

# Implementação, disponibilidade e contexto regulatório de um modelo de Epiderme Humana Reconstruída no Brasil aceito pela OECD

## Implementation, availability and regulatory status of an OECD accepted Reconstructed Human Epidermis model in Brazil

### RESUMO

Rodrigo De Vecchi<sup>1,8,\*</sup>

Vanja Dakic<sup>1,6</sup>

Guilherme Mattos<sup>1</sup>

Anne-Sophie Rigauddau<sup>III</sup>

Veronica Oliveira<sup>1</sup>

Cristina Garcia<sup>1</sup>

Nathalie Alépée<sup>II</sup>

José Cotovio<sup>II</sup>

Charbel Bouez<sup>IV</sup>

**Introdução:** Em 2014, o Brasil aderiu à crescente lista de países a banir testes de produtos cosméticos em modelos animais. A nova legislação entra em vigor em 2019. Como resultado, o interesse em métodos de testes alternativos validados para avaliação de segurança tem aumentado na academia, indústria e associações. No entanto, a falta de legislação específica sobre o uso de material biológico de origem humana para testes toxicológicos dificulta o acesso aos modelos alternativos *in vitro*. Além disso, a importação no Brasil não é possível em tempo hábil. **Método:** Neste artigo, relatamos o processo de implementação de um modelo de Epiderme Humana Reconstruída (SkinEthic™ RHE) internacionalmente aceito pela OECD, através de uma transferência tecnológica da Episkin Lion para o Brasil, bem como discutimos a evolução regulatória que tem motivado a implementação e a ampla utilização de métodos alternativos à experimentação animal em diversos segmentos além do cosmético e farmacêutico. **Resultados:** O protocolo de fabricação dos tecidos mostrou-se robusto e altamente reprodutível, considerando os parâmetros de controle de qualidade (análise histológica, função barreira e viabilidade tecidual) analisados em 24 lotes fabricados no Brasil. **Conclusões:** A implementação do modelo SkinEthic™ RHE é apenas um primeiro e importante passo em direção a uma nova abordagem para testes de segurança toxicológica no Brasil, realizada com êxito e aqui relatada. No entanto, para seguir plenamente a nova legislação até 2019, a disponibilidade de modelos validados é essencial. Os testes de controle de qualidade realizados nos lotes RHE produzidos no Brasil demonstram que o modelo atende aos critérios de aceitação da OCDE e, portanto, pode ser usado para uma previsão confiável de irritação e classificação de compostos corrosivos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Epiderme Humana Reconstruída; SkinEthic™ RHE; Testes Pré-Clínicos *in vitro*; Métodos Alternativos; Skin Irritation; Corrosion; Safety Assessment; Toxicological tests

### ABSTRACT

**Introduction:** In 2014, Brazil has joined the growing list of countries to ban cosmetic products from being tested on animal models. The new legislation comes into force in 2019. As a result, the interest for validated alternative testing methods for safety assessment has been increasing in academia, industry and associations. However, the lack of specific legislation on the use of biological material of human origin for toxicological tests makes the access to alternative *in vitro* models difficult. Furthermore, importation to Brazil is not possible on timely manner. **Method:** In this article, we report the implementation process of a Reconstructed Human Epidermis (SkinEthic™ RHE), an alternative model internationally accepted by OECD, through a technology transfer from EPISKIN® Lyon to Brazil. Regulatory evolution has been motivating the implementation and wide use of alternative methods to animal testing in several industry segments including cosmetic and pharmaceutical. **Results:** Protocol has been shown to be robust and highly reproducible. Quality control parameters (histological analysis, barrier function test and tissue viability) were performed on 24 batches assembled in Brazil. SkinEthic™ RHE model use allows the full replacement of animal test methods for skin hazards

<sup>I</sup> L'Oréal Research and Innovation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>II</sup> L'Oréal Research and Innovation, Aulnay-sous-Bois, France

<sup>III</sup> EPISKIN, Lyon, France

<sup>IV</sup> L'Oréal Research and Innovation, Clark, USA

<sup>6</sup> Contribuiu igualmente para este trabalho

\* E-mail: rvecchi@rd.loreal.com

Recebido: 02 out 2017

Aprovado: 04 jan 2018



identification. It has regulatory acceptance for several toxicological endpoints, such as the Draize test for skin irritation and corrosion. It allows the reduction and refining of pre-clinical protocols through tiered strategies. Implementation of SkinEthic™ RHE protocol is just a first and important step towards a new approach of toxicological safety testing in Brazil. **Conclusions:** The implementation was successfully done and reported here. However, in order to follow completely the new legislation up to 2019, the availability of validated models is essential. Quality control tests done on RHE batches produced in Brazil demonstrate that the model met OECD acceptance criteria and therefore can be used for reliable prediction of irritation and corrosion classification.

**KEYWORDS:** Reconstructed Human Epidermis; SkinEthic™ RHE; Preclinical In Vitro Testing; Alternative Methods; Skin Irritation; Corrosion; Safety Assessment; Toxicological tests

## INTRODUÇÃO

Desde 1986, a União Europeia (UE) vem implementando uma legislação específica sobre o uso de animais para fins científicos. Em setembro de 2010, a UE adotou a Diretiva 2010/63/UE, que atualizou e substituiu a Diretiva 86/609/CEE sobre a proteção de animais utilizados para fins científicos, que entrou em vigor em 1º de janeiro de 2013. A diretiva se baseia na estrutura ética dos 3Rs (Redução, Refinamento e Substituição - *Reduction, Refinement and Replacement*) de Russell e Burch em 1959<sup>1</sup>, e se compromete com o “desenvolvimento, validação e adoção” de métodos alternativos<sup>2</sup>. Essa diretiva foi apoiada pela Iniciativa de Cidadania Europeia “Stop Vivisection”, que reforçou a sua implementação e expandiu o movimento para uma escala continental. Além da Europa, os EUA e o Japão também criaram órgãos governamentais responsáveis pela regulamentação e reconhecimento de testes *in vitro*<sup>3</sup>. Em 2017, essa iniciativa foi elevada à escala global. Para fornecer um ponto de acesso central, o Centro Interinstitucional do Programa Nacional de Toxicologia para a Avaliação de Métodos Toxicológicos Alternativos desenvolveu um recurso online chamado de Ambiente Químico Integrado (ICE), que permite o acesso a dados de referência de alta qualidade. O ICE atualmente inclui dados sobre toxicidade oral e dérmica aguda, irritação e sensibilização da pele, corrosão ocular e desregulação endócrinológica, assim como previsões *in silico* de endpoints de teste<sup>4</sup>.

