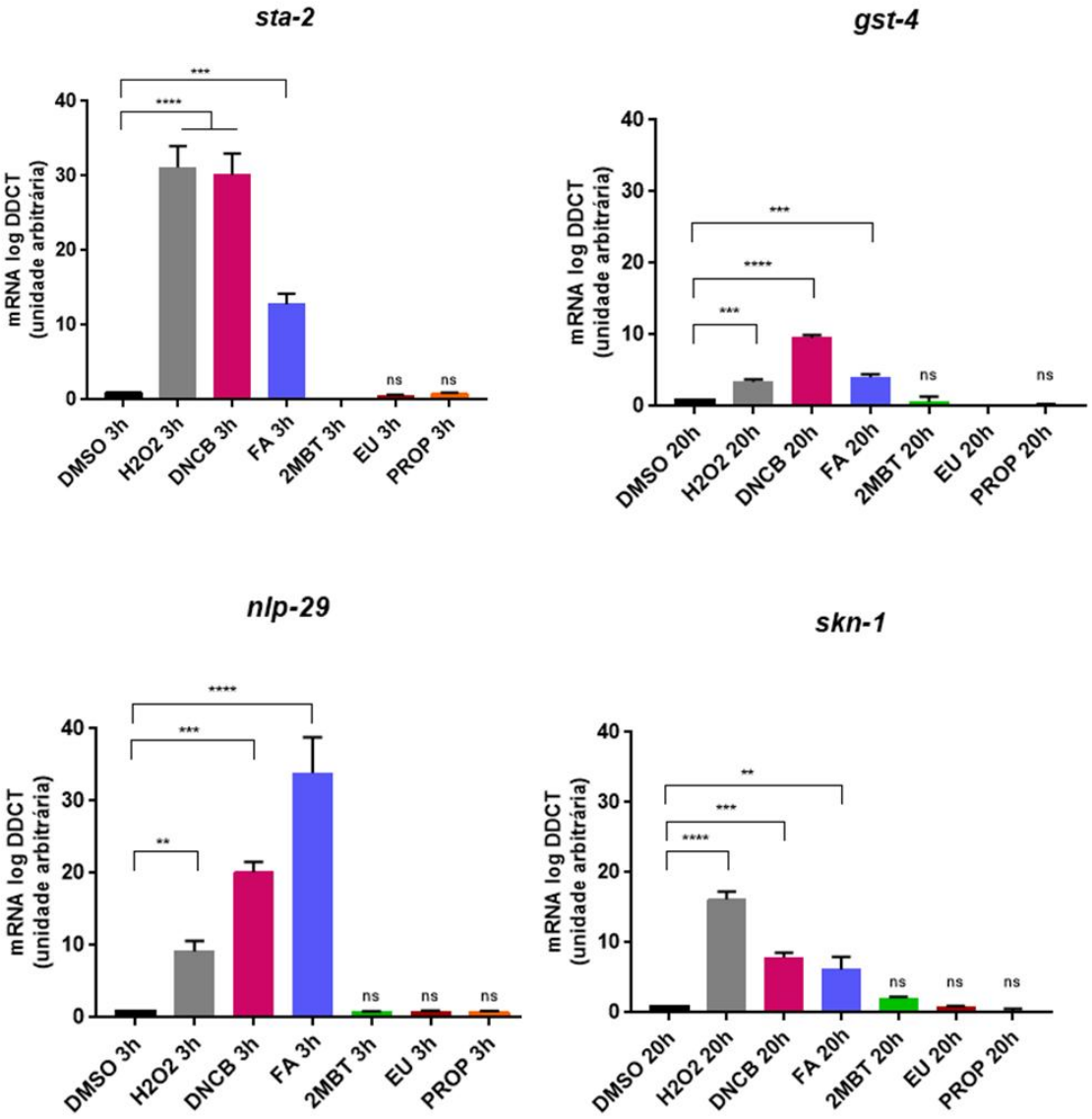


Figura 12: Análise da expressão gênica da via de sinalização p38 PMK1-MAPK: Vermes da linhagem selvagem N2 bristol foram incubados em placas de 96 poços preta com fundo transparente por 3h e/ou 20h com os químicos na DL50. Após a incubação, os vermes foram lisados e submetidos ao procedimento de extração de RNA por TRIzol. Foi obtido o cDNA para a realização do RealTimePCR, utilizando-se o reagente Sybr-green. Em (A), são apresentados os dados obtidos para os genes *nsy1; sek1; pmk1*. Em (B), são apresentados os dados obtidos para os genes *sta2; nlp29; gst4 e skn1*. O experimento foi feito em triplicatas e realizado 2 vezes de forma independente. O gráfico apresentado é referente a um dos experimentos. *One-way ANOVA* – pós-teste de *Tukey*. O gráfico está expresso em 2^(-DDCT).

4.5 Compilação dos Resultados

O panorama geral de resultados obtidos no trabalho é apresentado na tabela 11, abaixo.

Tabela 11: Compilação dos Resultados.

QUÍMICOS	Classificação LLNA	Ensaio Proposto pelo grupo *	Ensaio Lifespan	Ensaio Postagem de ovos	Ensaio Bombeamento faríngeo	Ensaio ativação de GST4/SKN1	Ensaio ativação de NLP-29	Ensaio expressão genica
DMSO *(Dimethyl sulfoxide)*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
H_2O_2 *(hydrogen Peroxide)*	NS	---	S	S	S	S	S	S
DNCB *(2,4-Dinitrochlorobenzene)*	$S_{extremo}$	S	S	S	S	S	S	S
FA *(Formaldehyde)*	S_{forte}	S	S	S	S	S	S	S
2-MBT *(2-Mercaptobenzothiazole)*	$S_{moderado}$	S	S	S	S	S	S	NS
EU *(Eugenol)*	S_{fraco}	S	S	S	S	NS	S	NS
PROP *(Isopropanol)*	Irritante	NS	NS	S	NS	NS	S	NS

** Parise, C. Sá-Rocha, V.M. De Moraes, J.Z. (2015) Skin sensitizer identification by IL-8 secretion and CD86 expression on THP-1 cells.* ***Toxicology in vitro.***

NS – não sensibilizador; **S** – Sensibilizador ; **LLNA** - *local lymph node assay, in mices.*

5 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de metodologias capazes de predizer a toxicidade e o potencial alergênico de agentes químicos permitirá a criação de um conjunto de subsídios que amparem as decisões na avaliação de risco de produtos aos consumidores e, por isso, é tópico atualmente abordado por muitos grupos de pesquisa em todo o mundo. A busca por novas metodologias livres de experimentação animal deve-se à proibição, inicialmente na Europa, do comércio de produtos cosméticos testados em animais de experimentação. Atualmente, a tendência ao veto a esses produtos ganhou força no mundo, afetando o mercado internacional. Com isso, o Brasil, dono da maior biodiversidade do planeta, tem urgência na inclusão dos testes alternativos em sua rotina de desenvolvimento de novos produtos, bem como na promoção de estratégias que visem a melhoria e inovação de metodologias para esse fim.

Nesse contexto, o Brasil segue em constante avanço e busca desenvolver e validar técnicas que possam substituir o uso de animais em diversos testes ou reduzir e refinar a sua utilização. Os ingredientes químicos utilizados em preparações cosméticas podem induzir um processo de irritação ou sensibilização da pele levando a uma reação inflamatória conhecida como dermatite de contato (DC) (Peiser, *et al.,* 2012; Kimber, *et al.,* 2011; dos Santos, *et al.,* 2009; Megherbi, *et al.,* 2009), que pode ser alérgica, consequência de uma resposta imune adaptativa, ou irritante, resultado de uma resposta imune inata (Bonneville e cols., 2007). Desse modo, para uma abordagem robusta e confiável na avaliação de segurança de um ingrediente químico, é necessário desenvolver e estabelecer uma bateria de testes, que mimetizem as complexas interações dos químicos com os diferentes compartimentos do sistema imune e, em conjunto, permitam advertir sobre a segurança ou não de um dado ingrediente cosmético (Aeby *et al*., 2010; Robinson, 2019).