Os testes em animais são proibidos para produtos cosméticos na UE desde 2004 e para novos ingredientes desde 2009<sup>5</sup>. A substituição do teste Draize de irritação da pele de coelho, por exemplo, foi motivada na Europa pela estratégia química REACH e Diretivas de Cosméticos. Vários protocolos *in vitro*, incluindo modelos de pele tridimensionais (3D), foram desenvolvidos para superar as limitações do modelo. Comunidade acadêmica e empresas como L'Oréal<sup>6</sup>, Unilever<sup>7</sup>, Procter & Gamble<sup>8</sup> e Henkel<sup>9</sup> têm colaborado para realizar comparações interlaboratoriais<sup>10</sup> e uniram esforços para desenvolver, validar e implementar métodos alternativos em suas rotinas, reduzindo o uso de animais em avaliações de segurança, com o apoio e aceitação de órgãos reguladores. Por conseguinte, o Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos (EURL ECVAM) estabeleceu uma lista de métodos de ensaio celulares validados *in vitro* para estimar a segurança e a toxicidade de ingredientes e misturas<sup>11</sup>.

Nessa força-tarefa global, os sistemas de cultura celular são ferramentas essenciais usadas em uma ampla gama de estudos biomédicos e clínicos em todo o mundo. Métodos de teste baseados em epiderme tridimensional de engenharia de tecidos para aplicações toxicológicas, incluindo irritação da pele e corrosão, usam tecidos comercialmente disponíveis como o EST-1000 (Cell

Systems, St. Katharinen, Alemanha), EpiDerm™ (MatTek Corporation, Ashland, EUA) e Epiderme Humana Reconstituída SkinEthic™ (RHE) (EPISKIN, Lyon, França)<sup>6,12,13</sup>. Tecidos de pele 3D reconstruídos aproximam esses modelos da funcionalidade *in vivo*, reduzindo o custo do desenvolvimento de fármacos e aumentando a eficiência dos ensaios pré-clínicos, minimizando as falhas na descoberta de fármacos e substituindo os testes em animais<sup>14</sup>. Ademais, as condições de teste são controladas e padronizadas, reduzindo a variabilidade entre experimentos e os custos do projeto. Com os avanços da ciência e da tecnologia, os modelos existentes estão sendo constantemente aperfeiçoados e se tornando mais complexos, a fim de refletir as interações entre células, tecidos e órgãos<sup>15</sup>.

O SkinEthic™ RHE é um epitélio completamente diferenciado obtido *in vitro* em um substrato de filtro de policarbonato inerte pela cultura de queratinócitos humanos normais (NHK) em meio quimicamente definido. O SkinEthic™ RHE apresenta epiderme multicamadas aparentemente normal, com camada basal claramente visível, camada espinhosa, camada granular e camada córnea. Ele expressa os principais marcadores de diferenciação proteica e lipídica, como queratinas 1, 10, 11, involucrina e ceramidas<sup>16</sup>. Em conjunto, a arquitetura e a ultraestrutura da epiderme cultivada assemelham-se muito à epiderme *in vivo*. O método de teste SkinEthic™ RHE foi adotado no contexto da OCDE TG 431<sup>17</sup> para distinguir produtos químicos corrosivos e não corrosivos. O sistema de classificação e rotulagem da UE (CLP/GHS) exige a subcategorização de produtos químicos corrosivos nas três subcategorias (1A, 1B e 1C) do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS) das Nações Unidas. Estudos anteriores demonstraram a utilidade do método de teste SkinEthic™ RHE validado para identificar subcategorias UN GHS corrosivas para a pele e para discriminar subcategorias UN GHS corrosivas para a pele<sup>18</sup>. Mais recentemente, a indústria farmacêutica também tem seguido e implementado métodos alternativos para pesquisa e desenvolvimento de fármacos na Europa<sup>19</sup> e no Brasil<sup>20</sup>.

A primeira legislação brasileira sobre testes com animais foi aprovada em 2008<sup>21</sup>, com a criação da Lei Arouca, baseada no uso controlado de animais seguindo a doutrina ética dos 3Rs e assegurando que a morte por meios humanitários envolva o “mínimo sofrimento físico e mental”. Em 2012, o Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicação (MCTIC) incentivou oficialmente a implementação de métodos alternativos, convidando o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro), o Laboratório