No que diz respeito especialmente à sensibilização cutânea, a avaliação do potencial tóxico permanece com lacunas importantes para um diagnóstico totalmente livre de animais. Na verdade, a predição de alergenicidade baseia-se atualmente em análise por método abiótico para ensaio *in chemico,* testes *in vitro*, que utilizam ou a linhagem celular derivada de queratinócitos humanos, ou quantificam alterações na expressão de marcadores de superfície celular de

monócitos e células dendríticas, e o teste *in vivo* em camundongo, porém com quantidade reduzida de animais (Pedro, 2021). Nosso grupo, assim como outros (Phyton *et al.,* 2007; Ashikaga *et al.,* 2006), mostrou a distinção de químicos sensibilizadores de irritantes, utilizando linhagem celular mielomonocítica humana (Parise et al., 2015). Como alternativa, a proposta do presente estudo buscou avaliar o uso do nematoide *C. elegans*, um modelo razoavelmente simples, rápido e que envolve custos mais baixos para sua manipulação. Foram empregadas duas abordagens principais: a primeira, avaliou, por meio de testes já considerados clássicos, o comportamento de *C. elegans* e a segunda, baseou-se na avaliação da ativação de genes ortólogos. Para isso, utilizamos linhagens geneticamente modificadas para expressar um gene repórter de ativação de genes, já que pelo menos 38% dos codificadores de proteínas do verme possuem ortólogos no genoma humano (Shaye e Greenwald 2011; Culetto & Sattelle, 2000), e também avaliamos a expressão gênica de alguns componentes de vias de sinalização envolvidas na resposta à toxicidade do químico.

Para todos os ensaios, foi necessário estabelecer as concentrações dos químicos a serem utilizadas e, assim, determinamos a dose de cada químico responsável por 50% de letalidade dos vermes (DL50). Foi então obtida a curva de mortalidade para cada situação. Cabe ressaltar que a DL50 é frequentemente usada como um indicador da toxicidade de uma substância química, portanto quanto maior a dose que é letal, menos tóxica a substância é considerada (Botham, 2002). Além disso, utilizando para todos os químicos o mesmo padrão de dose, é possível em um teste fazer a comparação entre eles. Uma curva é considerada ótima se o valor do coeficiente de determinação R^2, que reflete o quanto os valores de letalidade (variável dependente) estão relacionados com os valores de concentração de cada químico (variável independente), for próximo a 1 (Callegari-Jacques, 2003). Como se pode observar trabalhamos sempre com uma linha de tendência confiável, o que conferiu segurança na análise de cada curva.

A partir da determinação da DL50 para os químicos, iniciamos os experimentos com os testes de comportamento da linhagem selvagem, com o objetivo de avaliar se a exposição a agentes químicos provocaria alterações em parâmetros de vida do verme que poderiam ser preditivas de toxicidade.

O primeiro teste realizado teve como objetivo avaliar se a presença de químicos sensibilizadores e não sensibilizadores reduz o tempo de vida dos vermes. Esperava-se que, nesse teste, os químicos sensibilizadores provocassem uma morte precoce na comparação com o químico irritante, por exemplo. Os dados obtidos nos permitiram observar que, de fato, comparado ao DMSO, utilizado como veículo, os químicos DNCB e FA, sensibilizadores extremo e forte, respectivamente, promoveram uma morte precoce dos vermes e, aproximadamente no dia 25 do experimento, todos os animais estavam mortos. Já para o químico 2MBT, um sensibilizador moderado, o impacto na longevidade dos vermes foi menor, provocando uma sobrevida estendida de mais 4 dias em relação a DNCB e FA e menor ainda para o químico EU, sensibilizador fraco, que levou a uma sobrevida de 6 dias a mais em relação a DNCB e FA. Por fim, na presença do irritante PROP, os vermes viveram 9 dias a mais do que o controle positivo, H_2O_2, e somente 1 dia a menos que o controle negativo. Apesar do resultado obtido, o irritante na comparação com o controle negativo não mostrou diferença estatística significante. Mesmo assim, o teste revela que quanto mais tóxico o químico menor se tornou o tempo de vida dos vermes.

Analisamos também os dados do 23º dia de experimento, pois foi esse o último dia de contagem com animais vivos em todas as condições. Os sensibilizadores DNCB e FA provocaram efeito semelhante ao observado com o controle positivo H_2O_2 e mostraram uma diferença estatística significante na comparação com o controle negativo, maior do que a diferença observada para os químicos 2MBT e EU, que também mostraram significância estatística. Não foi observada diferença estatística para o irritante PROP, embora a sobrevida tenha diminuído. Com isso, o teste de expectativa de vida, em nossas condições, permitiu identificar todos os químicos sensibilizadores. Assim, concluímos que o teste permitiu detectar a toxicidade dos sensibilizadores, porém não detectou o irritante como tóxico.

O segundo teste comportamental, postura e viabilidade de ovos, que avalia a fertilidade dos vermes, sabidamente alterada em presença de algum agente estressor (Kilen, 2016), mostrou que, nos dias 2 e 3 de vida, os animais cultivados em presença do controle positivo H_2O_2 postaram menos ovos quando comparados aos controles negativos, DMSO e nenhuma adição de químico.

Diante disso, optamos por avaliar os químicos testes no dia 3 de vida. O teste foi capaz de identificar todos os químicos testados como tóxicos, incluindo o irritante. Esses resultados mostram que o teste foi eficaz para detectar toxicidade, mas não distingue sensibilizador de irritante. Vale comentar que, embora a postura de ovos tenha sido comprometida, a viabilidade deles, mensurada pelo número de ovos que eclodiram, foi de 100% para todos os casos. Destacamos também o resultado obtido para o químico FA que, quando comparado com os outros químicos testados, mostrou uma diferença estatística maior na redução da quantidade de ovos postados. Esse achado vai de encontro com os resultados de um estudo que reportou o fato de o formaldeído provocar um desequilíbrio no sistema detox do verme, promovendo um estresse oxidativo (Umansky, 2022).

O terceiro teste de comportamento, bombeamento de faringe, avalia a capacidade de se alimentar do *C. elegans*, que pode estar alterada em presença de algum agente estressor (Schüler, 2015) e depende da ação de uma bomba neuromuscular, faringe, que une a boca ao intestino do verme. O músculo faríngeo captura o alimento – bactérias – e o transporta ao intestino. Na verdade, ocorre uma combinação de dois movimentos, bombeamento e peristaltismo do istmo. O bombeamento, mais visível, é um ciclo de contração e relaxamento que suga o líquido do ambiente circundante, junto com as partículas suspensas, e depois expele o líquido, prendendo as partículas (Avery, 2012).

Neste teste, 48h após exposição ao químico, o número de bombeamentos de faringe por minuto foi contado para cada animal. Nossos resultados mostraram que houve uma diferença estatística maior, na comparação com os controles negativos, quando os vermes foram submetidos aos sensibilizadores extremo, forte e moderado e uma diferença menor, porém significativa, para o sensibilizador fraco EU, e não sendo possível observar diferença entre o irritante PROP e o controle negativo. Por essa abordagem, conseguimos identificar todos os químicos sensibilizadores, porém não detectamos, como tóxico, o químico irritante. Embora a análise estatística não tenha permitido detectar diferenças entre as categorias de sensibilizadores, os resultados mostram que existe um efeito proporcional à intensidade da toxicidade do agente químico. Um estudo que corrobora os nossos achados, descrito por Koga e colaboradores em 2000, mostra que o aumento da expressão de uma forma ativada de MEK-1 (MAPKK)

especificamente na faringe inibiu o bombeamento faríngeo, sugerindo um papel da MEK-1 nas respostas ao estresse. Vale destacar que, recentemente, outros estudos utilizaram o teste para avaliar a toxicidade de químicos (Fang, 2017; Calahorro, 2021; Izquierdo, 2021).