Nacional de Biociências (LNBio) e o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) para organizar a Rede Nacional de Métodos Alternativos (Renama). A Renama trabalha em conjunto com o Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM) seguindo a GD 34<sup>22</sup> da OCDE (Documento de Orientação sobre a Validação e Aceitação Internacional de Métodos de Teste Novos ou Atualizados para Avaliação de Perigos da OCDE, 2005). A evolução da GD 34 envolveu os esforços de vários organismos internacionais de validação, incluindo o BraCVAM no Brasil, responsável por identificar e receber solicitações de partes interessadas em submeter testes para validação<sup>23</sup>. A lista dos testes mais promissores é encaminhada para a Renama, que ajuda na priorização e na contribuição para os estudos de validação dos ensaios selecionados. Posteriormente, um estudo de validação é feito sob a supervisão do BraCVAM, e os resultados são enviados ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea). O Concea está encarregado de cadastrar as instituições para novos métodos de teste validados após consulta pública aberta<sup>23</sup>. Em 2014, o Concea reconheceu os primeiros 17 métodos alternativos para testes em animais no Brasil, com base em estudos internacionais publicados oficialmente e diretrizes da OCDE<sup>24</sup>. Além disso, estabeleceu-se um prazo de 5 anos como limite para a substituição obrigatória do método *in vivo* pelo método alternativo disponível, por meio da Resolução Normativa 18, com base nas regras estabelecidas pela Resolução Normativa 17. Em 2016, mais sete métodos alternativos foram reconhecidos e recomendados pelo Concea através da Resolução Normativa 31<sup>25</sup>. A linha do tempo da Figura 1 ilustra a recente evolução regulatória relacionada aos métodos alternativos no Brasil desde 2008.

Durante décadas, a EPISKIN distribuiu os tecidos SkinEthic™ RHE para todo o mundo, enviando-os da França para vários países da Europa, Ásia e Américas. Normalmente, os kits de RHE são classificados simplesmente como reagentes de laboratório, em conformidade com a rastreabilidade total da ISO e diretrizes como as da Food and Drug Administration<sup>26</sup> para produtos *in vitro* de uso exclusivo em pesquisa (RUO). No entanto, a falta de classificação específica e de um processo ágil para liberar kits de RHE nas alfândegas tornam a importação impossível em tempo hábil, já que os tecidos vivos sobrevivem apenas cerca de 3 dias fora da incubadora.

Este trabalho apresenta uma primeira alternativa para lidar com esse dilema, implementando o modelo SkinEthic™ RHE aceito pela OCDE no Brasil. Descrevemos os parâmetros de controle de qualidade medidos em tecidos fabricados no Brasil para garantir sua conformidade com critérios internacionais predefinidos.

## MÉTODO

### SkinEthic™ RHE

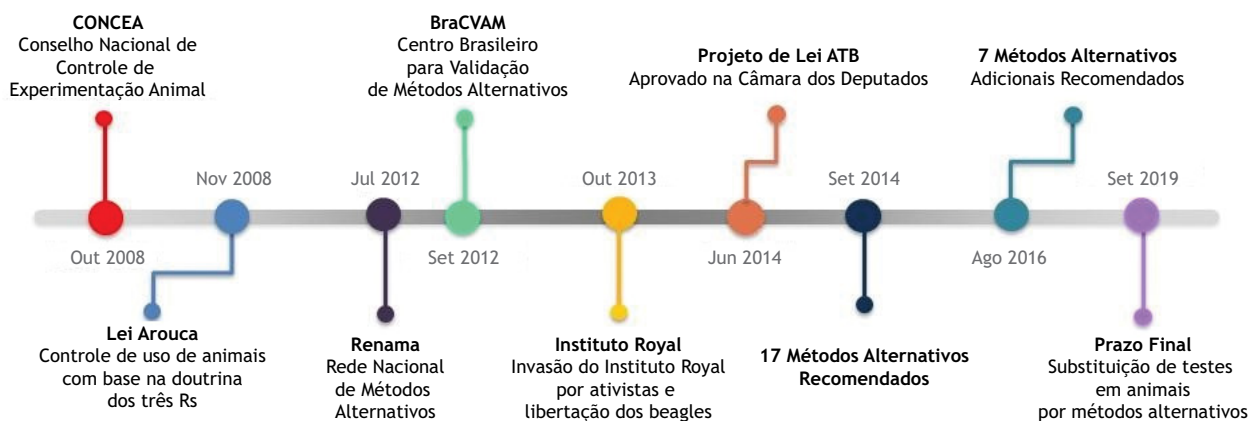
SkinEthic™ RHE é uma epiderme humana reconstruída *in vitro* a partir de queratinócitos humanos normais cultivados em um filtro de policarbonato inerte (0,5 cm<sup>2</sup>) na interface ar-líquido, em meio quimicamente definido<sup>16</sup>. As células, doadas por voluntários com Termo de Consentimento, são fornecidas pelo banco de células EPISKIN. Viabilidade, função de barreira e morfologia são avaliadas para todos os lotes de produção SkinEthic™ RHE. Os tecidos são transferidos para placas de agarose nutritiva e preparados para embarque.

### Produtos químicos

Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), solução salina tamponada com fosfato (D-PBS) sem cálcio e magnésio, Triton X-100 e paraformaldeído foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Dodecil sulfato de sódio (SDS) foi comprado da BIO-RAD (Hercules, CA, EUA). O composto de temperatura de corte ideal (OCT) foi comprado da Sakura Finetek (Torrance, CA, EUA). Hematoxilina foi comprada da Ral Diagnostics (Martillac, França), e a eosina, da Merck KGDA (Alemanha).

### Histologia

O SkinEthic™ RHE foi fixado em paraformaldeído a 4% por 30 min, incorporado em OCT e congelado em nitrogênio líquido. Seções verticais de seis micrômetros de espessura foram cortadas utilizando um criostato e coradas com hematoxilina-eosina para análise histológica dos tecidos.



**Figura 1.** Evolução regulatória relacionada ao controle de experimentação animal e reconhecimento de métodos alternativos no Brasil. Desde a criação do Concea em 2008, o Brasil teve avanços regulatórios significativos. A contagem regressiva para a proibição de testes em animais para vários endpoints acaba em setembro de 2019.



### Teste de viabilidade

O ensaio utilizado para quantificar a viabilidade dos tecidos foi o MTT. A atividade de desidrogenase mitocondrial das células viáveis da construção dos tecidos SkinEthic™ RHE reduz o corante amarelo vital do MTT a um precipitado de formazano azul<sup>27</sup>, que é então extraído dos tecidos usando isopropanol.

Os tecidos foram transferidos para placas de 24 poços contendo 0,3 mL de solução de MTT a 0,5 mg/mL e incubados durante 3 h a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade. Após 3 h de incubação, os tecidos foram colocados em 1500 µL de isopropanol à temperatura ambiente por 2 h. A viabilidade foi medida em 24 produções independentes, utilizando sempre um mínimo de dois tecidos por produção. A densidade óptica (DO) foi medida pela adição de três réplicas técnicas de 200 µL de cada amostra em 96 placas de fundo plano para medir a absorvância a 570 nm. A DO do solvente de extração sozinho foi baixa, isto é, DO < 0,1 para cada lote de RHE testado. Foi estabelecido o limite de aceitabilidade de DO ≥ 0,7 para tecidos viáveis no dia 17 de diferenciação, de acordo com a base de dados histórica da EPISKIN França.

### Função de barreira

A propriedade da função de barreira do tecido foi estimada pelo tempo de exposição necessário para reduzir a viabilidade celular relativa em 50% (ET-50) após a aplicação de Triton X-100 a 1%. Três pontos no tempo foram usados: 6, 4 e 2,5 h. Para cada condição, utilizamos 3 tecidos, incluindo o grupo controle, que foi tratado com água em vez de Triton X-100. Após o tratamento, os tecidos foram transferidos para placas de 24 poços contendo 0,3 mL de solução de 0,33 mg/mL de MTT e incubados durante 3 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade. Após 3 horas de incubação, os tecidos foram colocados em 1500 µL de isopropanol à temperatura ambiente durante a noite. A DO foi medida adicionando um triplicado de 200 µL de cada amostra a 96 placas de fundo plano para medir a absorvância a 570 nm. A viabilidade do tecido tratado com Triton X-100 em diferentes momentos foi comparada com os tecidos de controle negativo concomitantes. Uma faixa de aceitabilidade (limite superior e inferior) para o ET-50 Triton X-100 foi estabelecida nas diretrizes de teste da OCDE 439<sup>28</sup> e 431<sup>17</sup>, variando de 4 a 10 horas.

### Teste de irritação

O teste de irritação foi feito usando produtos químicos de proficiência recomendados nas diretrizes de teste da OCDE 439. Testamos cinco substâncias não irritantes e quatro substâncias irritantes, incluindo líquidos e sólidos. SDS 5% foi usado como referência irritante (controle positivo) e PBS (sem Ca<sup>++</sup> e Mg<sup>++</sup>) serviu como controle negativo (CN), em cada série de experimentos. O valor de DP é considerado válido se for ≤ 18%. Os dados de controle positivo atendem aos critérios de aceitação se a viabilidade média, expressa em % do CN, for < 40% e o valor do desvio padrão (DP) for ≤ 18%.

Os tecidos de RHE foram expostos topicamente a líquidos não diluídos (16 ± 0,5 µl) ou sólidos (16 ± 2 mg) durante 42 min, à temperatura ambiente. Antes da aplicação de sólidos, 10 ± 0,5 µl de água destilada foram espalhados por toda a superfície dos tecidos de RHE. Uma tela de nylon (EPISKIN, França) foi aplicada sobre a substância de teste

como suporte de espalhamento para todas as substâncias de teste líquidas e viscosas. Os tecidos de RHE foram então enxaguados 25 vezes, com 1 mL cada, de PBS estéril sem cálcio e magnésio. Os tecidos tratados foram incubados durante 42 h a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, com 2 mL de meio de crescimento. A citotoxicidade foi determinada medindo-se a atividade de desidrogenase de tecidos RHE viáveis após 42 h de incubação. Cada experimento foi realizado de forma no mínimo triplicada nos lotes de produto de tecido. Cada substância foi testada em tecidos reconstruídos de três diferentes lotes de células.

Após a subtração da DO em branco de todos os dados brutos, os valores médios de DO foram calculados utilizando nove medições por substância-teste (três tecidos com RHE, três repetições/tecido) e a porcentagem de viabilidade celular foi expressa relativamente ao controle negativo da seguinte maneira:  $100 \times \text{DO}_{\text{tratada média}} / \text{DO}_{\text{controle média}}$ . O valor de controle negativo foi definido em 100%. Para mais detalhes, consulte as diretrizes de teste da OCDE 439.

## RESULTADOS

Os modelos de RHE foram produzidos seguindo rigorosamente as mesmas especificações de qualidade dos tecidos originais produzidos na EPISKIN Lyon, França. Para confirmar a reprodutibilidade e a robustez do protocolo no Brasil, foram avaliadas a viabilidade, a função de barreira e a histologia de cada lote de SkinEthic™ RHE gerado. Neste estudo, foram realizadas 24 produções independentes, com 4 lotes celulares diferentes de queratinócitos primários. Os controles de qualidade foram feitos em diferentes estágios de diferenciação e incluíram histologia, função de barreira e viabilidade. Um lote de tecido SkinEthic™ RHE era considerado histologicamente normal se pelo menos quatro camadas viáveis de células estivessem presentes. A histologia dos tecidos analisados durante a segunda, terceira e quarta semana de diferenciação está exibida na Figura 2. Na segunda