Até o momento não existe uma literatura consolidada sobre os testes de toxicidade de ingredientes cosméticos que utilizam *C. elegans*. Porém dois estudos publicados em 2020 chamaram nossa atenção. Um deles, descrito por De la Parra-Guerra e colaboradores (De la Parra-Guerra, *et al.,* 2020), utilizou o nematoide para testar a neurotoxicidade de um ingrediente cosmético chamado Nonilfenol (NF-9), em que mostram que o *C. elegans*, quando exposto a diferentes concentrações de NF-9, apresenta danos e é capaz de transcender esse efeito para a próxima geração, mesmo que esta não seja exposta diretamente ao químico. Segundo os autores, isso ocorre por meio de um acúmulo da substância em ovos, diminuindo a taxa de sobrevivência, de movimento e de vida útil do nematoide.

O outro estudo, publicado por Lanzerstorfer e colaboradores (Lanzerstorfer, P. *et al.,* 2020), avaliou no nematóide a toxicidade de óleos essenciais utilizados em cosméticos e mostra que essas substâncias podem ser tóxicas em baixas doses. Os autores mencionam que testes em animais ainda representam o “padrão-ouro” na avaliação de toxicidade e segurança de produtos químicos industriais, farmacêuticos, cosméticos e agroquímicos. No entanto, como sugerido por eles, abordagens alternativas, como o uso do modelo *C. elegans*, apresentam o potencial de reduzir ou mesmo substituir completamente os testes em animais.

Há outros estudos recentes que utilizaram o modelo para testar peptídeos naturais bioativos retirados de organismos marinhos, que podem ser futuros potenciais ingredientes cosméticos funcionais, e mostram que esse grupo de peptídeos tem um grande potencial antienvelhecimento por prolongar a vida útil do verme (Wang, 2021; Xia, 2021).

Na tentativa de substanciar os resultados com a abordagem comportamental que obtivemos, avaliamos a expressão de genes ortólogos que estão envolvidos nos fenômenos avaliados. Para isso, utilizamos seis linhagens de *C. elegans* geneticamente modificadas, que foram construídas de tal forma a carregar um gene repórter, da proteína verde fluorescente (GFP), tornando

assim possível a detecção *in vivo* da expressão do gene ortólogo de interesse. Assim, consegue-se avaliar a atividade de moléculas importantes para o processo de injúria cutânea *in vivo*, por espectrofotometria e microscopia, visto que o verme possui uma cutícula transparente. Inicialmente, verificamos se a modificação genética introduzida nessas linhagens poderia influenciar o perfil de crescimento dos vermes. Para isso, obtivemos curvas de crescimento de duas das seis linhagens modificadas estudadas e comparamos com a linhagem selvagem. Foram contados, por quatro dias, larvas, jovens adultos e adultos. Os dados observados mostraram que não houve alteração do perfil de crescimento. Também foram determinadas as DL50 de todos os químicos para as linhagens geneticamente modificadas. Os gráficos e dados obtidos para cada uma das linhagens mostraram que, de forma geral, não houve diferenças importantes nas DL50 de cada químico quando comparadas às obtidas com a linhagem selvagem.

Para a realização do ensaio propriamente dito, era ainda necessário o estabelecimento dos melhores tempos de exposição das linhagens aos químicos. Com base na literatura (Whitacre, 2010), definimos os tempos de exposição que poderiam permitir a avaliação de uma resposta tóxica aguda dos vermes modificados aos químicos (4h), uma resposta tóxica moderada (10h) e uma resposta tardia (24h). Exclusivamente para o gene NLP-29 que, sabidamente apresenta uma resposta rápida (Pujol, 2008), foram analisados também tempos mais curtos, como 15min, 30min, 1h e 2h.

Ao final de cada tempo foi feita leitura espectrofotométrica e quatro linhagens (AA278; BW1935; CH1448; CF1553) não mostraram sinal detectável que pudesse permitir estabelecer qualquer correlação entre a presença do químico e a fluorescência. Contudo, pudemos observar que, para a linhagem CL2166, modificada geneticamente para reportar a atividade da proteína SKN1 de *C. elegans*, ortóloga de NRF2 em humanos, foi possível detectar um aumento na fluorescência quando exposta por 24 horas à presença dos químicos, permitindo o estabelecimento de uma correlação positiva entre a ativação de SKN-1 e a toxicidade dos químicos. Do mesmo modo, para a linhagem IG274, que reporta a ativação da proteína NLP-29 de *C. elegans*, ortóloga de um peptídeo antimicrobiano em humanos, a presença dos químicos provocou uma fluorescência mais intensa após exposição por 4 horas.

Assim, após padronização, linhagens e seus respectivos tempos ótimos de exposição - CL2166 (SKN1), 24h e IG274 (NLP-29), 4h -, utilizamos a microscopia de fluorescência para detectar a intensidade média da fluorescência emitida pelos vermes após a incubação com os químicos. Os resultados obtidos com a linhagem CL2166 mostram que houve um aumento significativo na intensidade de fluorescência detectada, quando os vermes eram submetidos aos químicos sensibilizadores extremo, forte e moderado. Para o sensibilizador de intensidade fraca e para o irritante, não houve diferenças estatísticas quando comparados aos controles. Esse teste foi capaz de identificar os químicos das três categorias mais intensas de sensibilizadores. Já nos resultados obtidos com a linhagem IG274 o resultado foi como o esperado, pois observamos que houve aumento na intensidade de fluorescência para todos os químicos testados, inclusive o irritante.

É importante destacar que ambas as linhagens, que mostraram correlação positiva entre fluorescência e exposição ao químico, refletem a ativação de moléculas que fazem parte da cascata de reações que compõem uma das vias de sinalização ativada durante o bombeamento de faringe, p38 MAPK *(Mitogen-Activated Protein Kinase)* (Pujol, N. e*t al.*, 2008; Lezi, *et al.*, 2018). Em resumo, a ativação da via p38 MAPK durante o estresse oxidativo é iniciada com NSY-1 (MAPKKK), que fosforila SEK-1 (MAPKK) que, por sua vez, fosforila PMK-1 (MAPK, homólogo de p38). PMK-1 promove a translocação de SKN-1 para o núcleo celular, levando à expressão dos promotores *gcs-1* e *gst-4* e ativando STA-2, uma molécula presente na cutícula do verme que regula de forma rápida a expressão do peptídeo antimicrobiano NLP-29 (Huang, *et al.,* 2020; Zhao, *et al*., 2016; Blackwell, *et al.,* 2015).