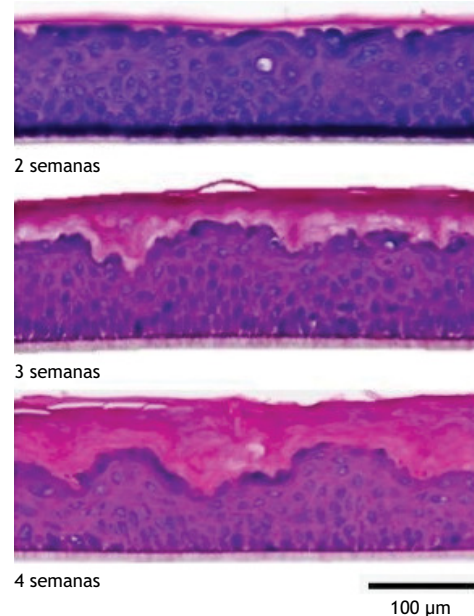


Figura 2. Histologia de SkinEthic™ RHE usando coloração com Hematoxilina/Eosina de um lote representativo durante a 2ª, 3ª e 4ª semana de diferenciação *in vitro*. Barra de escala: 100 µm.



semana de protocolo, o tecido ainda não está totalmente diferenciado, no entanto, pelo menos 4 camadas de células vivas já estão presentes e bem organizadas, com uma camada córnea muito fina. Na terceira semana em cultura, o tecido já está totalmente diferenciado, consistindo de camada basal, *stratum spinosum*, camada granular e *stratum corneum* de várias camadas. Se mantivermos a RHE por mais uma semana, a organização do tecido é preservada, com o aumento da espessura da camada córnea. Nenhuma alteração histológica foi observada nos experimentos.

O ensaio MTT foi utilizado para medir a viabilidade celular. O valor médio de DO para 24 lotes de produção (experimentos independentes) é de  $1,278 \pm 0,050$ , com um mínimo de dois tecidos por produção. A Figura 3 demonstra a reprodutibilidade dos lotes de produção ao longo do tempo. Todos os lotes gerados no Brasil tiveram valores médios de DO acima de 0,7, que é o limite

de aceitação estabelecido pela OCDE TG 431 e 439. A DO do solvente de extração sozinho foi mínima, ou seja,  $DO < 0,1$  para cada lote de produção de SkinEthic™ RHE.

Testes de função de barreira mostraram que os lotes gerados no Brasil estão em conformidade com os padrões 431<sup>17</sup> e 439<sup>28</sup> das Diretrizes de Teste da OCDE. Os valores de ET-50 estavam dentro da faixa de aceitabilidade, variando de 4 a 10 h, para todos os lotes produzidos. O valor médio de 19 lotes foi de  $7,33 \pm 1,45$  h (Figura 4). Esse resultado prova que a RHE produz uma barreira funcional com robustez para resistir à rápida penetração do Triton X-100 no tecido viável.

Todos os produtos químicos da lista de proficiência foram bem classificados usando o endpoint do MTT. Após o tratamento com o grupo de não-irritantes (NI), a viabilidade sempre foi superior a 50%, e após o tratamento com irritantes (I), sempre menor que 50% (Figura 5).

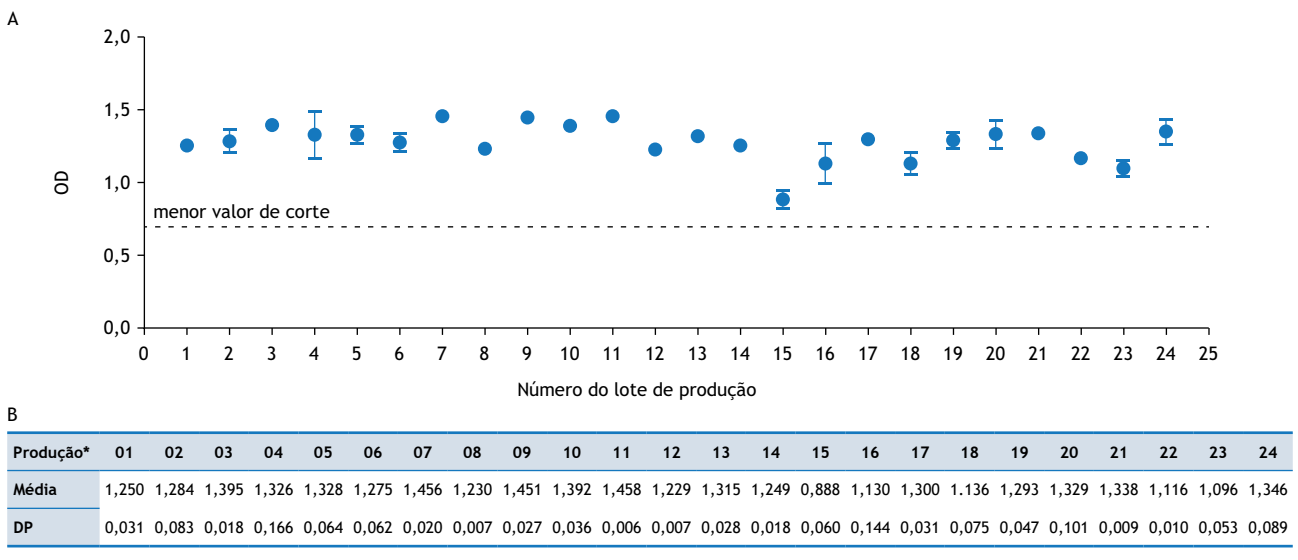


Figura 3. (A) Gráfico mostrando as DOs médias do teste de viabilidade tecidual (MTT) de 24 lotes gerados no Brasil, demonstrando alta repetibilidade e reprodutibilidade. Os pontos representam a DO média de dois tecidos da mesma produção. (B) Tabela com os valores de média e desvio padrão correspondentes ao gráfico A.