Assim, seguimos com a avaliação da expressão do RNAm dos principais genes envolvidos na via de sinalização p38 MAPK, *nsy1; sek1; pmk1; sta2; nlp29; gst4 e skn1*, após exposição de vermes da linhagem selvagem aos químicos por 3h (resposta aguda) e 20h (resposta tardia), na expectativa de que esse teste pudesse ser mais sensível do que a análise por fluorescência das linhagens geneticamente modificadas utilizadas. Nossos resultados mostram que para o químico sensibilizador extremo DNCB ocorreu um aumento de expressão do RNAm de todos os genes avaliados, nos dois tempos, assim como foi visto para o controle positivo, H_2O_2. Para o químico FA ocorreu um aumento

de expressão do RNAm de *pmk-1* (3h e 20h), *sek-1* (20h), *sta-2*, *nlp-29*, *gst-4* e *skn-1*, e não foi detectado aumento de expressão de *nsy-1* (3h e 20h) e *sek-1* (3h). Dessa forma, essa análise permitiu, apenas em parte, detectar toxicidade. Por outro lado, a presença dos químicos 2MBT, EU e PROP não promoveu aumento significativo da expressão gênica de nenhum dos genes testados, em nenhum dos tempos. Portanto, a análise da expressão de RNAm somente nos permitiu detectar a toxicidade do DNCB e FA, químicos de sensibilização extrema e forte, respectivamente, que promovem um grave dano cutâneo (Alyoussef, 2018) e com isso ativa toda a via de sinalização p38 MAPK, tanto de forma aguda quanto tardia. Permanecem para serem investigados outros tempos de exposição do verme aos químicos e genes de outras vias de sinalização, bem como testes de contraprova, que permitam a confirmação da expressão proteica dos genes avaliados. Antes de concluirmos sobre a eficiência do teste de expressão gênica em distinguir os químicos estudados, devemos avaliar o maior número possível de parâmetros que podem estar implicados tanto no processo de bombeamento faríngeo quanto na injuria cutânea.

Ainda, uma questão que merece uma reflexão de nossa parte é a característica de não senciência do nematoide utilizado no estudo. A legislação que regulamenta o uso de animais para fins científicos em geral protege os seres vertebrados por considerá-los dotados da capacidade de ter experiências subjetivas, como dor e sofrimento. No entanto, em relação aos invertebrados não existe um consenso sobre o assunto. O que sabemos com base no conhecimento atual é que todos os seres sencientes são animais, mas nem todos os animais são sencientes (Oliveira & Goldim, 2014). Por isso, o uso de *C. elegans* encontra resistência por parte dos defensores mais radicais do banimento de animais em pesquisa e desenvolvimento. Existem critérios gerais que definem a senciência animal, como considerações evolutivas, comportamento em situações de dor e sofrimento e a presença de um sistema nervoso central (site animal-ethics.org, acessado em 12/06/2020). Já foi provado por alguns estudos que animais invertebrados, como polvos, lulas e caranguejos, são seres sencientes. Outros estudos, entretanto, demonstraram que os nematoides não apresentaram evidências substanciais comportamentais, fisiológicas (pela ausência de um córtex cerebral) e evolutivas de que possuem consciência, por isso devem ser considerados, até prova em contrário, como não

sencientes. Diante disso, o *C. elegans* pode sim ser considerado um modelo alternativo ao uso de mamíferos (EFSA, 2005; Oliveira & Goldim, 2014).

Nesse sentido, apresentamos os dados obtidos por esse trabalho como sendo promissores de que o nematóide *C. elegans* pode ser um modelo alternativo ao uso de animais de grande valia ao menos em uma triagem inicial para avaliação da toxicidade de ingredientes cosméticos. Destacamos os testes de comportamento, em especial o de bombeamento de faringe, que não detectou o irritante. No entanto, o gráfico representativo dos experimentos realizados mostrou que existe um efeito proporcional consistente com o grau de toxicidade dos químicos. Evidentemente que esse achado deverá ser confirmado pela testagem de um número maior de químicos das diferentes categorias.

Dentre as linhagens geneticamente modificadas utilizadas, a que melhor detectou a toxicidade dos químicos foi a IG274, em nossas condições, confirmando e corroborando os achados comportamentais. A ativação de NLP-29 reflete em parte o que ocorre após a ativação da via de sinalização p38 PMK1 MAPK e sabemos que essa não é a única envolvida nos processos de injúria cutânea. Assim, permanecem para serem explorados no modelo outros genes e/ou linhagens que reflitam ativação de outras vias de sinalização como já mencionado.

Uma conclusão mais definitiva dos achados que apresentamos é prevista acontecer após a experimentação com um amplo número e diversidade de agentes químicos de toxicidade conhecida. Independentemente disso, consideramos que os nossos resultados até aqui nos permitem vislumbrar a possibilidade da utilização do modelo *C. elegans* como parte de um fluxograma de testagem de ingredientes desconhecidos, o que seria de grande valia já que nosso país é dono de uma grande biodiversidade a ser explorada.

6 CONCLUSÃO

- ✓ O teste de fertilidade do *C. elegans* detectou toxicidade de todos os ingredientes cosméticos avaliados no presente estudo, sensibilizadores e irritante;
- ✓ O teste de expectativa de vida detectou a toxicidade dos químicos sensibilizadores (extremo, forte, moderado e fraco), mas não do irritante, utilizados no presente estudo;
- ✓ O teste de bombeamento faríngeo detectou a toxicidade dos sensibilizadores de forma proporcional aos seus potenciais tóxicos.
- ✓ A exposição de *C. elegans* aos químicos sensibilizadores extremo, forte e moderado levou à ativação do promotor de SKN-1.
- ✓ A exposição de *C. elegans* a todos os ingredientes cosméticos avaliados no estudo levou à ativação de NLP-29.
- ✓ A avaliação da expressão de genes que fazem parte da via de sinalização p38 MAPK detectou a toxicidade apenas dos sensibilizadores extremo DNCB e forte FA.
- ✓ Os resultados obtidos foram promissores e sinalizam para a utilidade do modelo C. elegans na testagem de ingredientes cosméticos.

7 REFERÊNCIAS

AAVS. Research Alternatives – American Anti-Vivisection Society. Disponível em: https://aavs.org/alternatives/research/. Acesso em: 14 de maio de 2021.

Adair K, Meng X, Naisbitt DJ. Drug hapten-specific T-cell activation: Current status and unanswered questions. Proteomics. 2021 Sep;21(17-18):e2000267. doi: 10.1002/pmic.202000267. Epub 2021 Jul 5. PMID: 33651918.

Adler S, Basketter D, Creton S, et al. Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Arch Toxicol*. 2011;85(5):367-485. doi:10.1007/s00204-011-0693-2.

Alyoussef A. Blocking TGF-β type 1 receptor partially reversed skin tissue damage in experimentally induced atopic dermatitis in mice. Cytokine. 2018 Jun; 106:45-53. doi: 10.1016/j.cyto.2018.02.025. Epub 2018 Mar 14. PMID: 29549723.

Aquino M, Rosner G. Systemic Contact Dermatitis. Clin Rev Allergy Immunol. 2019 Feb;56(1):9-18. doi: 10.1007/s12016-018-8686-z. PMID: 29766368.

Assembléia Legislativa do Estado de São Paulo. Projeto de Lei No 777/2013. Disponível em http://www.al.sp.gov.br/propositura/?id=1165668. Acessado em 15.06.2021.

Avery L, You YJ. C. elegans feeding. WormBook. 2012 May 21:1-23. doi: 10.1895/wormbook.1.150.1. PMID: 22628186; PMCID: PMC3590810.

Balls M. Replacement of animal procedures: alternatives in research, education and testing. *Lab Anim*. 1994;28(3):193-211. doi:10.1258/002367794780681714.

Blackwell TK, Steinbaugh MJ, Hourihan JM, Ewald CY, Isik M. SKN-1/Nrf, stress responses, and aging in Caenorhabditis elegans. *Free Radic Biol Med*. 2015;88(Pt B):290-301. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.008.

Bonneville M, Chavagnac C, Vocanson M, et al. Skin contact irritation conditions the development and severity of allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2007;127(6):1430-1435. doi: 10.1038/sj.jid.5700726.

Botham, P. A. Acute systemic toxicity. ILAR Journal. v.43 Suppl:S, p.27-30, 2002.

Braun S, Hanselmann C, Gassmann MG, et al. Nrf2 transcription factor, a novel target of keratinocyte growth factor action which regulates gene expression and inflammation in the healing skin wound. *Mol Cell Biol*. 2002;22(15):5492-5505. doi:10.1128/mcb.22.15.5492-5505.2002.