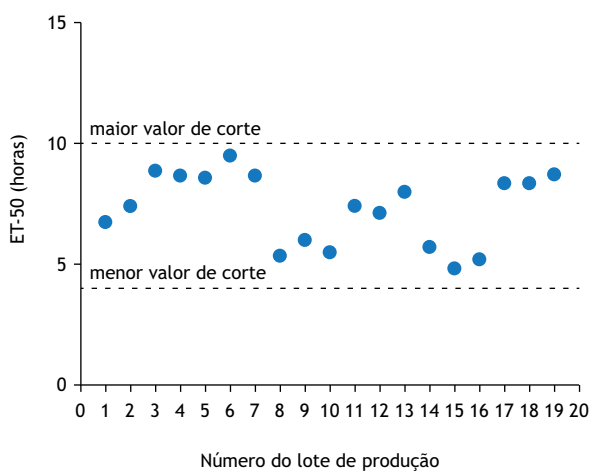


Figura 4. Valores de ET-50 para 19 lotes gerados no Brasil, mostrando alta repetibilidade e reprodutibilidade.

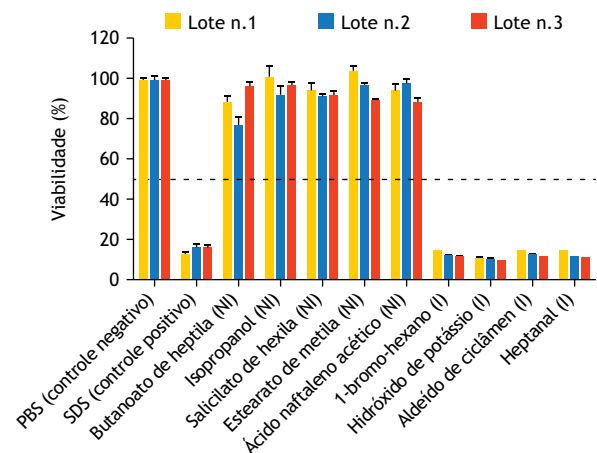


Figura 5. Viabilidade celular após o tratamento com produtos químicos de proficiência sugeridos na diretriz de teste OCDE 439. Cada substância foi testada em tecidos de RHE reconstruídos a partir de três lotes diferentes de células. A barra representa média com SEM.



## DISCUSSÃO

A disponibilidade de métodos de teste alternativos validados depende de protocolos robustos e reprodutíveis para testar sistemas, como o modelo de Epiderme Humana Reconstruída (RHE). Esses modelos têm sido reconhecidos como base técnica para a comunidade científica e diversos segmentos industriais para manter a competitividade internacional das atividades brasileiras de pesquisa, inovação e desenvolvimento.

Vários modelos de pele humana usam células primárias cultivadas ou linhas celulares imortalizadas para produzir tecidos de pele 3D multicamadas artificialmente reconstituídos<sup>29</sup>. Esses tecidos, também conhecidos como modelos epidérmicos humanos reconstituídos, como SkinEthic™ RHE, EpiDerm e outros, estão comercialmente disponíveis e apresentam semelhanças razoáveis com a pele humana em termos de morfologia, composição lipídica e marcadores bioquímicos. Embora não sejam fragmentos de pele humana, esses modelos são ferramentas de teste úteis para a avaliação de segurança de novos compostos para fototoxicidade, corrosividade e irritabilidade. Por isso, vários protocolos de teste foram desenvolvidos para avaliação toxicológica e farmacológica<sup>30</sup>. Por exemplo, versões recentes das diretrizes da OCDE para irritação da pele (TG 439) e corrosão da pele (TG 431) foram publicadas e aceitas internacionalmente<sup>6</sup>.

Relatamos aqui a implementação bem-sucedida do modelo SkinEthic™ RHE validado no Brasil. Este modelo RHE está em conformidade com os padrões globais EPISKIN, com base na avaliação de parâmetros de controle de qualidade, como histologia, função de barreira e testes de viabilidade. Os resultados apresentados aqui (Figuras 2, 3, 4 e 5) confirmam a robustez do modelo SkinEthic™ RHE e sua alta reprodutibilidade. Considerando os resultados obtidos com vários lotes de RHE realizados no Brasil, seguindo rigorosamente o protocolo de produção original praticado na França há décadas, não houve necessidade de revalidação formal. Os métodos de teste que usam epitélios reconstituídos SkinEthic™, principalmente para irritação e corrosão, foram validados e aceitos internacionalmente pelos países membros da OCDE<sup>28,17,31</sup> (OECD Test Guidelines TG 439, 431, 492).

Os recentes avanços regulatórios no Brasil não foram acompanhados de adaptações legislativas. A lei atual não especifica a distribuição de tecidos artificiais, já que data de 1988<sup>32</sup> (artigo 199, § 4, da Constituição Federal Brasileira). Naquela época, os avanços científicos das últimas décadas não poderiam ter sido previstos, bem como a importância da disponibilidade de métodos alternativos à demanda industrial nacional por pesquisa, desenvolvimento e inovação em um cenário de proibição. Ao não especificar os tecidos artificiais, o artigo 199 torna a disponibilidade e a distribuição dos tecidos com RHE incerta no país, devido a possíveis interpretações equivocadas do seu § 4.

Portanto, a ausência de um marco específico no Brasil para conferir segurança jurídica ao amplo uso e disponibilidade de métodos alternativos, como o modelo SkinEthic™ RHE, ainda é um dos fatores que dificultam o desenvolvimento dessa tecnologia no país e precisam ser esclarecidos pelos legisladores. Por outro lado, houve

o reconhecimento dos 24 métodos pelo Concea, abrangendo 11 endpoints, incluindo cinco nos quais o modelo RHE é útil e internacionalmente reconhecido, contribuindo para a redução, substituição e refino do uso de animais em atividades de pesquisa e testes toxicológicos pré-clínicos. No entanto, o acesso, a disponibilidade e a implantação de métodos alternativos ainda são limitados pelo referido parágrafo da Constituição Brasileira, datado de 1988<sup>32</sup>. Há quase 30 anos, não era possível prever os próximos avanços científicos no país e a importância da disponibilidade de métodos alternativos para suprir a demanda industrial no atual cenário de proibições. Destarte, o referido artigo não é aplicado no caso de RHE, pois refere-se especificamente às condições e exigências para a remoção, coleta e processamento de órgãos, tecidos e substâncias humanas para transplante, pesquisa e tratamento.

Embora os epitélios humanos artificialmente reconstituídos *in vitro* não apareçam nesses artigos legais, a RHE não pode ser classificada como tecido ou órgão humano, uma vez que não é removida ou desenvolvida pelo corpo humano, mas gerada em laboratório a partir de culturas de queratinócitos epidérmicos humanos, legalmente importadas e comercializadas livremente no território brasileiro. Além disso, o modelo SkinEthic™ RHE é estruturalmente constituído de um único tipo de célula, que cresce em uma cultura de células multicamadas com interface ar-líquido, se diferencia e permite a formação do *stratum corneum*, mimetizando a barreira da pele humana. A reprodutibilidade desse processo de reconstrução, aceita internacionalmente e recomendada por várias diretrizes de teste da OCDE, só é possível seguindo um protocolo específico e extensivamente manipulado, desenvolvido e validado ao longo de décadas, no qual as células são transferidas para placas de policarbonato e incorporadas em um meio quimicamente definido.

Além de sua semelhança funcional com a epiderme humana, que é apenas a camada mais externa da pele humana, há um consenso de que a RHE não se enquadra nos parágrafos do artigo 199 da Constituição, pois é constituída de células extensivamente manipuladas, inteiramente geradas em laboratório. Essas culturas celulares de múltiplas camadas apresentam características bioquímicas e morfológicas que as distinguem dos tecidos e órgãos humanos, pelo que não podem ser classificadas como tecidos ou órgãos humanos. Essa interpretação foi confirmada pelo parecer jurídico n. 01/2017, emitido pela CGREG/Direg/Anvisa, afirmando que a RHE é um produto somente para Uso em Pesquisa (ROU), isento de vigilância e controle da Anvisa, conforme a ressalva estabelecida no art. 2º, inciso VIII da Resolução RDC n. 36/2015<sup>33</sup>. Ademais, o modelo RHE é uma ferramenta útil para substituir os métodos de testes em animais, como o teste Draize de irritação de coelho *in vivo*<sup>13</sup>, já que os dados resultantes são aceitos internacionalmente pela OCDE. No Brasil, o uso e a implementação de métodos alternativos validados são reconhecidos e recomendados pelo Concea e apoiados pela Renama e pelo MCTIC<sup>34</sup>.

## CONCLUSÕES

A implementação do modelo SkinEthic™ RHE validado no Brasil abre a possibilidade de avaliação de vários endpoints toxicológicos, desde irritação da pele e corrosão até outros endpoints, como



sensibilização, penetração na pele, fototoxicidade e genotoxicidade. Os modelos de epitélio humano reconstruídos *in vitro* reproduzem as principais características dos tecidos humanos *in vivo*. Sua robustez, reprodutibilidade e proximidade com tecidos humanos permitem a superação dos testes em animais, a construção de arquiteturas de triagem *in vitro* e a avaliação preditiva dos efeitos em humanos. Além disso, esses modelos propiciam economia de tempo e custo. Por todas essas razões, os modelos de tecido humano reconstruído *in vitro* são usados maciçamente em todo o mundo para avaliação de segurança e eficácia. A implementação de modelos alternativos aceitos pela OCDE no Brasil é uma das

formas mais eficazes de promover a implementação de métodos alternativos antes da proibição completa em 2019. A legislação brasileira sobre o uso de materiais biológicos de origem humana torna o modelo de epiderme *in vitro* inacessível para uso amplo. Para implementar completamente a nova legislação até 2019, a disponibilidade de modelos *in vitro* é essencial. Portanto, documentos públicos específicos que confirmam segurança jurídica são de grande relevância para o país. Testes de controle de qualidade feitos em lotes de RHE produzidos no Brasil mostram que o modelo atende aos critérios de aceitação da OCDE e, portanto, pode ser usado para predição confiável de classificação de irritação e corrosão.