Brenner S. The genetics of Caenorhabditis elegans. *Genetics*. 1974;77(1):71-94.

Calahorro F, Holden-Dye L, O'Connor V. Impact of drug solvents on *C. elegans* pharyngeal pumping. Toxicol Rep. 2021 Jun 17; 8:1240-1247. doi: 10.1016/j.toxrep.2021.06.007. PMID: 34195015; PMCID: PMC8233170.

Cavani A. T regulatory cells in contact hypersensitivity. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2008; 8:294-8.

Chisholm AD, Hsiao TI. The Caenorhabditis elegans epidermis as a model skin. I: development, patterning, and growth. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2012;1(6):861-878. doi:10.1002/wdev.79.

Chisholm AD, Xu S. The Caenorhabditis elegans epidermis as a model skin. II: differentiation and physiological roles. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2012;1(6):879-902. doi:10.1002/wdev.7.

Davis SL, Cheeke PR. Do domestic animals have minds and the ability to think? A provisional sample of opinions on the question. *J Anim Sci*. 1998;76(8):2072-2079. doi:10.2527/1998.7682072x.

De la Parra-Guerra A, Stürzenbaum S, Olivero-Verbel J. Intergenerational toxicity of nonylphenol ethoxylate (NP-9) in Caenorhabditis elegans. Ecotoxicol Environ Saf. 2020 Jul 1; 197:110588. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.110588. Epub 2020 Apr 11. PMID: 32289633.

Delaine T, Niklasson IB, Emter R, Luthman K, Karlberg AT, Natsch A. Structure--activity relationship between the in vivo skin sensitizing potency of analogues of phenyl glycidyl ether and the induction of Nrf2-dependent luciferase activity in the KeratinoSens in vitro assay. *Chem Res Toxicol*. 2011;24(8):1312-1318. doi:10.1021/tx200196s.

Detienne G, Van de Walle P, De Haes W, Schoofs L, Temmerman L. SKN-1-independent transcriptional activation of glutathione S-transferase 4 (GST-4) by EGF signaling. *Worm*. 2016;5(4): e1230585. Published 2016 Aug 31. doi:10.1080/21624054.2016.1230585.

dos Santos GG, Reinders J, Ouwehand K, Rustemeyer T, Scheper RJ, Gibbs S. Progress on the development of human in vitro dendritic cell-based assays for assessment of the sensitizing potential of a compound. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009;236(3):372-382. doi: 10.1016/j.taap.2009.02.004.

Elkabti AB, Issi L, Rao RP. *Caenorhabditis elegans* as a Model Host to Monitor the *Candida* Infection Processes. *J Fungi (Basel)*. 2018;4(4):123. Published 2018 Nov 7. doi:10.3390/jof4040123

Elmas ÖF, Akdeniz N, Atasoy M, Karadag AS. Contact dermatitis: A great imitator. Clin Dermatol. 2020 Mar-Apr;38(2):176-192. doi: 10.1016/j.clindermatol.2019.10.003. Epub 2019 Oct 24. PMID: 32513398.

Emter R, Ellis G, Natsch A. Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010;245(3):281-290. doi: 10.1016/j.taap.2010.03.009.

Erkes DA, Selvan SR. Hapten-induced contact hypersensitivity, autoimmune reactions, and tumor regression: plausibility of mediating antitumor immunity. J Immunol Res. 2014; 2014:175265. doi: 10.1155/2014/175265. Epub 2014 May 15. PMID: 24949488; PMCID: PMC4052058.

Ética Animal. Senciência. Disponível em: https://www.animal-ethics.org/senciencia-secao/. Acessado em: 12/06/2021.

Fang EF, Waltz TB, Kassahun H, Lu Q, Kerr JS, Morevati M, Fivenson EM Wollman BN, Marosi K, Wilson MA, Iser WB, Eckley DM, Zhang Y, Lehrmann E, Goldberg IG, Scheibye-Knudsen M, Mattson MP, Nilsen H, Bohr VA, Becker KG. Tomatidine enhances lifespan and healthspan in C. elegans through mitophagy

induction via the SKN-1/Nrf2 pathway. Sci Rep. 2017 Apr 11; 7:46208. doi: 10.1038/srep46208. PMID: 28397803; PMCID: PMC5387417.

Ferraz RC, Camara H, De-Souza EA, et al. IMPACT is a GCN2 inhibitor that limits lifespan in Caenorhabditis elegans. *BMC Biol*. 2016;14(1):87. Published 2016 Oct 7. doi:10.1186/s12915-016-0301-2.

Flavell SW, Raizen DM, You YJ. Behavioral States. Genetics. 2020 Oct;216(2):315-332. doi: 10.1534/genetics.120.303539. PMID: 33023930; PMCID: PMC7536859.

Freires IA, Sardi JC, de Castro RD, Rosalen PL. Alternative Animal and Non-Animal Models for Drug Discovery and Development: Bonus or Burden? *Pharm Res*. 2017;34(4):681-686. doi:10.1007/s11095-016-2069-z.

Gober MD, Gaspari AA. Allergic contact dermatitis. Curr Dir Autoimmun. 2008; 10:1-26. doi: 10.1159/000131410. PMID: 18460878.

Hamann CR, Hamann D, Egeberg A, Johansen JD, Silverberg J, Thyssen JP. Association between atopic dermatitis and contact sensitization: A systematic review and meta-analysis. *J Am Acad Dermatol*. 2017;77(1):70-78. doi: 10.1016/j.jaad.2017.02.001

Hobert O. Behavioral plasticity in C. elegans: paradigms, circuits, genes. J Neurobiol. 2003 Jan;54(1):203-23. doi: 10.1002/neu.10168. PMID: 12486705.

Huang X, Pan W, Kim W, White A, Li S, Li H, Lee K, Fuchs BB, Zeng K, Mylonakis E. Caenorhabditis elegans mounts a p38 MAPK pathway-mediated defence to Cutibacterium acnes infection. Cell Microbiol. 2020 Oct;22(10): e13234. doi: 10.1111/cmi.13234. Epub 2020 Jul 15. PMID: 32543022.

InnVitro. Métodos Alternativos a experimentação animal no Brasil. Disponível em: https://www.innvitro.com/metodos-alternativos-a-experimentacao-animal-no-brasil/. Acessado em 15.06.2021.

Izquierdo PG, O'Connor V, Green AC, Holden-Dye L, Tattersall JEH. C. elegans pharyngeal pumping provides a whole organism bioassay to investigate anti-cholinesterase intoxication and antidotes. Neurotoxicology. 2021 Jan; 82:50-62. doi: 10.1016/j.neuro.2020.11.001. Epub 2020 Nov 8. PMID: 33176172.

Johansson H, Lindstedt M. Prediction of skin sensitizers using alternative methods to animal experimentation. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2014 Jul;115(1):110-7. doi: 10.1111/bcpt.12199. Epub 2014 Feb 18. PMID: 24548737.

JusBrasil. LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008. Presidência da República, Casa Civil. Disponível em http://presrepublica.jusbrasil.com.br/legislacao/93064/lei-11794-08. Acessado em 15.06.2021.

Kimber I, Basketter DA, Gerberick GF, Ryan CA, Dearman RJ. Chemical allergy: translating biology into hazard characterization. *Toxicol Sci*. 2011;120 Suppl 1: S238-S268. doi:10.1093/toxsci/kfq346.

Kimber I, Dearman RJ. Allergic contact dermatitis: the cellular effectors. Contact Dermatitis. 2002; 46:1-5

Koga M, Zwaal R, Guan KL, Avery L, Ohshima Y. A Caenorhabditis elegans MAP kinase kinase, MEK-1, is involved in stress responses. EMBO J. 2000 Oct 2;19(19):5148-56. doi: 10.1093/emboj/19.19.5148. PMID: 11013217; PMCID: PMC302092.

Landis JN, Murphy CT. Integration of diverse inputs in the regulation of Caenorhabditis elegans DAF-16/FOXO. *Dev Dyn*. 2010;239(5):1405-1412. doi:10.1002/dvdy.22244.

Lanzerstorfer P, Sandner G, Pitsch J, Mascher B, Aumiller T, Weghuber J. Acute, reproductive, and developmental toxicity of essential oils assessed with alternative in vitro and in vivo systems. Arch Toxicol. 2021 Feb;95(2):673-691. doi: 10.1007/s00204-020-02945-6. Epub 2020 Nov 7. PMID: 33159585; PMCID: PMC7870616.

Levin CY, Maibach HI. Irritant contact dermatitis: is there an immunologic component? *Int Immunopharmacol*. 2002;2(2-3):183-189. doi:10.1016/s1567-5769(01)00171-0.

Leung MC, Williams PL, Benedetto A, Au C, Helmcke KJ, Aschner M, Meyer JN. Caenorhabditis elegans: an emerging model in biomedical and environmental toxicology. Toxicol Sci. 2008 Nov;106(1):5-28. doi: 10.1093/toxsci/kfn121. Epub 2008 Jun 19. PMID: 18566021; PMCID: PMC2563142.

MacKay C, Davies M, Summerfield V, Maxwell G. From pathways to people: applying the adverse outcome pathway (AOP) for skin sensitization to risk assessment. *ALTEX*. 2013;30(4):473-486. doi:10.14573/altex.2013.4.473.

Martins LE, Reis VM. Immunopathology of allergic contact dermatitis. *An Bras Dermatol*. 2011;86(3):419-433. doi:10.1590/s0365-05962011000300001.

Maxwell G, MacKay C, Cubberley R, et al. Applying the skin sensitisation adverse outcome pathway (AOP) to quantitative risk assessment. *Toxicol In Vitro*. 2014;28(1):8-12. doi:10.1016/j.tiv.2013.10.013.

MCTIC Ministério da Ciência Tecnologia Inovação e Comunicações). https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/ciencia/SEPED/Saude/renama/renama.html) acessado em 15/06/2019.

Megherbi R, Kiorpelidou E, Foster B, et al. Role of protein haptenation in triggering maturation events in the dendritic cell surrogate cell line THP-1. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009;238(2):120-132. doi: 10.1016/j.taap.2009.05.001.

Mehling A, Eriksson T, Eltze T, et al. non-animal test methods for predicting skin sensitization potentials. *Arch Toxicol*. 2012;86(8):1273-1295. doi:10.1007/s00204-012-0867-6.

Natsch A. The Nrf2-Keap1-ARE toxicity pathway as a cellular sensor for skin sensitizers--functional relevance and a hypothesis on innate reactions to skin sensitizers. *Toxicol Sci*. 2010;113(2):284-292. doi:10.1093/toxsci/kfp228.

OECD (2017) *Test No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method*: Paris**,** OECD Publishing, acessado em 01/12/2021.

OECD (2021), *Guideline No. 497: Defined Approaches on Skin Sensitisation*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, acessado em 01/12/2021.

OECDi Library. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Disponível em http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788. Acessado em 12/05/2022.

Oh SW, Mukhopadhyay A, Svrzikapa N, Jiang F, Davis RJ, Tissenbaum HA. JNK regulates lifespan in Caenorhabditis elegans by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(12):4494-4499. doi:10.1073/pnas.0500749102.

Oliveira, E.M; Goldim, J.R. Legislação de proteção animal para fins científicos e a não inclusão dos invertebrados –análise bioética. *Rev. bioét*. 2014;22 (1): 45-56.

Ouyang W, Li MO. Foxo: in command of T lymphocyte homeostasis and tolerance. *Trends Immunol*. 2011;32(1):26-33. doi:10.1016/j.it.2010.10.005.

Parise CB, Sá-Rocha VM, Moraes JZ. Skin sensitizer identification by IL-8 secretion and CD86 expression on THP-1 cells. *Toxicol In Vitro*. 2015;30(1 Pt B):318-324. doi: 10.1016/j.tiv.2015.10.004.

Park HH, Jung Y, Lee SV. Survival assays using *Caenorhabditis elegans*. Mol Cells. 2017 Feb;40(2):90-99. doi: 10.14348/molcells.2017.0017. Epub 2017 Feb 27. PMID: 28241407; PMCID: PMC5339508.

Patterson RA, Juarez MT, Hermann A, Sasik R, Hardiman G, McGinnis W. Serine proteolytic pathway activation reveals an expanded ensemble of wound response genes in Drosophila. *PLoS One*. 2013;8(4): e61773. Published 2013 Apr 24. doi: 10.1371/journal.pone.0061773.

Pedro, D.A. Métodos alternativos ao uso de animais em ensino e pesquisa: evolução e panorama atual do brasil. Enciclopédia Bioesfera, Centro Científico Conhecer – Jandaia-GO, v.18 n.37 p. 334, doi:10.18677/EnciBio_2021C28, 2021.

Peiser M, Tralau T, Heidler J, et al. Allergic contact dermatitis: epidemiology, molecular mechanisms, in vitro methods and regulatory aspects. Current knowledge assembled at an international workshop at BfR, Germany. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(5):763-781. doi:10.1007/s00018-011-0846-8.

Portal Brasil. Nota de invasão ao Instituto Royal pelo ministério da Ciência e Tecnologia. Disponível em http://www.brasil.gov.br/ciencia-e-tecnologia/2013/10/conselho-de-controle-de-experimentacao-animal-divulga-nota. Acessado em 15.04.2019.

Planalto. LEI Nº 9.605, DE 12 DE FEVEREIRO DE 1998. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9605.html. Acessado em 26/09.2022.

Pujol N, Cypowyj S, Ziegler K, Millet A, Astrain A, Goncharov A, Jin Y, Chisholm AD, Ewbank JJ. Distinct innate immune responses to infection and wounding in the C. elegans epidermis. Curr Biol. 2008 Apr 8;18(7):481-9. doi: 10.1016/j.cub.2008.02.079. PMID: 18394898; PMCID: PMC2394561.

RENAMA. Rede Nacional de Métodos Alternativos. Disponível em http://renama.org.br. Acessado em 04.07.2019.

Rollin, B. E. (1989) *The unheeded cry: Animal consciousness, animal pain and science*, Oxford: Oxford University Press.

Schierenberg E, Wood WB. Control of cell-cycle timing in early embryos of Caenorhabditis elegans. *Dev Biol*. 1985;107(2):337-354. doi:10.1016/0012-1606(85)90316-1.

Slodownik D, Lee A, Nixon R. Irritant contact dermatitis: a review. *Australas J Dermatol*. 2008;49(1):1-11. doi:10.1111/j.1440-0960.2007.00409. x.

Strange K. From genes to integrative physiology: ion channel and transporter biology in Caenorhabditis elegans. *Physiol Rev*.2003;83(2):377-415. doi:10.1152/physrev.00025.2002.

Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, et al. Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *J Appl Toxicol*. 2018;38(3):432. doi:10.1002/jat.3572.

Teotónio H, Estes S, Phillips PC, Baer CF. Experimental Evolution with *Caenorhabditis* Nematodes. *Genetics*. 2017;206(2):691-716. doi:10.1534/genetics.115.186288.

The EFSA Journal (2005) 292, 1-46 - Opinion on the “Aspects of the biology and welfare of animals used for experimental and other scientific purposes”

Umansky C, Morellato AE, Rieckher M, Scheidegger MA, Martinefski MR, Fernández GA, Pak O, Kolesnikova K, Reingruber H, Bollini M, Crossan GP, Sommer N, Monge ME, Schumacher B, Pontel LB. Endogenous formaldehyde scavenges cellular glutathione resulting in redox disruption and cytotoxicity. Nat Commun. 2022 Feb 8;13(1):745. doi: 10.1038/s41467-022-28242-7. PMID: 35136057; PMCID: PMC8827065.

Usatine RP, Riojas M. Diagnosis and management of contact dermatitis. *Am Fam Physician*. 2010;82(3):249-255.

van Bilsen JHM, Sienkiewicz-Szłapka E, Lozano-Ojalvo D, et al. Application of the adverse outcome pathway (AOP) concept to structure the available in vivo and in vitro mechanistic data for allergic sensitization to food proteins. *Clin Transl Allergy*. 2017; 7:13. Published 2017 May 12. doi:10.1186/s13601-017-0152-0.

Vukmanović S, Sadrieh N. Skin sensitizers in cosmetics and beyond: potential multiple mechanisms of action and importance of T-cell assays for in vitro screening [published correction appears in Crit Rev Toxicol. 2017 May;47(5):i]. *Crit Rev Toxicol*. 2017;47(5):415-432. doi:10.1080/10408444.2017.1288025.

Wang MC, Bohmann D, Jasper H. JNK extends life span and limits growth by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling. *Cell*. 2005;121(1):115-125. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.030.

Wang X, Zhang Z, Zhang S, Yang F, Yang M, Zhou J, Hu Z, Xu X, Mao G, Chen G, Xiang W, Sun X, Xu N. Antiaging compounds from marine organisms. Food Res Int. 2021 May; 143:110313. doi: 10.1016/j.foodres.2021.110313. Epub 2021 Mar 16. PMID: 33992332.

Welsch K, Holstein J, Laurence A, Ghoreschi K. Targeting JAK/STAT signalling in inflammatory skin diseases with small molecule inhibitors. *Eur J Immunol*. 2017;47(7):1096-1107. doi:10.1002/eji.201646680.

Whitacre DM. Reviews of environmental contamination and toxicology. Preface. Rev Environ Contam Toxicol. 2010;204:vii-viii. PMID: 20054912.

Wolf M, Nunes F, Henkel A, Heinick A, Paul RJ. The MAP kinase JNK-1 of Caenorhabditis elegans: location, activation, and influences over temperature-dependent insulin-like signaling, stress responses, and fitness. *J Cell Physiol*. 2008;214(3):721-729. doi:10.1002/jcp.21269.

Wong CL, Ghassabian S, Smith MT, Lam AL. In vitro methods for hazard assessment of industrial chemicals - opportunities and challenges. *Front Pharmacol*. 2015; 6:94. Published 2015 May 5. doi:10.3389/fphar.2015.00094.

Wood WB. Determination of pattern and fate in early embryos of Caenorhabditis elegans. *Dev Biol (N Y 1985)*. 1988; 5:57-78. doi:10.1007/978-1-4615-6817-9_2.

WormBook. The online review of C. elegans biology. Disponível em: www.wormbook.org.

Xia E, Zhu X, Gao X, Ni J, Guo H. Antiaging Potential of Peptides from Underused Marine Bioresources. Mar Drugs. 2021 Sep 10;19(9):513. doi: 10.3390/md19090513. PMID: 34564175; PMCID: PMC8466736.

Zhang H, Labouesse M. The making of hemidesmosome structures in vivo. *Dev Dyn*. 2010;239(5):1465-1476. doi:10.1002/dvdy.22255.

Zhang Y, Li W, Li L, et al. Structural damage in the C. elegans epidermis causes release of STA-2 and induction of an innate immune response. *Immunity*. 2015;42(2):309-320. doi: 10.1016/j.immuni.2015.01.014.

Zhao Y, Zhi L, Wu Q, Yu Y, Sun Q, Wang D. p38 MAPK-SKN-1/Nrf signaling cascade is required for intestinal barrier against graphene oxide toxicity in Caenorhabditis elegans. *Nanotoxicology*.2016;10(10):1469-1479.doi:10.1080/17435390.2016.1235738

Zirwas MJ. Contact Dermatitis to Cosmetics. Clin Rev Allergy Immunol. 2019 Feb;56(1):119-128. doi: 10.1007/s12016-018-8717-9. PMID: 30421329.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Figura S1

Os resultados mostrados abaixo foram obtidos em um segundo experimento de RealTime PCR. O controle endógeno utilizado foi o gene da histona 10 (HIS-10), e o controle interno do ensaio, o veículo DMSO. Os dados foram normalizados por ambos os controles. Em resumo os dados nos mostram o mesmo que o primeiro experimento, que comparando com o controle negativo, para o químico sensibilizador extremo DNCB, assim como para o controle positivo H_2O_2, ocorreu um aumento de expressão no RNAm de todos os genes avaliados, nos 2 tempos. A presença do químico FA aumentou a expressão de quase todos os genes, exceto *nsy-1* e *sek-1* em 3h, e a presença dos químicos 2MBT, EU e PROP não promoveu aumento significativo da expressão gênica de nenhum dos genes testados, em nenhum dos tempos.

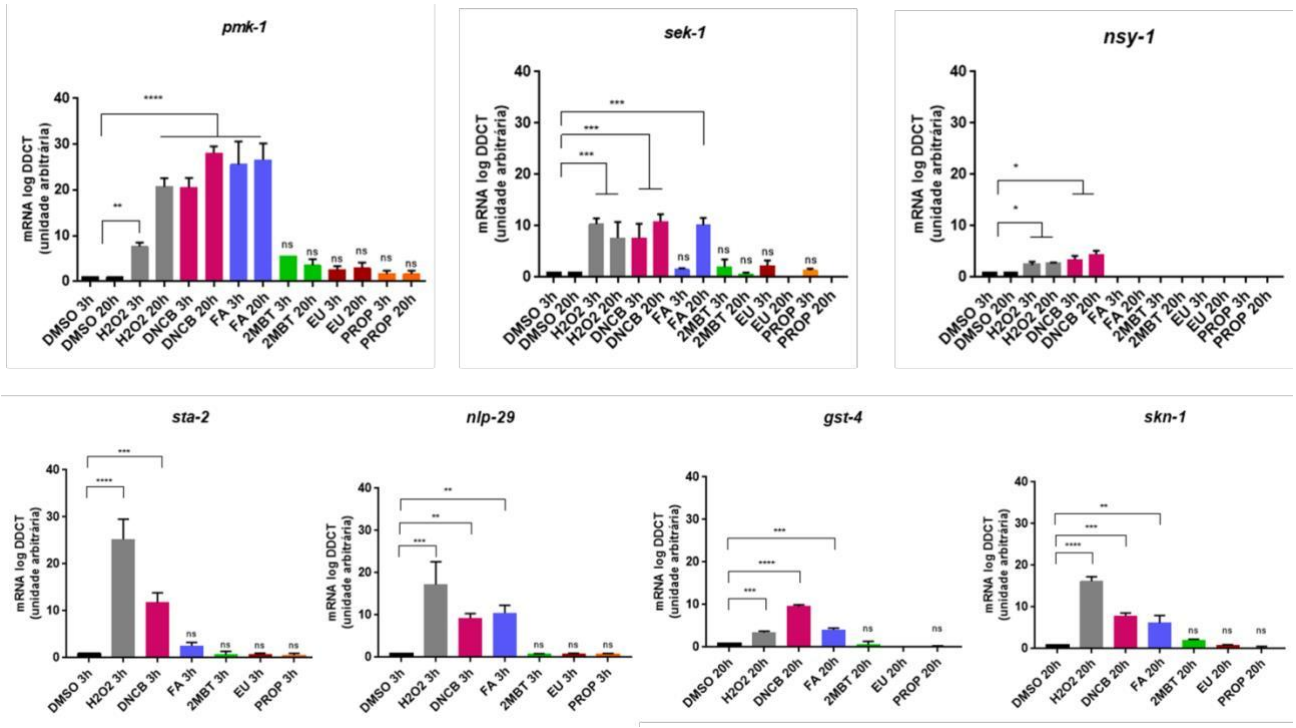


Figura S12: Análise da expressão gênica da via de sinalização p38 PMK1-MAPK: Vermes da linhagem selvagem N2 foram incubados em placas de 96 poços preta com fundo transparente por 3h e/ou 20h com os químicos na DL50. Após a incubação, foram lisados e submetidos a extração de RNA por TRIzol. Após a extração, foi obtido o cDNA que foi utilizado para o RealTimePCR, feito com Sybr-green. São apresentados os dados obtidos para os genes *nsy1; sek1; pmk1*; *sta2; nlp29; gst4 e skn1*. O experimento foi feito em triplicatas. O gráfico apresentado é referente a um dos experimentos. *One-way ANOVA* – pós-teste de *Tukey*.

ANEXO I – Aprovação da Comissão Interna de Biossegurança

COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA

São Paulo, 10 de Julho de 2017

Nº Projeto na CIBio: 2017/02

Título do Projeto: Utilização do *Caenorhabditis elegans* como método alterativo para a avaliação do potencial alergênico de químicos

Nome do Pesquisador Principal/Orientador: Jane Zveiter de Moraes
Nome do aluno/Pesquisador: Camila Braggion
Departamento ou Disciplina: Disciplina de Biofísica
Grupo de classificação do OGM: NB-1

Local onde o OGM será manipulado: Departamento de Bioquímica, Rua 3 de maio, nº100 INFAR UNIFESP – laboratório multiusuário 10 – térreo, UNIFESP, São Paulo.
Nível de Biossegurança área cadastrada: NB-1
Pesquisador responsável pela área cadastrada: Prof. Fernanda Cunha

A CIBio UNIFESP analisou e **APROVOU** o projeto de pesquisa acima referido. Conforme determinação da Lei 11.104 de 24 de março de 2005 (Lei de Biossegurança) é dever do pesquisador principal comunicar a CIBio qualquer modificação no projeto ou qualquer evento imprevisto ou acidentes durante a realização dos procedimentos.

Atenção:

É obrigatória a apresentação de relatório anual das atividades desenvolvidas quando solicitado pela CIBio. O não cumprimento dessa exigência acarretará em perda do credenciamento para trabalho com OGM em regime de contenção.

Profa. Dra. Giselle Zenker Justo
Presidente da CIBio/UNIFESP

CIBio UNIFESP – Rua 3 de Maio, 100 / 4º andar – São Paulo - SP

ANEXO II – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIFESP
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

SP

São Paulo, 23 de maio de 2017
CEP N 5590240417

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a): Camila Braggion
Depto/Disc: Biofísica
Jane Zveiter De Moraes (orientador)

Título do projeto: "Utilização do Caenorhabditis elegans como método alternativo para avaliação do potencial alergênico de químicos.".

Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa UNIFESP/HSP

Trata-se de projeto de Doutorado do aluno(a) Camila Braggion no(a) Programa de Biologia Molecular, sob orientação/supervisão do(a) prof.(a) dr.(a) Jane Zveiter de Moraes.

A pele é a primeira barreira de proteção contra infecções, e participa de mecanismos essenciais no controle imunorregulatório. Alguns compostos químicos são imunotóxicos por serem capazes de iniciar, promover ou exacerbar um processo imune. O que ocorre mais frequentemente é uma reação inflamatória da pele conhecida como dermatite de contato (DC). A dermatite de contato pode ser alérgica, também referida como sensibilidade de contato, que atinge 15 a 20% da população caucasiana. Centenas de produtos químicos induzem sensibilização de pele levando à Dermatite de contato alérgica (DCA), o que passou a ser um importante problema de saúde ambiental e ocupacional. O desenvolvimento de testes alternativos ao uso de animais é certamente um desafio científico e, apesar dos grandes esforços financeiros feitos por diferentes instituições públicas e privadas na Europa e EUA, alguns exemplos de testes recentes foram validados para avaliação do potencial alergênico e sensibilização, como o Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) in chemico OECD 442C, KeratinoSens TM (HaCaT) OECD 442D e o h-CLAT OECD 422E. Um estudo publicado por nosso grupo em 2015 teve como objetivo desenvolver e padronizar uma metodologia in vitro capaz de predizer o potencial alergênico de agentes químicos. Foi mostrado, utilizando a linhagem celular mielomonocítica THP-1, que a exposição química por 48h foi necessária para identificar 22 dos 23 sensibilizadores escolhidos pela análise da expressão de CD86. A análise da secreção de IL-8 após 24 horas de incubação química pareceu ser uma alternativa para avaliar a expressão de CD54. Em conjunto, os resultados mostraram que a combinação das análises da expressão de CD86 e da secreção de IL-8 permitiu prever a alergenicidade. O presente trabalho tem como objetivo utilizar os mesmos químicos sensibilizadores testados por nosso grupo, porém em um modelo mais complexo, que é o nematoide C.elegans. A predição do potencial alergênico vai ser feita utilizando a análise da expressão de duas vias de sinalização: a via Keap1-Nrf2-ARE (utilizada no teste validado Keratinosense) e a via FOXO, ambas relacionadas com estresse oxidativo. A proteína Nrf tem um homólogo em C.elegans chamado SKN-1 e a FOXO, um homólogo chamado DAF-16. Faremos então a avaliação da expressão de ambos os homólogos utilizando uma construção genética, que é a adição de GFP nos promotores ativados por SKN-1 e DAF-16. Inicialmente serão feitos ensaios de padronização e a determinação da LC50 dos químicos no nematóide. Posteriormente faremos as análises de fluorescência e os testes de estresse oxidativo, longevidade e por fim a análise de RNAm de DAF-16 e SKN-1 por meio de RT-qPCR.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 22/05/2017, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:
1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** ao CEP até a conclusão do protocolo.

Rua Botucatu, 572, 1º andar conjunto 14 CEP 04023-061 São Paulo - tel: 55 (11) 5571-1062 / fax: 55 (11) 5539-7162
Horário de atendimento: Segundas, Terças, Quintas e Sextas, das 9:00 as 13:00hs : e-mail:secretaria.cepunifesp@gmail.com
CEP Nº 5590240417

UNIFESP
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

SP

Atenciosamente,

Prof. Dr. Miguel Roberto Jorge

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

ANEXO III - Publicações no período.

- Moraes JZ, Hamaguchi B, **Braggion C**, Speciale ER, Cesar FBV, Soares GFDS, Osaki JH, Pereira TM, Aguiar RB. Hybridoma technology: is it still useful? Curr Res Immunol. 2021 Mar 22;2:32-40. doi: 10.1016/j.crimmu.2021.03.002. PMID: 35492397; PMCID: PMC9040095.

- de Aguiar RB, da Silva TA, Costa BA, Machado MFM, Yamada RY, **Braggion C**, Perez KR, Mori MAS, Oliveira V, de Moraes JZ. Generation and functional characterization of a single-chain variable fragment (scFv) of the anti-FGF2 3F12E7 monoclonal antibody. Sci Rep. 2021 Jan 14;11(1):1432. doi: 10.1038/s41598-020-80746-8. PMID: 33446839; PMCID: PMC7809466.

- Moraes JZ, Hamaguchi, B, **Braggion, C**, Speciale, E, Cesar, F, Soares, G, Osaki, J, Aguiar, R, Pereira, T. Alternative Methods to Animal Use for Monoclonal Antibody Generation and Production In: Monoclonal Antibodies [Working Title].1 ed.: IntechOpen, 2020, p. 1-21.