## REFERÊNCIAS

1. Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique. Wheathampstead (UK): Universities Federation for Animal Welfare; 1992.
2. Germain, P, Chiapperino, L, Testa, G. The European politics of animal experimentation: from Victorian Britain to 'Stop Vivisection'. *Stud Hist Philos Biol Biomed Sci.* 2017;64:75-87. <https://doi.org/10.1016/j.shpsc.2017.06.004>
3. Araújo GL, Campos MA, Valente MA, Silva SC, França FD, Chaves MM et al. Alternative methods in toxicity testing: the current approach. *Braz J Pharm Sci.* 2014;50(1):55-62. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502011000100005>
4. Bell SM, Phillips J, Sedykh A, Tandon A, Sprankle C, Morefield SQ et al. An integrated chemical environment to support 21st-Century toxicology. *Environ Health Perspect.* 2017;125(5):054501. <https://doi.org/10.1289/EHP1759>
5. Almeida A, Sarmento B, Rodrigues F. Insights on *in vitro* models for safety and toxicity assessment of cosmetic ingredients. *Int J Pharm.* 2017;519(1-2):178-85. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.01.024>
6. Alépée N, Grandier MH, Tornier C, Cotovio J. An integrated testing strategy for *in vitro* skin corrosion and irritation assessment using SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis. *Toxicol In Vitro.* 2015;29(7):1779-92. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.07.012>
7. Basketter DA, Whittle E, Chamberlain M. Identification of irritation and corrosion hazards to skin: an alternative strategy to animal testing. *Food Chem Toxicol.* 1994;32(6):539-42. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(94\)90111-2](https://doi.org/10.1016/0278-6915(94)90111-2)
8. Robinson MK, Cohen C, Fraissinette AB, Ponc M, Whittle E, Fentem JH. Non-animal testing strategies for assessment of the skin corrosion and skin irritation potential of ingredients and finished products. *Food Chem Toxicol.* 2002;40(5):573-92. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00005-4](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00005-4)
9. Mewes KR, Fischer A, Zöller NN, Laubach V, Bernd A, Jacobs A et al. Catch-up validation study of an *in vitro* skin irritation test method based on an open source reconstructed epidermis (phase I). *Toxicol In Vitro.* 2016;36:238-53. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.07.007>
10. Reus AA, Reisinger K, Downs TR, Carr GJ, Zeller A, Corvi R et al. Comet assay in reconstructed 3D human epidermal skin models—investigation of intra- and inter-laboratory reproducibility with coded chemicals. *Mutagenesis.* 2013;28(6):709-20. <https://doi.org/10.1093/mutage/get051>
11. European Parliament. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010. Protection of animals used for scientific purposes. *Official J European Union.* 2010 Oct 20.
12. Groeber F, Schober L, Schmid FF, Traube A, Kolbus-Hernandez S, Daton K et al. Catch-up validation study of an *in vitro* skin irritation test method based on an open source reconstructed epidermis (phase II). *Toxicol In Vitro.* 2016;36:254-61. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.07.007>
13. Lee M, Hwang JH, Lim KM. Alternatives to *In vivo* draize rabbit eye and skin irritation Tests with a focus on 3D reconstructed human cornea-like epithelium and epidermis models. *Toxicol Res.* 2017;33(3):191-203. <https://doi.org/10.5487/TR.2017.33.3.191>
14. Amelian A, Wasilewska K, Megias D, Winnicka K. Application of standard cell cultures and 3D *in vitro* tissue models as an effective tool in drug design and development. *Pharmacol Rep.* 2017;69(5):861-70. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.03.014>
15. Vries RB, Leenaars M, Tra J, Huijbregtse R, Bongers E, Jansen JA et al. The potential of tissue engineering for developing alternatives to animal experiments: a systematic review. *J Tissue Eng Regen Med.* 2015;9(7):771-8. <https://doi.org/10.1002/term.1703>
16. Rosdy M, Clauss LC. Terminal epidermal differentiation of human keratinocytes grown in chemically defined medium on inert filter substrates at the air-liquid interface. *J Invest Dermatol.* 1990;95(4):409-14. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12555510>
17. OECD Library. *In vitro* skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method. Paris: OECD; 2016. (OECD Guideline for the testing of chemicals, Vol. 431).
18. Alépée N, Robert C, Tornier C, Cotovio J. The usefulness of the validated SkinEthic™ RHE test method to identify skin corrosive UN GHS subcategories. *Toxicol In Vitro.* 2014;28(4):616-25. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.12.013>



19. Goh JY, Weaver RJ, Dixxon L, Platt NJ, Roberts RA. Development and use of *in vitro* alternatives to animal testing by the pharmaceutical industry 1980-2013. *Toxicol Res (Camb)*. 2015;4(5):1297-307. <https://doi.org/10.1039/C5TX00123D>
20. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2013.
21. Marques RG, Morales MM, Petroianu A. Brazilian law for scientific use of animals. *Acta Cir Bras*. 2009;24(1):69-74. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502009000100015>
22. OECD. Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment. Paris: OECD; 2005. (OECD Series on testing and assessment, Vol. 34).
23. Presgrave O, Moura W, Caldeira C, Pereira E, Bôas MH, Eskes C. Brazilian Center for the Validation of Alternative Methods (BraCVAM) and the process of validation in Brazil. *Altern Lab Anim*. 2016;4(1):85-90.
24. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Resolução normativa N° 18, de 24 de setembro de 2014. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil, nos termos da Resolução Normativa n° 17, de 3 de julho de 2014, e dá outras providências. *Diário Oficial União*. 2014 set 25.
25. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Resolução Normativa N° 31, de 18 de agosto de 2016. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. *Diário Oficial União*. 2016 ago 19.
26. U.S. Department of Health and Human Service. Food and Drug Administration - FDA. Distribution of *in vitro* diagnostic products labeled for research use only or investigational use only: guidance for industry and food and drug administration staff. Silver Spring: Center for Biologics Evaluation and Research; 2013.
27. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 16;65(1-2):55-63, 1983.
28. OECD. *In vitro* skin irritation reconstructed human epidermis (RHE) test method. Paris: OECD; 2015. (OECD Guideline for the testing of chemicals, Vol. 439).
29. Hewitt NJ, Edwards RJ, Fritsche E, Goebel C, Aeby P, Scheel J et al. Use of human *in vitro* skin models for accurate and ethical risk assessment: metabolic considerations. *Toxicol Sci*. 2013;133(2):209-17. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft080>
30. Netzlaff F, Lehr CM, Wertz PW, Schaefer UF. The human epidermis models EpiSkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *Eur J Pharm Biopharm*. 2005;60(2):167-78. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2005.03.004>
31. OECD. Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage Paris: OECD; 2015. (OECD Guideline for the testing of chemicals, Vol. 492).
32. Senado Federal (BR). Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília, DF: Senado Federal. 1988.
33. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução - RDC N° 36, de 26 de agosto de 2015. Dispõe sobre a classificação de risco, os regimes de controle de cadastro e registro e os requisitos de rotulagem e instruções de uso de produtos para diagnóstico *in vitro*, inclusive seus instrumentos e dá outras providências. *Diário Oficial União*. 27 ago 2015.
34. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (BR). Portaria Administrativa N° 3.856, 2017. *Diário Oficial União*. 12 set 2017.

---

#### Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.

Para ver uma cópia desta licença, visite [http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt\\_BR](http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR).