

I CONGRESSO BRASILEIRO DE MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS NA PESQUISA E NO ENSINO CBMALT

06 a 09 de novembro de 2023
Rio de Janeiro, RJ



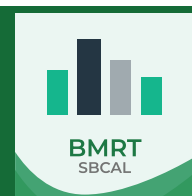
CBMAlt **20**
23

I Congresso Brasileiro de Métodos Alternativos ao Uso de Animais

Biological Models Research and Technology

V3, N1

ISSN: 2675-9225



01 | 3RS (SUBSTITUIÇÃO, REDUÇÃO E REFINAMENTO) E A LEGISLAÇÃO DE PAÍSES DAS AMÉRICAS: UMA ANÁLISE COMPARATIVA

Julio Cesar Queiroz PENHA¹, Ana Claudia de Menezes CRUZ¹, Helena Carla CASTRO¹

¹Universidade Federal Fluminense

E-mail autor correspondente: jc_queiroz@id.uff.br

Introdução: O uso ético e humanizado dos animais é de extrema importância para a garantia do seu bem-estar e dos resultados obtidos nas pesquisas nas quais fazem parte. Sabe-se que diversos fatores podem interferir de forma negativa nos resultados das pesquisas e, muitos deles, interferem no bem-estar desses animais. O princípio dos 3Rs foi proposto há 60 anos e continua norteando as atividades de ensino e pesquisa envolvendo o uso de animais, base para o surgimento de novas ferramentas como os 3Ss, 3Vs, 6Ps, 10Fs e 10Rs. **Objetivos:** O presente trabalho teve como objetivo analisar a presença do princípio dos 3Rs nas principais leis de países das Américas. **Material e Métodos:** Foram analisadas legislações de 21 países (Argentina, Bolívia, Brasil, Canadá, Chile, Colômbia, Costa Rica, Cuba, El Salvador, Equador, Estados Unidos, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Paraguai, Peru, República Dominicana, Uruguai e Venezuela), observando a presença do princípio nas leis genéricas de proteção dos animais e específicas acerca do uso de animais em ensino e pesquisa. As normativas dos países analisados foram obtidas nas páginas oficiais dos respectivos governos. Realizou-se uma abordagem qualitativa, na qual buscou-se a análise e interpretação dos aspectos importantes, sendo observadas atitudes e tendências acerca do tema. **Resultados:** A partir da análise, o princípio dos 3Rs foi identificado em 17/21 países estudados (exceção de Bolívia, Canadá, Equador e Honduras). Dentre eles, em 16/17 observou-se a substituição nos instrumentos legais (exceção do Chile); em 7/17 a redução (exceção de Argentina, Chile, Colômbia, El Salvador, Nicaragua, Panamá, Paraguai, Peru, República Dominicana e Venezuela); e em 14/17 o refinamento (exceção de Nicarágua, Paraguai e Venezuela). **Conclusão:** A maioria dos países analisados demonstrou o compromisso com o uso ético e o bem-estar dos animais utilizados em pesquisas, ao incorporar o princípio dos 3Rs em suas legislações. Além disso, a substituição emergiu como o princípio mais presente, refletindo na crescente busca por alternativas ao uso de animais nos últimos anos. Quando métodos alternativos não são viáveis, redução e refinamento devem ser priorizados na condução das atividades de ensino e pesquisa, busca contínua pela ética no uso de animais em atividades científicas.

Palavras-chave: América. Bem-estar animal. Legislação. Uso ético. 3Rs.

02 | ACUTE ORAL TOXICITY ASSESSMENT OF PESTICIDES

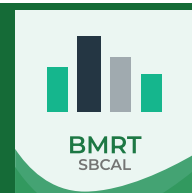
Mariela LENZE¹, Pedro RAMÍREZ¹, Martina BENEDETTI¹, Julieta ROCO¹, María Laura GUTIÉRREZ¹

¹CONICET - UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES.

Introduction: Agencies worldwide have attempted to develop nonanimal approaches to predict acute systemic toxicity, but it remains a challenge yet. In Argentina, the rodent acute oral lethal dose (LD50) is demanded for products registration. However, local regulatory organisms and industries are willing to replace the *in vivo* assay. Our goal is to develop an integrated approach for acute oral toxicity assessment of pesticides. **Materials and methods:** The BALB/3T3 Neutral-Red Uptake Cytotoxicity Assay (OECD 129) was used to estimate the *in vitro* LD50 values of 20 pesticide formulations, which were provided by ATANOR S.C.A and GLEBA S.C.A companies along with their *in vivo* LD50 doses. *In vitro/in vivo* datasets were classified as Extremely Hazardous (EH:<50mg/Kg), Moderately Hazardous (MH:50-2000mg/Kg) or Unlikely Hazardous (UH:>2000mg/Kg). **Results:** None of the pesticides was classified as EH for both datasets. With the *in vivo* data, 80% was classified as UH while 20% as MH. In the *in vitro* assay 10% was classified as UH while 90% as MH. The concordance was 30%, none of the *in vitro* LD50 values were underestimated and 70% was overestimated. *In vitro* classification is more conservative than *in vivo* one, most of the pesticides were categorized as UH with the *in vivo* data unlike the *in vitro* data that fell into the MH level. In addition, I am currently working with different softwares such as SwissADME, ICE (Integrated Chemical Environment) and QSAR toolbox to predict the physicochemical descriptors as well as the ADME parameters of the pesticide active ingredients. **Conclusion:** We expect to integrate the *in vitro* results with the *in silico* data in order to develop an acute oral toxicity prediction model for pesticides, which would represent a first step to replace the *in vivo* assay.

Key words: ORAL TOXICITY, 3T3 CYTOTOXICITY

Funding: National Council of Science of Argentina and Ministry of Science of Argentina.



03 | ADAPTATION OF A RECONSTITUTED HUMAN OCULAR EPITHELIUM MODEL (TOXIN OCULAR) TO AN ANIMAL-FREE CONDITION

Bruna BOSQUETTI^{1,2}, Carolina Motter CATARINO¹, Meg Cristina de Castilho COSTA¹, Artur Christian Garcia da SILVA², Amanda Ferreira KATO¹, Emanoela Lundgren THÁ¹, Tugstênio Lima de SOUZA¹, Andrezza Di Pietro Micali CANAVEZ¹, Desiree Cigarán SCHUCK¹, Marize Campos VALADARES²

¹ Safety Assessment Management - Grupo Boticário

² Laboratory of Education and Research in *In vitro* Toxicology - Universidade Federal de Goiás

Introduction: The vulnerability of the human corneal epithelium to damage from various substances and environmental factors highlights the significance of assessing eye corrosion and irritation for toxicological evaluations. Traditional approaches relied on animal models, but ethical concerns and scientific motivations spurred the development of alternative methods like reconstituted human corneal epithelium (RhCE) models. **Objectives:** This study aimed to create and validate an accessible and reproducible RhCE protocol based on the ToxIn Ocular model. The goal was to employ a chemically defined culture medium and animal-free conditions, addressing the limitations of previous models and methods. **Materials and Methods:** HaCaT keratinocytes were cultured on 24-well inserts coated with collagen I (bovine) at 5×10⁵ cells/insert. Four media conditions (A, B, C, and D) were evaluated for tissue morphology and functionality. The selected medium (D) was used for further testing. The RhCE model's performance in ocular irritation assessment was measured by exposing tissues to 11 substances with established GHS classifications. Additionally, HaCaT cells were adapted to animal-free conditions using a straightforward process, involving the substitution of fetal bovine serum (FBS) with human serum (HS) in the culture medium, trypsin, and freezing medium. Morphology, gene expression, and other parameters were assessed under different conditions. **Results and Discussion:** No significant differences were observed in tissue morphology and functionality between the evaluated media conditions and the control. Substances categorized as non-classified achieved favorable cell viability (>60%), while others had viability below this threshold. This indicates the potential of the model for assessing irritant substances. Transitioning HaCaT cells to an animal-free environment, particularly using 5% HS supplementation, did not negatively impact cellular aspects. **Conclusion:** This study achieved successful adaptations to the Ocular ToxIn model, substantially reducing the reliance on animal-derived inputs. The protocol developed enabled the assessment of substance irritancy, showcasing the model's suitability for identifying non-irritating substances. The transition of HaCaT cells to an animal-free culture environment, particularly using 5% HS supplementation, displayed no adverse effects on vital cellular attributes. Thus, this research contributes to the advancement of more ethical, accessible, and reproducible methods for toxicological evaluations and cosmetics testing, reducing the need for animal experimentation, and addressing societal concerns.

Key words: Human corneal epithelium, reconstituted model, ocular irritation, toxicological evaluation, alternative methods, animal-free conditions, HaCaT cells

04 | ADIPOGENESIS-ON-A-CHIP: A MICROPHYSIOLOGICAL SYSTEM TO IMPROVE hASCs ADIPOGENIC DIFFERENTIATION POTENTIAL AND REDUCE ANIMAL TESTING

Isidoris Rodrigues de SOUZA¹, Cintia Delai da Silva HORINOCHI¹, Andreia Akemi SUZUKAWA¹, Alessandra Melo de AGUIAR¹, Bruno DALLAGIOVANNA^{1*}

¹Laboratório de Biologia Básica de Células-Tronco. Instituto Carlos Chagas – ICC/Fiocruz-PR.

¹CONICET - UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES.

Author e-mail: bruno.dallagiovanna@fiocruz.br

Introduction: Microphysiological systems (MPS) have been claimed as a breakthrough technology as they represent a promising approach towards the development of more ethical and accurate alternative methods to animal testing. We have previously described an innovative and sensitive *in vitro* model using adipose-derived mesenchymal stem cells (hASCs) induced to adipogenic differentiation in a 96-well format to estimate the starting dose for the acute toxic class method. The method was proved by using the inhibition of adipogenesis to predict the LD50 of test substances evaluated. **Objectives:** Aiming to create a more physiologically relevant microenvironment and thus improve the predictive power of the assay, we propose to transfer the methodology to microfluidics platforms. **Material and Methods:** hASCs were cultured in a microfluidic device (ChipShop GmbH, Germany) for 24h. The MPS used continuous medium flow of 10 µL/h over the hASCs monolayer, generated by a syringe pump (EFF 311, Insight, Brazil) for 10 days. Adipogenic differentiation was induced by perfusion of differentiation medium (DMEM supplemented with fetal bovine serum, L-glutamine, insulin, dexamethasone, indomethacin, and IBMX). Control cells were perfused with basal medium. hASCs were also induced to adipogenesis for 10 days in regular plates for comparison purposes. Cells were fixed, lipid droplets were stained with Nile Red and nuclei were counterstained with DAPI. Adipogenic differentiation was determined by assessing the area of adipose-positive cells. **Results:** hASCs were shown to retain their adipogenic potential when cultured under continuous flow conditions. A higher lipid accumulation was observed in hASCs within microfluidics devices than in 96-well plates. **Conclusion:** MPS platforms increased hASC differentiation potential, indicating that the use of microfluidics is advantageous and promising to develop methods that correlate the adipogenic differentiation to assess substance toxicity, thus contributing to reduce animal testing.

Key words: Adipogenesis. Cytotoxicity. Microfluidics. Organ-on-a-chip. Stem cells.

Funding: Inova Fiocruz/Fundação Oswaldo Cruz.

Ethics Committee Approval: Fundação Oswaldo Cruz, Brazil (CAAE: 48374715.8.0000.5248).



05 | ADVANCEMENTS IN STRATEGIES FOR ASSESSING NEPHROTOXICITY

Larissa Camila Ribeiro de SOUZA¹, Anne Josiele de Lima VITAL¹, Stellamaris SOARES¹, Mark T CRONIN², Ana Maria WAAGA-GASSER, Jonas Pereira RAMOS¹, Brenner Cunha CARVALHO¹, Nathalia Stephanie Oliveira NASCIMENTO¹, Bárbara Moreira AMARAL¹, Maria Eduarda Souza Leite AMORIM¹, Glória Regina FRANCO¹, Carlos Alberto TAGLIATI¹

¹Federal University of Minas Gerais (UFMG), ²Harvard Medical School, ³Liverpool John Moores University

Introduction: Drug-induced nephrotoxicity contributes significantly to kidney diseases, including acute injuries and chronic diseases. It is a global concern, as it is one of the main causes of mortality and morbidity. The damage to nephron segments, glomerular and tubular damage can occur due to exposure to drug toxicity, potentially leading to acute or chronic functional changes. Alternative methods may be helpful to detect nephrotoxicity. **Objectives:** The aim of this study was to investigate advances in nephrotoxicity assessment strategies.

Methods: An integrative review was performed to provide a greater comprehensive understanding of the advancements in strategies for assessing nephrotoxicity. **Results:** Animal models are still used in experimentation. However, it is increasing the number of studies in alternative methods, such as *in vitro* assays. This study also identified advances in several tools and technologies, such as omics technologies, integrating experimental approach and computational models, to identify sets of markers, to guide diagnoses, follow disease progression and identify new therapeutic targets. In the study of renal toxicity, our data showed that computational biology represents about 27.1% of these technologies, followed by genomics (21.4%) and metabolomics (17%). Advances in genome-editing technologies, such as CRISPR/Cas9, may promote the use of kidney organoids to study inherited genetic kidney diseases. *In silico* approaches constitute a battery of methods that aim to evaluate the characteristics of a certain compound from the integration of available data about ones, similarities between compounds and molecular characteristics that may be indicative of the ability to cause damage. New models such as organoids, 3D bioprinting and the structure of adverse outcome pathways may also have contributed in understanding the mechanisms of nephrotoxicity. The latter is a systematic approach used to organize existing toxicological knowledge and translate mechanistic information into adverse effects, establishing relationships between parameters of interest to risk evaluators and available data. The complexity of renal physiology presents significant challenges in predicting nephrotoxicity and developing safer drugs. **Conclusion:** The search for new biomarkers and pathways involved in nephrotoxicity can be better detected through an integrated model. New tools using alternative methods are promising as a strategy on nephrotoxicity research.

Key words: Alternative methods. Biomarkers. New technologies. Renal toxicity.

Funding: Brazilian research National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Research Support Foundation of Minas Gerais State (Fapemig) and Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG (PRPq/UFMG).

06 | ALTERNATIVE MODELS FOR AD DEMONSTRATE GENES DIFFERENTIALLY EXPRESSED TO BIOLOGICAL FUNCTIONS SIMILAR TO *Mus musculus*

Flávia Suelen DE OLIVEIRA PEREIRA¹, Giovanna CARELLO-COLLAR², Vitória Vitalina Margarita RYSSINA³, Daiana Silva de ÁVILA¹, Marco Antônio DE BASTIANI² and Eduardo Rigon ZIMMER²

¹ Universidade Federal do Pampa, Uruguiana, Rio Grande do Sul-Brazil;

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul-Brazil;

³ Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rio Grande do Sul-Brazil;

Introduction: The principle of the 3Rs (Replacement, Reduction and Refinement) proposes the use of alternative models in research for reducing the use of mammals. Alternative models harboring human mutations have high homology and are less onerous compared to the use of mammals. Thus, these models are highly suited to understanding the etiology of several diseases, including Alzheimer's Disease (AD). In AD, mutations in genes coding for amyloid precursor protein (APP) and presenilins (PSEN) lead to increased amyloid-beta peptide (A β) production, release and accumulation. However, it is still necessary to investigate whether the effects found in alternative models can be directly related to mechanisms associated with the A β in mammals. **Objectives:** To determine overlapping differentially expressed genes (DEGs) and biological processes in alternative (*Caenorhabditis elegans*, *Danio rerio* and *Drosophila melanogaster*) and mouse models harboring APP or PSEN mutations. **Materials and Methods:** We used the Gene Expression Omnibus (GEO) repository to search for available RNA-Sequencing studies of alternative (*Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* and *Danio rerio*) and mouse (*Mus musculus*) models of AD-related amyloidosis. We selected three datasets (GSE198684, GSE109489, and GSE158233) for alternative models and two datasets (GSE186710 and GSE144746) for *Mus musculus*. All animal models are used in studies to AD. The data were downloaded using the GEOquery package and the differentially expressed genes were defined as having adjusted p-value < 0.05. We evaluated the biological process which the DEGs are involved in to find similarities between the alternative and mammals models. All analyses were performed in RStudio. **Results:** Alternative and mouse models of amyloidosis share DEGs related to unfolded proteins and immune and inflammatory systems. The number of DEGs seems to increase as a function of the A β plaque deposition. **Conclusion:** Our findings suggest that alternative models can offer important new insights into the understanding of amyloid-related processes in AD.

Key words: Beta-amyloid. DEGs. *Mus musculus*. Presenilin. RNASeq.

Financial support: CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.



07 | APLICAÇÃO DO SOFTWARE FIJI PARA AVALIAR A INTERAÇÃO DO ZIKV EM CULTIVO DE CÉLULA TRIDIMENSIONAL

Adriany Lucas dos SANTOS^{1,2}, Rayane Rangel de SOUZA¹, Ana Maria Viana PINTO^{1,2}

¹Núcleo de Pesquisa em Virologia, MIP, Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense.

² Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas

E-mail autor correspondente: anampv@id.uff.br

Introdução: O estudo da interação entre vírus e hospedeiro permite a compreensão das doenças infecciosas e o desenvolvimento de metodologias para diagnóstico e terapias. Nesse contexto, o cultivo de célula tridimensional (3D) pode fornecer um ambiente mais próximo do *in vivo* em comparação ao cultivo bidimensional (2D) e ser utilizado como modelo para esse estudo. **Objetivos:** O objetivo deste trabalho foi validar o software Fiji para avaliar a interação do ZIKV em cultivo de Vero 3D. **Material e Métodos:** Cultivo de Vero 3D foram produzidos a partir de 2D pela técnica de sobreposição de líquido. O Software Fiji foi utilizado para determinar o volume dos esferoides conforme as equações: cálculo das médias dos diâmetros ortogonais ($l = \sqrt{axb}$), cálculo do raio ($r = l/2$) e cálculo do volume ($V = 4/3 \pi \times (r)^3$). A infecção por ZIKVMR766 foi realizada em cultivo 2D e 3D e a quantificação foi determinada pelo método de Reed Muench e pela redução do volume do esferoide. **Resultados:** Os resultados demonstraram as médias dos volumes dos controles de esferoides antes da infecção, ou seja, com 3 dias de crescimento (0 h pós-infecção $V=3,356 \text{ mm}^3$); médias dos volumes dos esferoides controles não infectados com (6 dias de crescimento $V= 4,06 \text{ mm}^3$) e médias dos volumes dos esferoides inoculados com $100 \mu\text{L}$ de cada diluição da amostra do ZIKV (10-1 $V=0,731 \text{ mm}^3$) até (10-7 $V=2,532 \text{ mm}^3$) e leitura com três dias pós-infecção. O ZIKV replicou na região proliferativa dos esferoides resultando na desestruturação do mesmo. O título do ZIKV em cultivo 2D (Título = $107,5 \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$) e 3D (Título $> 107/\text{mL}$) foram similares. Porém, será necessário titular a amostra de ZIKV em células 2D e 3D com diluições maiores a dose infectante 50% (ID_{50}) = $10^{-6,4}$ determinada pela técnica de Reed Muench. **Conclusão:** A análise dos resultados da quantificação do ZIKV em cultivo 2D e 3D revelou redução nos volumes dos esferoides na diluição correspondente a dose infectante 50% (ID_{50}). Sugerindo aplicação do cultivo 3D para quantificar virion e aplicação do Fiji como ferramenta importante na análise de interações vírus-hospedeiro.

Palavras-chave: Célula 3D. Fiji. Vírus-hospedeiro.

Órgãos de fomento ou financiadores: CNPQ, FAPERJ, FIOCRUZ.

08 | APLICAÇÃO DOS MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA ESTUDOS DE TOXICIDADE DE UMA BIOMOLÉCULA COM POTENCIAL ANTIFÚNGICO

Natália Mestre BRAZ¹, Vinicius ALEXANDRE¹, Deisiany Gomes FERREIRA¹, Jakeline Luiz CORRÊA¹, Fabiana Gomes da SILVA², Kelly Mari Pires de OLIVEIRA², Melyssa NEGRÍ¹.

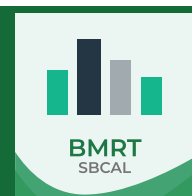
¹Universidade Estadual de Maringá, ²Universidade Federal da Grande Dourados.

Introdução: As infecções fúngicas invasivas são um desafio para a saúde mundial. Um tratamento efetivo contra elas depende da otimização entre a eficácia e segurança da ação do fármaco. Uma abordagem promissora tem sido a combinação de antifúngicos naturais com a nanotecnologia. Além disso, é altamente recomendado o uso de métodos alternativos para avaliar a eficácia desses novos produtos.

Objetivos: Analisar a toxicidade de uma biomolécula da própolis em nanopartícula de prata com ação antifúngica em modelos alternativos.

Material e Métodos: A biomolécula em nanopartícula passou pelo teste de citotoxicidade usando vermelho neutro em células HeLa (ATCC CCL-2™) para determinar a concentração citotóxica média (CC50). Diferentes concentrações do produto foram diluídas em série e expostas às células. Além disso, o ensaio de dose letal média (DL50) foi realizado em um modelo não murino com larvas de *Tenebrio molitor*. A molécula pura foi diluída em série e a sobrevivência das larvas foi observada por 5 dias consecutivos. O teste de Ames foi conduzido para avaliar o potencial mutagênico da biomolécula em nanopartícula, utilizando cepas TA98 e TA100 de *Salmonella Typhimurium*, tanto na ausência (S9-) quanto na presença (S9+) de ativação metabólica. **Resultados:** No ensaio de citotoxicidade com vermelho neutro a biomolécula de própolis apresentou um CC50 de $166,5 \mu\text{g}/\text{mL}$, sendo a concentração capaz de inibir o crescimento de 50% das células testadas. No teste com as larvas de *T. molitor* a DL50 para 50% das larvas com a molécula pura foi de $125 \mu\text{g}/\text{mL}$. Por fim, no teste de Ames foi constatado que a biomolécula não demonstrou potencial mutagênico, uma vez que não houve deslocamento do quadro de leitura (frameshift) no TA98, nem substituição de pares de bases no TA100. **Conclusão:** Este estudo evidenciou, por meio dos principais modelos alternativos ao uso de animais que a biomolécula de própolis em nanopartícula de prata com potencial antifúngico possui um nível de segurança satisfatório. Essa descoberta ressalta a relevância desse composto de origem natural associado a nanotecnologia, como uma opção terapêutica promissora no combate a infecções fúngicas.

Palavras-chave: Antifúngicos. *In vitro*. Nanotecnologia. Testes de Toxicidade.



09 | ASSESSMENT OF SENSITIVE SKIN TOLERANCE TO A VITAMIN C-INFUSED COSMETIC: A COMPREHENSIVE CLINICAL AND EX VIVO STUDY

Carolina Motter CATARINO¹, Caroline Radoski NEUMANN¹, Michelle Sabrina da SILVA², Flávia Alvim Sant'Anna ADDOR², Ariane Caroline Campos PASCHOAL¹, Bruna BOSQUETTI¹, Andrezza Di Pietro Micali CANAVEZ¹, Desiree Cigaran SCHUCK¹

¹Safety Assessment Management – Boticario Group - Curitiba - PR

²MEDCIN Group – Osasco, SP.

Introduction: Introduction: Safety assessment of cosmetics is based on the evaluation of the hazards and associated risks of the ingredients in the formulation. Favorable outcomes are subsequently validated through short and long-term clinical tests. The combination of critical products and vulnerable public demands heightened scrutiny in this assessment, aiming to reduce exposure risks during trials and subsequently for consumers. One of the challenges of cosmetic science is to develop safe and effective formulations that are compatible with sensitive skin, characterized by sensory symptoms of itching and burning, pain sensation and dryness. **Objectives:** The aim of this study was to assess the effect of vitamin C-infused cosmetic on the improvement of nociceptive, inflammatory and epidermal parameters in an ex vivo sensitized human skin model, and confirmation of safety and tolerability for a population with sensitive skin in a clinical trial. **Material and Methods:** For the *in vitro* assessment, ex vivo skin fragments from three donors were sensitized with 5% SLS for 15 minutes. After, the fragments were treated with the cosmetic product for 4 days, with daily renewal of application. The samples were then evaluated for interleukin IL1a (inflammatory marker), TRPV1 (receptor related to antinociceptive action), and filaggrin (key protein of the skin barrier) synthesis. Subsequently, a clinical trial was conducted with 69 participants clinically diagnosed with sensitive skin through a Stinging Test, to assess the tolerability and dermal acceptability of the product under evaluation. **Conclusion:** In *in vitro* assays, the experimental product was shown to increase filaggrin synthesis and decrease IL1a and TRPV1 production. Taken together, these results indicate that the product exhibited good tolerance for sensitive skin, modulating its critical biological parameters. These findings were corroborated by clinical trials, where it was observed that the product is safe for use in the population with sensitive skin. Additionally, standard safety tests were carried out proving that the product does not have potential for irritation and dermal sensitization, photoirritation and photosensitization (data not shown). Finally, this staggered evaluation strategy, combining *in vitro* and *in vivo* clinical trials, increases accuracy, understanding of the mechanism of action, and reduces exposure risks during clinical trials.

Key words: Sensitive skin; *in vitro* test; ex vivo human skin; clinical test.

Sponsors: Grupo Boticário.

Ethics Committee: CAAE: 32317520.4.0000.55; 64432922.0.0000.5514.

10 | ASSESSMENT OF TiO₂ NPS TOXICITY USING A RECONSTRUCTED HUMAN EPIDERMAL MODEL

Priscila Laviola SANCHES^{1,2}, Carolina Motter CATARINO³, Meg Cristina de Castilho COSTA³, Bruna Bastos Swinka³, Andrezza Di Pietro Micali CANAVEZ³, Desirée Cigaran SCHUCK³, Ana Rosa Lopes RIBEIRO^{2,4}, José Mauro GRANJEIRO^{1,2,4,5}

¹ Postgraduate Program in Translational Biomedicine, University of Grande Rio, Duque de Caxias, Brazil.

² Directory of Metrology Applied to Life Sciences, National Institute of Metrology, Quality and Technology, Duque de Caxias, Brazil.

³ Safety Assessment Management, Grupo Boticário, Curitiba, Brazil.

⁴ International Iberian Nanotechnology Laboratory (INL), Braga, Portugal.

⁵ Fluminense Federal University, Rio de Janeiro, Brazil.

Introduction: Besides ethical issues, the use of equivalent skin models provides an excellent alternative to animal testing due to its morphological, histological, physiological, and biochemical similarities to native human skin. While some of these models have been validated for assessing the skin irritation and corrosion potential of chemical formulations, their suitability for studying the toxicity of formulations containing nanoparticles, commonly found in cosmetics, remains unknown. **Objectives:** The aim of this study was to validate a Reconstructed Human Epidermal model (GB-RHE) and evaluate its performance in assessing skin irritation, as well as its potential for assessing the hazards associated with titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NP). **Materials and Methods:** Epidermal reconstructed skin models were generated using human primary epidermal keratinocytes maintained for 9 days at the air-liquid interface. Following the interlaboratory validation of the model according to the OECD Guideline 439, irritation, and cytotoxicity tests of TiO₂ NPs (crystal structure: rutile) were performed using two different concentrations (10 µg/mL, and 100 µg/mL) and exposures of 42 min with 42-hour post-incubation and 48 hours exposure, respectively. **Conclusion:** In the internal validation of the GB-RHE model, 8 of the 10 reference substances from the OECD TG 439 were correctly classified resulting in a specificity of 60% and sensitivity of 100%. Subsequently, the TiO₂ NPs at 10 µg/mL and 100 µg/mL were classified as non-irritant using the GB-RHE model. Histological analysis (H&E staining) did not show morphological alterations. This study demonstrates the potential of RHE models for assessing the skin irritation and skin toxicity potential of nanoparticles.

Key words: Human epidermis model, RHE, irritation test, OECD 439, nanoparticles, titanium dioxide, toxicity.

Funding Agency and Sponsors: CAPES Process Number: 88887.634140/2021-00, Grupo Boticário.

Ethics Committee: CAAE 46799215.1.0000.5283



11 | AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO CUTÂNEA DE PRODUTOS TÓPICOS UTILIZANDO EPIDERMES HUMANAS RECONSTRUÍDAS *IN VITRO* (SKINETHIC™)

Leila Bastos LEAL¹, Juliana KISHISHITA¹, Camila de Almeida Perez PIMENTA¹, Yohana Souza SILVA¹, Rodrigo DE VECCHI²

¹Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC), Universidade Federal de Pernambuco; ²EPISKIN Brasil Biotecnologia

Introdução: Medicamentos genéricos são farmacêticamente equivalentes e bioequivalentes a produtos inovadores. Dependendo do país, a avaliação da bioequivalência de produtos tópicos segue diferentes requisitos e regulamentações. Para tanto, o uso de testes de permeação *in vitro* (IVPT) utilizando pele humana tem sido importante ao avaliar a qualidade e equivalência de medicamentos tópicos. Apesar dos modelos de Epiderme Humana Reconstruída (RhE) serem validados para testes de segurança, e mostrarem-se mais permeáveis que pele humana, elas são consideradas alternativas adequadas no que trata da avaliação da absorção cutânea e da triagem de biodisponibilidade de produtos, principalmente pela semelhança com a pele humana e por permitir maior reprodutibilidade lote a lote. **Objetivos:** Realizar IVPT utilizando como membrana a Epiderme Humana Reconstruída (SkinEthic™/Episkin®) para avaliar a equivalência de dois diferentes cremes de cloridrato de terbinafina a 1%, comercializados no mercado brasileiro. **Material e Métodos:** Para o teste IVPT, os inserts com a RhE foram colocados em uma placa de 12 poços contendo 2mL de líquido receptor (LR) PBS+Tween 80 0,8% e mantidos na incubadora sob agitação (250 rpm) durante todo o estudo (48 horas) à 37 ± 1°C, 5% de CO₂ e ≥90% de umidade relativa. Foram aplicados ~10 mg de cada produto sobre a membrana (área 0,5 cm²), e em cada ponto de tempo definido, 500 µL de LR foram amostrados e quantificados por metodologia de CLAE-UV previamente validada. **Resultados:** Embora os produtos apresentem características organolépticas, pH, teor, espalhabilidade e viscosidade semelhantes, os resultados do IVPT mostraram diferença estatisticamente significativa entre elas (teste t de Student não pareado, p < 0,05), aproximadamente duas vezes na quantidade de fármaco permeado, fluxo, coeficiente de permeabilidade e retenção na RhE. **Conclusão:** Apesar dos modelos de RhE mostrarem-se mais permeáveis que a pele humana, estes resultados podem apoiar a aceitação de modelos de RhE como membranas biológicas adequadas para IVPT, na triagem de biodisponibilidade e nas avaliações de absorção cutânea de produtos tópicos.

Palavras-chave: Alternativas *in vitro*. Epiderme Humana Reconstruída. Produtos tópicos.

12 | AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO* DOS AGROTÓXICOS TEBUCONAZOL E PIRACLOSTROBINA, UTILIZANDO PELE HUMANA

Asley Thalia Medeiros SOUZA¹, Yohana Souza SILVA¹, Leila Bastos LEAL¹, Davi Pereira de SANTANA¹

¹Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético, Universidade Federal de Pernambuco (NUDFAC/UFPE);

Introdução: Os estudos de permeação cutânea *in vitro* (IVPT), tradicionalmente utilizados para avaliar o perfil de medicamentos tópicos ou transdérmicos, são obrigatórios atualmente para avaliação da segurança de produtos agrotóxicos, sendo utilizados para predição da exposição destes produtos. O sistema empregado para esta avaliação utiliza pele humana ou animal em células de difusão verticais. **Objetivos:** Avaliar a absorção cutânea *in vitro* dos agrotóxicos Tebuconazol (TBZ) e Piraclostrobina (PIRA), através de pele humana excisada. **Material e Métodos:** A pele humana utilizada foi obtida mediante aprovação prévia no Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco com número de CAAE: 56545822.2.0000.520. Os ensaios foram realizados de acordo com a RDC nº294/2019. Foi utilizado o sistema de células difusão vertical, mantido a 32°C, com aplicações de 17,7µL de TBZ (200 g/L, 0,2mg/mL, 0,4mg/mL) e PIRA (250g/L, 0,3mg/mL e 0,5mg/mL). 1mL de líquido receptor (LR) foi coletado nos tempos de 2,4,6,8,10,12 e 24h. Os ensaios foram realizados em sextuplicata, tendo água ultrapurificada como solução receptora. Ao final dos ensaios, foi avaliado percentual de agrotóxicos retido no estrato córneo, através da técnica de tape stripping, e o percentual retido na epiderme + derme. **Resultados:** O percentual de absorção foi de 47,01 ± 3,17%; 61,47 ± 2,11% e 51,08 ± 2,89% para o TBZ 0,4 mg/mL, 0,2 mg/mL, e 250 g/L, respectivamente. Já para a PIRA, o percentual absorvido foi de 32,13 ± 2,38; 28,67 ± 4,16 e 59,47 ± 3,45 % para 0,5mg/mL, 0,3mg/mL e 250 g/L, respectivamente. Os ensaios realizados evidenciaram diferenças estatisticamente significativas (p < 0,5) na quantidade total absorvida entre os agrotóxicos Tebuconazol e Piraclostrobina. Mesmo as quantidades totais de Tebuconazol aplicadas sendo menores que as de Piraclostrobina, seu perfil de absorção na pele humana demonstrou ser superior. O balanço de massas foi entre 95-105%, demonstrando reprodutibilidade na execução desta metodologia *in vitro*. **Conclusão:** O processo de eliminação do Tebuconazol na pele foi mais rápido que para a Piraclostrobina o que leva a crer que este produto pode ser absorvido sistemicamente em maior nível, tornando seu uso mais criterioso.

Palavras-chave: Absorção cutânea. Agrotóxicos. Métodos alternativos. Pele humana.

Órgãos de fomento ou financiadores: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia- Rede Norte Nordeste de Fitoprodutos (Projeto 465536/2014-0); Projeto FACEPE multiusuário PROJ-APQ-0481-19.



13 | AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE ANESTÉSICOS TÓPICOS EM MODELO DA MEMBRANA CORIOALANTÓICA DO EMBRIÃO DE GALINHA

Laura Campos Dutra de MORAES¹, Arthur Antunes Costa BEZERRA¹, Gerson Barreto MOURÃO², Yuri Martins COSTA¹, Michelle Franz Montan Braga LEITE^{1*}.

¹Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP; ²ESALQ- Universidade de São Paulo - USP.

E-mail autor correspondente: mfranz@unicamp.br

Introdução: Formulações de anestésicos tópicos têm sido utilizadas em Odontologia para diminuir ou eliminar a dor durante a anestesia local. Porém, as formulações disponíveis no mercado têm apresentado eficácia controversa, justificando a necessidade do desenvolvimento de novas formulações mais eficazes e seguras. Estas devem ser submetidas à testes de eficácia e segurança antes de serem comercializados, dentre eles, destacam-se os de toxicidade. O modelo animal ainda é o mais utilizado para essa finalidade, mas pode causar dor ou sofrimento aos animais envolvidos. **Objetivo:** Avaliar a aplicabilidade do modelo da membrana corioalantóica (CAM) como método alternativo ao uso de animais para análise da toxicidade de anestésicos tópicos de uso odontológico. **Material e Métodos:** Os experimentos foram realizados seguindo a metodologia descrita no protocolo nº 96 do *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM). Foram utilizados 144 ovos embrionados, incubados a 37,5 °C e UR de 55-65%, durante 10 dias. No 10º dia de incubação, os ovos foram submetidos à ovoscopia, foi confeccionada a janela de acesso na casca, exposição da CAM e seu registro da imagem inicial. Em seguida, 300 µL dos controles (positivo – hidróxido de sódio; negativo – solução salina) ou 300 mg das formulações-teste (Benzotop[®]; Labcaína[®]; Lidocaína[®]; e EMLA[®]) foram aplicados sobre a CAM durante 3 min. Em seguida, a CAM foi lavada e foi realizado registro das imagens finais. Todas as imagens foram obtidas utilizando um estereomicroscópio. Os efeitos de hemorragia, lise dos vasos, e coagulação foram pontuados nas imagens por dois examinadores independentes. A partir das pontuações finais obtidas, as formulações foram classificadas dentro das categorias: “não-irritante”, “levemente irritante”, “moderadamente irritante”, “irritante” e “severamente irritante”. Realizou-se a análise de confiabilidade inter examinador utilizando-se as pontuações finais obtidas. **Resultados:** O controle negativo e o positivo foram classificados como “não-irritante” e “irritante”, respectivamente. Todas as formulações comerciais foram classificadas como “moderadamente irritantes”. A confiabilidade inter examinador para as pontuações finais das substâncias-teste foi de 0,92 (kappa), com intervalo de confiança de 95% (0,82 - 0,96) e p<0,001. **Conclusão:** O modelo da CAM mostrou ter potencial como método de triagem toxicológica de anestésicos tópicos de uso odontológico.

Palavras-chave: Anestésicos tópicos. Membrana corioalantóica. Toxicidade.

Órgãos de fomento ou financiadores: FAPESP (Processos #2020/03786-9 e #2023/00341-4).

Este trabalho foi submetido à apreciação da CEUA-UNICAMP. Por se tratar de um método alternativo, a análise foi dispensada pela CEUA.

14 | AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE ANESTÉSICOS TÓPICOS EM MODELO HET-CAM UTILIZANDO O PROGRAMA COMPUTACIONAL IMAGEJ

Arthur Antunes Costa BEZERRA¹, Gerson Barreto MOURÃO², Michelle Franz Montan Braga LEITE^{1*}

¹Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP; ²ESALQ - Universidade de São Paulo - USP.

E-mail autor correspondente: mfranz@unicamp.br

Introdução: O modelo da membrana corioalantóica (CAM) do embrião de galinha tem sido utilizado para avaliar a toxicidade de diversas substâncias, baseando-se na análise visual dos efeitos irritantes induzidos à CAM. Entretanto, esse tipo de análise apresenta como limitação a subjetividade nos resultados, carecendo de uma metodologia de análise quantitativa. **Objetivos:** Desenvolver uma metodologia de análise quantitativa dos efeitos irritantes em modelo HET-CAM utilizando um programa computacional; avaliar a toxicidade de formulações de anestésicos tópicos de uso odontológico por meio do método desenvolvido. **Material e Métodos:** As formulações comerciais de anestésicos tópicos (Benzotop[®], Lidocaína[®], EMLA[®] e Labcaína[®]) e os controles (positivo – hidróxido de sódio; negativo – solução salina) foram avaliados utilizando-se o protocolo DB-ALM n°96 - *Hen's Egg Test on the Chorioallantoic Membrane* (HET-CAM), do *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM). Foram obtidas 8 imagens pós-tratamentos da CAM para cada substância-teste. As imagens foram processadas utilizando-se o programa ImageJ de acordo com as seguintes etapas: 1) calibração do ImageJ considerando a relação entre o número de pixels e a medida real em milímetros; 2) seleção de uma área menor a ser analisada; 3) conversão do formato das imagens e análise pelo plug-in IsoPhotContour2; e 4) mensuração do número de coágulos extravasculares. Um examinador realizou a contagem visual do número desses coágulos nas mesmas imagens. Uma análise de regressão linear simples foi empregada para comparar o número de coágulos identificados pelo operador com a quantidade mensurada pelo ImageJ. Foi utilizada análise de modelos mistos generalizados para comparar a média do número de coágulos identificados pelo ImageJ após os tratamentos. **Resultados:** O número de coágulos quantificados pelo ImageJ foi um bom preditor do número de coágulos identificados visualmente (coeficiente de determinação R² = 0.81). O controle positivo e o EMLA[®] apresentaram maior número de coágulos, quando comparados às demais formulações (p<0,05) e, portanto, maior toxicidade. **Conclusão:** O processamento das imagens da CAM pelo ImageJ permitiu uma análise quantitativa dos coágulos extravasculares, favorecendo uma melhor distinção da toxicidade das substâncias avaliadas. Assim, pode ser considerada uma ferramenta inovadora e complementar importante ao modelo HET-CAM utilizado.

Palavras-chave: Anestésicos tópicos. Membrana corioalantóica. Toxicidade. Odontologia.

Órgãos de fomento ou financiadores: FAPESP (Processo #2020/03786-9).

Este trabalho foi submetido à apreciação da CEUA-UNICAMP. Por se tratar de um método alternativo, a análise foi dispensada pela CEUA.



15 | AVALIAÇÃO DA VASOATIVIDADE EM EMBRIÕES DE GALINHA APÓS ADMINISTRAÇÃO DE VENENOS BOTRÓPICOS

Jacqueline Ramos Machado BRAGA¹, Dulcineia Ferreira de ANDRADE², Ilka BIONDI²

¹Universidade Federal do Recôncavo da Bahia; ²Universidade Estadual de Feira de Santana

Introdução: O Teste da membrana corioalantóica de ovo de galinha (HET-CAM) é um modelo alternativo amplamente utilizado em pesquisa, atendendo aos requisitos estabelecidos nos 3 R's. A CAM contém uma rede vascular densa, essencial no desenvolvimento do embrião, tornando-se um recurso para estudo da hemotoxicidade e angiogênese de substâncias químicas. No entanto, poucos estudos investigaram o uso desse método para avaliar as propriedades de venenos de serpentes como alternativa aos testes hemorrágicos em animais. **Objetivos:** Este estudo buscou avaliar os efeitos vasoativos (coagulante e hemorrágico) dos venenos das serpentes *Bothrops leucurus* (BIV) e *Bothrops jararaca* (BjV), por meio do modelo HET-CAM. **Material e Métodos:** O estudo foi aprovado pela CEUA sob protocolo (24071119000). Venenos crus (BIV e BjV) foram aplicados na CAM em grupos de 5 ovos (n=80) no 9º dia de incubação (não senciente), sendo as alterações filmadas (5min) e fotodocumentadas (0s; 30s; 3min; 5min). Como controle negativo foi utilizada salina (0,9%), usando o sistema de classificação Luepke como método para determinar o índice de irritação (IS) rápido. **Conclusão:** O BjV foi mais irritante para a CAM que o BIV, ratificando os ensaios hemorrágicos realizados na literatura com animais. Considerando o princípio dos 3 R's, este método pode ajudar a avaliar o efeito vasoativo de venenos não neurotóxicos, como método alternativo aos testes com roedores. No entanto, sugere-se que a composição do veneno avaliado e as variações ontogenéticas e sexuais das serpentes devam ser consideradas na análise dos resultados.

Palavras-chave: *Bothrops*, coagulação, hemotoxicidade, métodos alternativos.

16 | AVALIAÇÃO DE AGROTÓXICO ATRAVÉS DE PERMEACÃO IN VITRO EM MUCOSAS SUÍNAS: SUBLINGUAL, ESOFÁGICA E BUCAL

Ana Rosa Brissant de Andrade LUSTOSA¹, Deoclécio Lustosa de CARVALHO², Juliana KISHISHITA¹, Asley Thalia Medeiros SOUZA¹, Yohana Souza SILVA¹, Leila Bastos LEAL¹, Davi Pereira de SANTANA¹

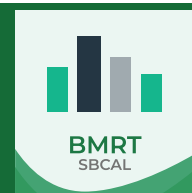
¹Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC). Universidade Federal de Pernambuco; ²Faculdade de Ciências Humanas e Exatas do Sertão do São Francisco;

E-mail autor correspondente: mfranz@unicamp.br

Introdução: Os agrotóxicos são utilizados para proteger as plantas de pragas. No entanto, apesar do progresso sobre implementação de tecnologias e uso de agentes químicos para controle de pragas e doenças, ainda faltam programas de requalificação e leis que protejam adequadamente o trabalhador rural. O contato físico dos trabalhadores rurais com os agrotóxicos ocorre primariamente através da pele, via inalatória e mucosa ocular, podendo provocar ardência, irritação dérmica e parestesia, além de alterações cardiovasculares, respiratórias, hematológicas e reações alérgicas. **Objetivos:** Avaliar a permeação *in vitro* de Dimetoato (Dimexion[®]) através de mucosas esofágica, sublingual e bucal de porco, utilizando células de difusão horizontal. **Material e Métodos:** Língua, bochecha e esôfago de porcos foram obtidos de um matadouro local e tratadas em laboratório. Os ensaios de permeação *in vitro* (IVPT) de mucosas da via oral (bucal e sublingual) e mucosa esofágica foram realizados através de células de difusão horizontal (Permeagear[®]), com compartimentos doador e receptor, mantidos sob agitação e temperatura constantes. Foram aplicados 36µL de Dimexion[®] (600 µg/mL) e o tempo total de ensaio foi de 4 horas. Ao final do estudo, as mucosas foram limpas com swab de álcool isopropílico, cortadas e submetidas a extração com solução de água:metanol (80:20), agitadas e sonicadas por 15 minutos, filtradas 0,45 µm e analisadas. **Resultados:** Foi possível determinar a quantidade cumulativa de dimetoato permeada e retida em todas as mucosas após os experimentos de IVPT, onde a permeação cumulativa de dimetoato foi 2,5 vezes maior na mucosa esofágica em comparação com a mucosa bucal. Além disso, a espessura da mucosa bucal foi cerca de 3 vezes maior que a esofágica (356,0 ± 48,79 e 962,0 ± 80,44 mm), justificando, em parte, esse resultado. **Conclusão:** Desta forma, os estudos de permeação *in vitro* realizados com mucosas orais, embora avalie uma exposição pouco frequente, são de extrema importância para mensurar as quantidades de agrotóxicos passíveis de absorção por estas vias, uma vez que a exposição ocupacional pela via oral ocorre quando os trabalhadores rurais manipulam o agrotóxico.

Palavras-chave: Agrotóxicos; Alternativas *in vitro*; Mucosas suínas.

Órgãos de fomento ou financiadores: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Instituto Nacional de Ciência Tecnologia – Rede Norte Nordeste de Fitoprodutos (Projeto 465536/2014-0).



17 | AVALIAÇÃO DE PERMEACÃO IN VITRO EM MUCOSA VAGINAL SUÍNA PARA O MISOPROSTOL

José Wellithom Viturino da SILVA¹, Juliana KISHISHITA¹, Breno Ítalo Valença de CARVALHO¹, Davi Pereira de SANTANA¹, Leila Bastos LEAL¹, Danilo César Galindo BEDOR¹

¹Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC). Universidade Federal de Pernambuco

Introdução: A utilização de membranas biológicas nos estudos de permeação tem se mostrado de grande relevância, uma vez que estes tecidos podem nos aproximar das condições in vivo e com isso fornecer informações sobre a biodisponibilidade de fármacos. No Brasil, o misoprostol, um análogo da prostaglandina E₂, tem a via de administração vaginal indicada. Apesar disso, existem diversas discussões acerca de qual via de fato seria a mais adequada para obtenção de seus efeitos terapêuticos. Isso justifica a realização de estudos que contribuam com o melhor entendimento sobre os aspectos que envolvem a absorção deste fármaco. **Objetivos:** Realizar estudo de permeação *in vitro* em mucosa vaginal suína e investigar os mecanismos envolvidos no processo de permeação vaginal do misoprostol. **Material e Métodos:** As vaginas suínas foram obtidas em abatedouro local, transportadas para laboratório, excisadas e montadas nas células de difusão (n=4). No estudo, foram utilizadas células de difusão horizontais para viabilizar a aplicação dos comprimidos de misoprostol (200 µg). Os compartimentos doador e receptor foram preenchidos com 3,4 mL de tampão PBS (pH 5±0,1) e água, respectivamente. As amostras foram coletadas a cada 6 horas, por um período total de 24 horas e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência. A identificação dos compostos foi realizada por LC/MS. **Resultados:** A permeação *in vitro* trouxe como principal achado a informação de que o MSP em sua forma esterificada não foi capaz de permear a mucosa vaginal suína. Aparentemente este fármaco passa por um prévio processo de desesterificação e formação de sua forma ácida para que seja capaz de atingir o líquido receptor (15,09 ± 1,70 µg). Na investigação da retenção na mucosa, apenas a forma ácida do misoprostol foi detectada (0,66 ± 0,1 µg). **Conclusão:** Com isso, o fato de apenas a forma ácida do ativo ter sido encontrada no líquido receptor e mucosa vaginal, nos faz supor que o processo de hidrólise do fármaco antecede sua permeação e representa uma etapa limitante deste processo.

Palavras-chave: Células de difusão. Misoprostol. Mucosa vaginal. Permeação *in vitro*.

Órgãos de fomento ou financiadores: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Instituto Nacional de Ciência Tecnologia – Rede Norte Nordeste de Fitoprodutos (Projeto 465536/2014-0).

18 | AVALIAÇÃO DE PERMEACÃO TRANSMUCOSA IN VITRO DOS AGROTÓXICOS TEBUCONAZOL E PIRACLOSTROBINA EM DIFERENTES BIOMEMBRANAS

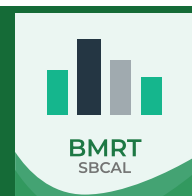
Asley Thalia Medeiros SOUZA¹, Leila Bastos LEAL¹, Davi Pereira de SANTANA¹

¹Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético, Universidade Federal de Pernambuco (NUDFAC/UFPE);

Introdução: Uma variedade de modelos animais tem sido utilizada para avaliar a permeação transmucosa de substâncias. Neste sentido, mucosas suínas e a córnea bovina tem sido bastante utilizada, pois apresentam baixo custo, grande disponibilidade e semelhança com as mucosas humanas. **Objetivos:** Avaliar a permeação *in vitro* (IVPT) do Tebuconazol (TBZ) e Piraclostrobina (PIRA) através de mucosa vaginal suína e córnea bovina, utilizando células de difusão horizontal. **Material e Métodos:** Foi utilizado o sistema de células difusão horizontal, side-by-side e aplicações de 6,5µL de TBZ (0,2 e 0,4 mg/mL) e PIRA (0,3 e 0,5 mg/mL). 1mL de líquido receptor (LR) foi coletado nos tempos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8h para mucosa vaginal e 0,5, 1, 2, 3 e 4h, para córnea, o sistema teste foi mantido a 32°C. Ao final foram avaliadas as quantidades de agrotóxicos nas biomembranas e no LR para cálculo de balanço de massas, obrigatório de acordo com a RDC n°294/2019. **Resultados:** Na mucosa vaginal o percentual permeado de TBZ foi ~10% do total aplicado, enquanto para PIRA foi de 1,5%. Com relação a quantidade recuperada nas biomembranas o TBZ apresentou 209,42ng e 614,43ng para 0,2mg/mL e 0,4mg/mL e a PIRA 820,67ng e 1.460,31ng 0,3mg/mL e 0,5mg/mL, respectivamente. Para córnea bovina a avaliação da permeação mostrou quantidades permeadas de 17,5ng, 24,54ng, 17,36ng e 15,84ng para as concentrações de 0,2mg/mL e 0,4mg/mL de TBZ e de 0,3mg/mL e 0,5mg/mL de PIRA, respectivamente. Os percentuais de recuperação foram 104,59% para o TBZ e 94,96% para PIRA. O balanço de massas para os ensaios com mucosa vaginal foi entre 95 e 105%, demonstrando reprodutibilidade na execução desta metodologia *in vitro*. Para córnea bovina este valor foi entre 45 a 65%, o que demonstra uma perda considerável, sendo necessárias mais avaliações da permeação através desta biomembrana. **Conclusão:** Os resultados obtidos a partir dos ensaios de permeação *in vitro* com as biomembranas avaliadas evidenciaram um percentual de TBZ permeado maior que o de PIRA. Isto demonstra uma maior preocupação no uso correto de EPI's quando do uso do TBZ na rotina dos trabalhadores, principalmente aqueles da agricultura familiar.

Palavras-chave: Agrotóxicos. Biomembranas. Métodos alternativos. Permeação transmucosa.

Órgãos de fomento ou financiadores: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia- Rede Norte Nordeste de Fitoprodutos (Projeto 465536/2014-0); Projeto FACEPE multiusuário PROJ-APQ-0481-19.



19 | AVALIAÇÃO DE POTENCIAL SENSIBILIZANTE EM MODELO DE EPIDERMES HUMANAS RECONSTRUÍDA (RHE) IMUNOCOMPETENTE

Ana Luisa Abrahão DIAS^{1*}, Nathalia de Carvalho INDOLFO¹, Tabata Renee DORATIOTO¹, Melissa Dibbern GANZERLA¹, Camila Alessandra MINI², Carla Carolina MUNARI², Giulia BALLESTERO², Nayara Cristina Perez de ALBUQUERQUE², Kelen Fabíola ARROTEIA¹, Franciane MARQUELE-OLIVEIRA²

¹ Natura Cosméticos, Cajamar, São Paulo, Brasil; ² Eleve Science Pesquisa e Desenvolvimento, Supera Parque Tecnológico, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil;

E-mail autor correspondente: anadias@natura.net

Introdução: Na indústria cosmética, a composição química diversificada e ainda pouco descrita de ativos de origem vegetal representa grande desafio na previsibilidade de efeitos para o organismo, resultando em abordagens conservadoras na aplicação. Nesse sentido, a evolução dos métodos para avaliação dessas matérias-primas é de extrema importância para análises de segurança de produtos. A exposição dérmica a certas substâncias pode provocar sensibilização, desfecho toxicológico caracterizado por uma sequência de eventos-chave. Atualmente, o potencial de sensibilização dérmica é avaliado por testes cobrindo, de forma independente, cada evento-chave (OECD 442C, 442D e 442E), sendo que ao menos dois testes devem ter resultados concordantes para conclusão. A utilização do sistema RHE imunocompetente possibilita a avaliação do potencial sensibilizante de produtos tópicos com olhar simultâneo para dois eventos-chave (ativação dos queratinócitos e das células imunes), devido a presença da barreira epidérmica associada a monócitos. **Objetivos:** Viabilizar um modelo de epiderme imunocompetente para avaliação do desfecho de sensibilização dérmica de substâncias com aplicação cosmética. **Material e Métodos:** O modelo de epiderme humana reconstruída (Eleve Science[®]) foi cultivado em co-cultura com monócitos humanos (THP-1). Para avaliação da responsividade quanto à ação sensibilizante, as co-culturas foram expostas a substâncias de proficiência aplicadas sobre a epiderme. As quantificações dos marcadores de ativação monocítica, CD54 e CD86 (OECD 442E), foram realizadas por citometria de fluxo. A expressão gênica da ativação dos queratinócitos e do sistema imunológico foi avaliada por PCR em tempo real utilizando painel customizado de marcadores relevantes e a modulação das vias biológicas de interesse foi avaliada utilizando software especializado. **Resultados:** A exposição do modelo imunocompetente à substância de proficiência DNCB resultou na ativação dos monócitos pelo aumento da expressão do marcador CD86 e foi capaz de estimular as vias de ativação dos queratinócitos e do sistema imunológico avaliadas por expressão gênica. **Conclusão:** A utilização do modelo RHE imunocompetente apresentou potencial promissor para avaliação da sensibilização dérmica. Ao integrar dois eventos-chave em um único sistema, o modelo oferece uma abordagem mais abrangente resultando em uma visão mais robusta dos processos subjacentes à sensibilização, contribuindo para a melhoria das estratégias de avaliação de segurança na indústria cosmética.

Palavras-chave: Sensibilização; epiderme humana reconstruída; monócitos; RT-PCR; citometria de fluxo.

20 | AVALIAÇÃO DE RISCO DE PRODUTOS AROMATIZADORES DE AMBIENTES: ESTIMATIVA DA EXPOSIÇÃO INALATÓRIA POR MODELO COMPUTACIONAL

Mayara Fregonezi PALUDETTI^{1*}, Karina Martinez MENDONÇA¹, Lígia Scandoglieri de ALMEIDA¹, Taina Louise PACHECO¹, Nathalia Indolfo de CARVALHO¹, Kelen Fabíola ARROTEIA¹

¹ Natura Cosméticos, Cajamar, São Paulo, Brasil

E-mail autor correspondente: mayarapaludetti@natura.net

Introdução: O uso de produtos aromatizadores de ambientes pode resultar em efeitos respiratórios locais e sistêmicos como resultado da exposição a compostos aromáticos por via inalatória. Possíveis efeitos locais são resultantes do contato das substâncias químicas presentes nestes produtos com o nariz, laringe, faringe, árvore traqueobrônquica e região pulmonar. Os efeitos sistêmicos podem ocorrer a partir da absorção de tais substâncias através dos alvéolos pulmonares. Para viabilizar a avaliação de risco deste tipo de produto é necessário realizar uma estimativa da exposição aos ingredientes aromáticos, valor que pode ser predito por meio de modelos computacionais. **Objetivos:** Elaborar um racional para avaliação de segurança de produtos aromatizadores de ambientes. **Material e Métodos:** O racional estabelecido consistiu nas seguintes etapas: 1) levantamento da composição química de fragrâncias e óleos essenciais presentes no produto, 2) definição da concentração de cada composto aromático no produto, resultante da soma de concentrações individuais em cada fragrância e óleo essencial, 3) levantamento dos dados toxicológicos destes compostos, 4) estimativa da exposição inalatória utilizando o modelo computacional ConsExpo, 5) avaliação de risco através do cálculo da Margem de Exposição - MoE (efeitos locais) e Margem de Segurança - MoS (efeitos sistêmicos), e 5) em caso de ausência de dado experimental publicado, avaliação de risco utilizando o racional Threshold of toxicological concern (TTC). **Resultados:** Para cada tipo de produto aromatizador de ambiente (vela, spray e difusor) foram definidos parâmetros de exposição para possibilitar as predições pelo modelo ConsExpo. Dentre as composições dos produtos avaliados foi possível destacar alguns exemplos de compostos aromáticos para os quais foi possível obter dados experimentais publicados, e a partir destes dados, calcular a MoE e MoS que resultaram em valores superiores a 100. Em contrapartida, também foi possível identificar ingredientes para os quais não existiam dados experimentais publicados, e com isso, foi necessária a aplicação do racional TTC. **Conclusão:** A estratégia apresentada é baseada no uso do modelo computacional ConsExpo para predição da exposição a compostos aromáticos por via inalatória, resultante do uso de produtos aromatizadores de ambientes. A estimativa da exposição possibilitou uma avaliação de risco e a definição de concentrações seguras de uso.

Palavras-chave: Exposição Inalatória, Segurança de Cosméticos, Toxicologia Computacional.

21 | AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE FORMULAÇÕES UNGUEAIS À BASE DE TERBINAFINA ATRAVÉS DE PERMEACÃO IN VITRO

Camila de Almeida Perez PIMENTA¹, Juliana KISHISHITA¹, Yohana Souza SILVA¹, Davi Pereira de SANTANA¹, Maria Begõna DELGADO-CHARRO², Leila Bastos LEAL¹

1Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC). Universidade Federal de Pernambuco; 2University of Bath, Bath, United Kingdom

Introdução: A Onicomicose é uma infecção fúngica crônica da unha. Os efeitos desta infecção, quando não tratada, podem incluir dor, infecções bacterianas secundárias, baixa autoestima devido à desfiguração das unhas afetadas. A unha é uma barreira resistente que dificulta a penetração de fármacos, devido a sua composição e a presença de pontes dissulfeto que interligam as fibras de queratina. Essa barreira torna mais difícil o tratamento tópico contra a doença e por isso o desenvolvimento de formulações efetivas se torna um desafio. **Objetivos:** Avaliar o desempenho de formulações ungueais à base de Terbinafina (TB-HCL), por meio do teste de permeação *in vitro* (IVPT), utilizando unhas humanas sadias. **Material e Métodos:** Foram testadas formulações do tipo microemulsões (ME) contendo 2,5 e 7% de TB-HCL, termogéis (TG) e cristais líquidos (CL) com 2% TB-HCL, utilizando células de difusão verticais, e recortes de unhas humanas sadias, com e sem poros. Os poros foram formados com auxílio de dispositivo Hydra.needle[®], e os testes foram conduzidos em dose única para as unhas poradas e multidose para as não poradas. A coleta de unhas foi aprovada pelo comitê de ética da Universidade Federal de Pernambuco (CAAE: 27554719.1.0005208). **Resultados:** Com aplicação 10µL/ dia por 14 dias e sem poração, não foi observada diferença estatisticamente significativa nas retenções ungueais de TB-HCL. Já na condição experimental de dose única (50µL) e poração, foi possível evidenciar uma retenção maior da ME5 7%. Comparando as retenções entre os tratamentos foi possível observar diferenças estatisticamente significativas entre as formulações apenas após o procedimento de poração. **Conclusão:** Os resultados de IVPT sugerem que a combinação da microporação ungueal utilizando o Hydra.needle[®] e dose única favoreceu a permeação ungueal do TB-HCL para todas as formulações. A microemulsão contendo 7% de TB-HCL parece ser a formulação de escolha para os testes futuros. Isso demonstra a importância dos estudos de permeação *in vitro* na avaliação do desempenho de formulações tópicas.

Palavras-chave: Onicomicose. Permeação *in vitro*. terbinafina. tópico. unha humana.

Órgãos de fomento ou financiadores: *Advanced Fellowship* (Concessão: NAF\R10\100041); Instituto Nacional de Ciência Tecnologia – Rede Norte Nordeste .

22 | AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTICÂNCER DE C. FLEXUOSUS FRENTE A LINHAGEM DE CÂNCER CERVICAL HELA

Vinicius D'Avila Bitencourt PASCOAL¹, Thiago Sardou CHARRET¹, Mariana Toledo Martins PEREIRA¹, Aislan Cristina Rheder Fagundes PASCOAL¹.

¹ Universidade Federal Fluminense, Laboratório Multiusuário de Células e Tecidos Animais;

E-mail autor correspondente: viniciuspascoal@id.uff.br

Introdução: O gênero *Cymbopogon*, é composto por 144 espécies, das quais muitas possuem atividades biológicas já descritas, tais como a atividade anticonvulsivante, anti-inflamatória e antimicrobiana. O *C. flexuosus* é uma espécie do gênero *Cymbopogon*, adaptada e cultivada no Brasil, conhecida popularmente como Capim Limão. O Câncer cervical é a denominação utilizada para designar o tipo de câncer onde ocorre o desenvolvimento de tumores na cévix uterina, a extremidade inferior do útero. Este tipo de câncer acomete cerca de 570 mil mulheres por ano, além de ser responsável por aproximadamente 311 mil mortes anualmente. Segundo dados do INCA, no Brasil em 2020, foram estimados 16 mil novos casos de câncer cervical e em 2018 ocorreram 6526 mortes. **Objetivos:** O objetivo do trabalho é avaliar o potencial anticâncer do óleo essencial de *C. flexuosus* e de seu composto majoritário, o Citral, frente à linhagem de câncer cervical HeLa. **Material e Métodos:** O óleo essencial de *C. flexuosus* foi analisado por CG-MS, afim de elucidar seu perfil químico, a obtenção dos complexos de inclusão Citral:β-CD (Betaciclodextrina) foi realizada por co-evaporação, na proporção molar 1:1. O teste de MTT utilizando células HeLa, foi utilizado para determinar a viabilidade celular e os valores de IC50. O ensaio *wound healing* foi utilizado para avaliar a migração celular das células HeLa. **Resultados:** No ensaio de CG-MS foi possível identificar os compostos α-Citral (43,67%) e β-Citral (26,52%) como compostos majoritários do óleo de *C. flexuosus*. A caracterização dos complexos Citral:β-CD foi realizada por calorimetria diferencial de varredura e termogravimetria, sugerindo sucesso na complexação. No ensaio de MTT o *C. flexuosus*, Citral puro e o Citral:β-CD obtiveram valores de IC50 de 2,989 µg/mL, 3,335 µg/mL e 7,60 µg/mL, respectivamente. No ensaio de migração celular o *C. flexuosus*, Citral puro e o Citral:β-CD obtiveram 76,55%, 89,55% e 79,04%, respectivamente de área livre de migração, comparados com 53,67% do controle negativo. **Conclusão:** Em conjunto os dados demonstram o potencial anticâncer do óleo essencial de *C. flexuosus*, Citral e do Citral complexado com Betaciclodextrina frente a linhagem de câncer cervical HeLa.

Palavras-chave: Câncer, Citral, Cultura Celular, Óleo Essencial.

Órgãos de fomento ou financiadores: CAPES, FAPERJ.



23 | AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DANO OCULAR DE SUBSTÂNCIAS PELO MÉTODO ALTERNATIVO HET-CAM

Karina de Castro PEREIRA¹, Isabella Fernandes DELGADO², Luciene Bottentuit Lopez BALOTTIN³, Lorena Rigo GASPAR¹

¹ Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto – SP;

² Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro – RJ

³ Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), Xerém - Duque de Caxias - RJ

E-mail autor correspondente: isabella.delgado@incqs.fiocruz.br, lorena@fcrp.usp.br

Introdução: Durante décadas, a principal fonte de dados sobre o potencial de produtos químicos para provocar danos oculares severos ou irritação ocular era um ensaio *in vivo*, o Teste de Draize. A crescente preocupação com as questões relacionadas ao bem-estar animal e reprodutibilidade, além da necessidade de avaliação de segurança de produtos químicos que podem entrar em contato com os olhos, gerou uma demanda por estudos que busquem estratégias de avaliação a partir de ensaios *in vitro* alternativos ao uso de animais. O HET-CAM (Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane) utiliza a CAM mimetizando a conjuntiva ocular para avaliação dos efeitos vasculares, sendo o único método disponível para este fim. No entanto, estudos mostram que o HET-CAM tende a superestimar a classificação das amostras testadas. **Objetivos:** O presente estudo apresentou como objetivo avaliar se diferentes diluições de substâncias químicas poderiam melhorar a capacidade preditiva do HET-CAM para a categorização de substâncias com potencial de danos severos/irritação ocular conhecido. **Material e Métodos:** Foram selecionadas 22 substâncias, abrangendo todas as classificações GHS, que foram testadas puras e em soluções de 10% e 2,5%. O teste foi realizado segundo o protocolo descrito por Luepke e Kemper, 1986. Soluções de dodecil sulfato de sódio a 1% e cloreto de sódio a 0,9% (solução fisiológica) foram usadas como controles positivo e negativo, respectivamente. **Conclusão:** Dentre as concentrações testadas, a de 10% foi a que levou a uma melhor classificação, com uma acurácia de 63,6%. Conforme esperado, o HET-CAM foi capaz de diferenciar as substâncias irritantes das não irritantes. Entretanto, quando utilizado isoladamente, não foi considerado adequado para diferenciar os irritantes leves/moderados dos irritantes severos, podendo ser usado em conjunto com outros métodos dentro de uma estratégia de teste.

Palavras-chave: HET-CAM. Dano ocular. Irritação ocular. GHS.

Órgãos de fomento ou financiadores: CNPq – Processo 401667/2014-6.

24 | AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FOTOPROTETOR E ANTIOXIDANTE DE ATIVO E DERIVADO D E FUNGO DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA

Maria da Graça Landim BRAVO¹, Thaís Yume Toriy FUZINAGA¹, Ana Júlia Pasuch GLUZEZAK¹, Silvyta Stuchi MARIA-ENGLER², Eduardo Festozo VICENTE³, Hosana Maria DEBONSI¹, Lorena Rigo GASPAR¹, *

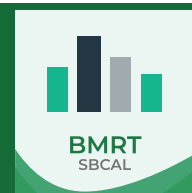
¹ Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil; ² Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil; ³ Faculdade de Ciências e Engenharia, Universidade do Estado de São Paulo, Tupã, Brasil.

E-mail autor correspondente: maria.graca.bravo@usp.br

Introdução: A busca por novos filtros solares torna-se cada vez mais necessária, devido aos recentes estudos que indicam que filtros solares como a benzofenona-3 e o octocrileno apresentam a capacidade de induzir danos ao ambiente marinho, através da disfunção endócrina em animais, inibição do crescimento de algas, e indução do branqueamento de corais. Neste contexto, novas moléculas têm sido bioprospectadas com o intuito de identificar novos ativos capazes de conferir fotoproteção, aliando a minimização dos danos à vida marinha, os denominados ocean/sea friendly. **Objetivos:** Avaliar o potencial fotoprotetor e antioxidante de um composto isolado do fungo endófito *Penicillium brevicompactum*, associado à alga do gênero *Bostrychia*, coletada no litoral do estado de São Paulo, e de seu derivado semissintético. **Material e Métodos:** As metodologias utilizadas para o isolamento dos compostos de interesse e avaliação da segurança e eficácia, foram pautadas em métodos alternativos ao uso de animais e à química verde, interligando diversos aspectos que contribuem para as novas tendências na área cosmética sustentável. O estudo foi aprovado pelo CEP-FCFRP (CAAE: 55438216.0.0000.5403). O composto estudado foi fracionado, identificado e isolado através das técnicas de cromatografia líquida a vácuo e de alta eficiência. O derivado semissintético foi produzido através da conjugação da molécula a um peptídeo, empregando reações de semissíntese. Foram avaliados os potenciais de absorção, fotoestabilidade, fototoxicidade (OECD TG 432), irritação (ensaio HET-CAM), e potencial antioxidante por meio da produção de ERO (Espécies Reativas de Oxigênio) induzida por UVA em monocamada e RHS (Pele Humana Reconstituída). **Resultados e Conclusão:** Os compostos apresentaram alta absorção na faixa de 280 a 320 nm (região do UVB), mantendo-se fotoestáveis quando irradiados (dose de 27,6 J/cm²). As moléculas não apresentam potencial fototóxico (MPE < 0,1) e foram consideradas não irritantes. Foi observado que tanto os conjugados de tirosina quanto de triptofano apresentaram ligeira redução na produção de ERO induzida por UVA no modelo de monocamada e não apresentaram proteção UVA em RHS. Esses resultados demonstram que as amostras avaliadas são possíveis candidatos a filtros solares, especialmente na região do UVB, e que contribuirão para o desenvolvimento de produtos, eficazes, seguros e sustentáveis.

Palavras-chave: Ambiente marinho; Fotoproteção; Métodos alternativos; Produto natural; Sustentabilidade.

Órgãos de fomento ou financiadores: Os autores agradecem à CAPES, à FAPESP e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP) pelo apoio para o desenvolvimento deste trabalho.



25 | AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FOTOPROTETOR E FOTOTÓXICO DE SUBSTÂNCIAS PRODUZIDAS POR ORGANISMOS ANTÁRTICOS

Nayara Fernanda Tokashike de ARAÚJO¹, Isadora de Jesus DA SILVA¹, Hosana Maria DEBONSI¹, Lorena Rigo GASPAR¹

¹Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil.

E-mail autor correspondente: lorena@fcrp.usp.br

Introdução: Os oceanos representam importante fonte de biodiversidade, caracterizados por alta pressão e condições extremas de temperatura e radiação solar. Para se adaptarem, os organismos produzem metabólitos secundários com grande diversidade química. Assim, os organismos antárticos se destacam, uma vez que o continente possui a maior incidência de raios ultravioleta do mundo, induzindo a produção destes metabólitos com atividades fotoprotetoras e antioxidantes. Para ser comercializado, o fotoprotetor precisa ter sua segurança e eficácia comprovadas. O potencial fototóxico pode ser avaliado através do método 3T3 NRU PT (OECD TG 432) que analisa as curvas de dose-resposta, na presença e ausência de radiação, quantificando a diferença entre essas curvas. **Objetivos:** Analisar o potencial fotoprotetor e fototóxico de substâncias isoladas do fungo Antártico *Rhinochrysiella similis*. **Material e Métodos:** O fungo foi cultivado durante 28 dias em arroz e água do mar artificial e extraído utilizando acetato de etila. O fracionamento do extrato bruto foi realizado por Cromatografia Líquida a Vácuo (CLV), visando a obtenção das nove frações de interesse que tiveram suas absorções analisadas no espectro da região ultravioleta (280-400 nm). As três Frações com maior absorção (F, G e H) foram selecionadas. A avaliação da fototoxicidade foi realizada em modelo de monocamada em fibroblastos murinhos BALB/c 3T3, de acordo com o guia nº 432 da OECD de fototoxicidade 3T3 NRU PT. As células foram pré-incubadas em micropalcos de 96 poços com 8 concentrações diferentes da substância. Uma placa foi exposta à radiação UVA e a outra foi mantida ao abrigo da luz para a determinação da viabilidade celular na presença e ausência de radiação, seguida da determinação da citotoxicidade, fototoxicidade e cálculo do fotoefeito médio (MPE). **Resultados e Conclusão:** Os resultados indicam que as Frações possuem potencial fotoprotetor (principalmente no UVB), sendo que F e G apresentam potencial fototóxico, enquanto a Fração H prediz fototoxicidade equívoca. Os próximos passos serão o isolamento e identificação das substâncias que possuem potencial fotoprotetor e potencial fototóxico, além do ensaio de fototoxicidade em pele humana reconstruída (RHS) (OECD TG 498) que leva em consideração a penetração cutânea e a biodisponibilidade do composto, como recomendado internacionalmente.

Palavras-chave: métodos alternativos; avaliação de segurança; fotoproteção; produtos naturais; cosméticos.

Órgãos de fomento ou financiadores: Os autores agradecem à FAPESP, ao CNPq e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), pela bolsa concedida (Processo FAPESP nº2022/15405-5), apoio e suporte financeiro na realização deste trabalho.

26 | AVALIAÇÃO DO USO DO MODELO ZEBRAFISH NA DETERMINAÇÃO DE DL50 DE VENENO ESCORPIÔNICO (*TITYUS SERRULATUS*)

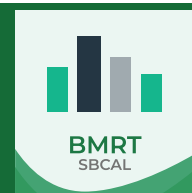
Luiza Pereira PARREIRAS¹, Francisco Eduardo de PONTES¹, Patrícia Neves CASTANHEIRA¹, Nathalia de Souza MACHADO¹, Claudio Mauricio Vieira SOUZA¹, Bettina Monika RUPPELT³ Jairo Dias BARREIRA², Maria Inês Doria ROSSI².

¹Instituto Vital Brazil; ²Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos; ³ Universidade Federal Fluminense.

E-mail autor correspondente: parreiras.luiza@gmail.com

Introdução: Os acidentes envolvendo escorpiões aumentaram de forma significativa nas últimas décadas, passando de 12.552 em 2000 para 162.667 casos em 2020. Acidentes com crianças, adolescentes e idosos apresentam maior risco, e o uso do soro antiescorpiônico pode ser indicado. O soro hiperimune utilizado no tratamento dos acidentes escorpiônicos é produzido no Brasil a partir da imunização de equídeos com veneno da espécie *Tityus serrulatus* (escorpião amarelo), cuja toxicidade é avaliada através da Dose Letal 50% (DL50) em camundongos. O zebrafish (*Danio rerio*) se apresenta como um potencial modelo para testes de toxicidade para a avaliação dos efeitos tóxicos do veneno. **Objetivos:** Avaliar o uso do Modelo Zebrafish em teste de DL50 do veneno escorpiônico, com vistas à possível substituição do modelo vigente. **Material e Métodos:** Foram utilizados peixes *Danio rerio* machos, pesando entre 200-300 mg, inoculados com 20 µL das doses teste por via intraperitoneal. Os peixes foram separados em aquários por grupos segundo as doses em teste e observados em 1h, 6h, 24h e 48h após inoculação do veneno. Foi registrado o número de animais mortos/total inoculado em cada dose para cálculo da DL50 (Probit). O número de animais em cada grupo foi de 6 animais/dose. As doses testadas concentraram-se na faixa de 0,20 µg - 28 µg/ind. Todos os testes contaram com grupos controle negativo e positivo. **Resultados:** Dos oito testes realizados, somente dois apresentaram resultados considerados válidos, segundo critérios da Farmacopeia Brasileira. As DL50 dos testes válidos foram 0,52 µg (Intervalo de Confiança: 0,41 - 0,72) e 0,37 µg (Intervalo de Confiança: 0,24 - 0,49), cerca de 60 vezes menor que a DL50 do veneno escorpiônico testado em camundongos (28 µg). As doses que melhor se ajustaram nos testes foram 0,28 µg/0,39 µg/0,55 µg/0,77 µg. **Conclusão:** O estudo apresentou resultados promissores no uso do Modelo Zebrafish nos testes de DL50 do veneno escorpiônico, podendo ser no futuro uma alternativa ao atual Modelo Murino. A quantidade de veneno injetada no zebrafish foi cem vezes menor que o injetado no camundongo, essa economia pode ser muito importante dado à extrema dificuldade de obtenção de veneno escorpiônico para os testes.

Palavras-chave: Animais de laboratório. Biomodelo. Controle da qualidade. Experimentação animal. 3Rs.



27 | AVALIAÇÃO IN VITRO DA ABSORÇÃO CUTÂNEA DE PRODUTO AGROTÓXICO A PARTIR DE MEMBRANAS ANIMAIS E HUMANAS

Ana Rosa Brissant de Andrade LUSTOSA¹, Deoclécio Lustosa de CARVALHO², Juliana KISHISHITA¹, Asley Thalia Medeiros SOUZA¹, Yohana Souza SILVA¹, Leila Bastos LEAL¹, Davi Pereira de SANTANA¹

¹Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC). Universidade Federal de Pernambuco;

²Faculdade de Ciências Humanas e Exatas do Sertão do São Francisco.

Introdução: Os agrotóxicos são substâncias empregadas na agricultura para proteger as plantas contra pragas e promover alto rendimento das culturas e seus derivados. No entanto, o contato dos trabalhadores rurais com estes produtos, primariamente através da pele, via inalatória e mucosa ocular, pode expô-los a inúmeros riscos à saúde. **Objetivos:** O estudo teve como objetivo realizar permeações *in vitro* (IVPT) de Dimetoato (Dimexion[®]) através de peles humana, de porco e de rato, visando simular uma possível exposição dérmica de trabalhadores agrícolas. **Material e Métodos:** O IVPT foi realizado aplicando uma dose de 36 µL de Dimexion[®] (600µg/mL) nas peles, as células foram preenchidas com 6mL de líquido receptor (LR), que ficaram sob agitação à 32±1°C. Em tempos pré-determinados, 1mL do LR foi coletado e substituído com mesmo volume. Após 6h, as superfícies das peles foram limpas com algodão embebido em álcool isopropílico 70%, sem interromper o teste. Ao fim de 24h, as peles foram retiradas e limpas, o estrato córneo (EC) foi retirado e a quantificação do dimetoato foi feita por cromatografia líquida acoplada a espectrofotômetro de massas. **Resultados:** Ao final dos experimentos, foi possível calcular o balanço de massas para os três tipos de pele, com recuperação entre 95% e 105%, demonstrando reprodutibilidade na metodologia. O fluxo de permeação de dimetoato (ng/cm²/h) foi maior até 6h (tempo de contato), comparado ao restante do tempo do experimento. Neste estudo, os dados de absorção cutânea calculados foram 6,49±0,04; 3,49±0,29 e 1,79±0,19 ng/cm² para pele de rato, porco e humana, respectivamente, e o percentual de absorção calculado através da pele humana foi de 14,75% da formulação aplicada. **Conclusão:** Embora os modelos de pele de porco sejam bastante utilizados na avaliação de medicamentos, a legislação brasileira em vigor para agrotóxicos estabelece que os estudos de absorção dérmica sejam realizados *in vitro* com pele humana ou através de procedimento triple pack. Os resultados obtidos neste estudo reforçam este direcionamento.

Palavras-chave: Agricultura familiar. Agrotóxicos. Alternativas *in vitro*. Células de Franz.

Órgãos de fomento ou financiadores: Instituto Nacional de Ciência Tecnologia – Rede Norte Nordeste de Fitoprodutos (Projeto 465536/2014-0).

28 | AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE CICATRIZANTE DE PELE À BASE DE SECRETOMA DE CÉLULAS-TRONCO MESENUQUIMAIS

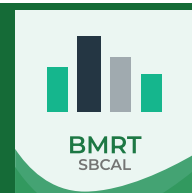
Hilana dos Santos Sena BRUNEL¹, Carla Lujan Pereira VILLARROEL^{1,2}, Patricia Furtado MALARD^{1,2}

¹ BioInnova Testes e Soluções Biomoleculares LTDA;

² Universidade Católica de Brasília

Introdução: A perda de grandes porções de pele, causada por lesões, está associada a problemas de saúde e a infecções. A cicatrização da pele é um processo complexo, que consiste em várias etapas: inflamação, hemostasia, proliferação das células e remodelação do tecido. Qualquer desordem nesse processo pode comprometer a cicatrização e progredir de uma lesão aguda para uma lesão crônica. Por isso, tem havido uma busca intensa por produtos com a capacidade de estimular as etapas de cicatrização de pele, garantindo um processo de cicatrização dentro de seu tempo fisiológico ou mesmo reduzindo o tempo de cicatrização. Entre estes produtos, há expectativa de que as células-tronco mesenquimais e seu secretoma tenham lugar de relevância. **Objetivos:** Avaliar a atividade metabólica celular *in vitro* quando em contato com cicatrizante formulado a partir de secretoma de células-tronco mesenquimais. **Material e Métodos:** foi desenvolvido um produto cicatrizante contendo secretoma de células-tronco mesenquimais. Esse produto foi avaliado em testes *in vitro*, utilizando queratinócitos (HaCat). Foi realizada a avaliação de viabilidade celular por MTT, contagem celular e análise de migração celular pelo teste do arranhão. Os testes foram realizados também com produto cicatrizante comercial. Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism. **Resultados:** a viabilidade celular por MTT mostrou que os produtos não causam danos às células ($p > 0.05$), visto que a viabilidade do cicatrizante de secretoma foi de 100,1±1,5% e do produto comercial 99,6±1,1%. Já para a contagem celular, o cicatrizante de secretoma promoveu maior proliferação celular (291.000±23.930) tanto em relação ao controle (231.950±19.085) quanto em relação ao produto comercial (151.333±21.648) ($p < 0,005$). No ensaio de migração, o cicatrizante de secretoma promoveu o fechamento de 66±5% da área lesionada, enquanto o controle fechou 36±9% e o produto comercial, 35±18% ($p < 0,005$). **Conclusão:** foi possível realizar a avaliação da atividade biológica do cicatrizante desenvolvido a partir de secretoma de células-tronco mesenquimais usando os testes *in vitro*. Os resultados mostraram que o produto desenvolvido se mostrou ativador da proliferação dos queratinócitos *in vitro*, bem como estimulou o fechamento de ranhuras no ensaio de migração celular sem causar danos na viabilidade das células.

Palavras-chave: Migração celular, proliferação celular, prova de conceito, viabilidade celular.



29 | AVALIAÇÃO IN VITRO DE TOXICIDADE AQUÁTICA DE CONSERVANTES COSMÉTICOS

Júlia Beatriz Vaz de OLIVEIRA¹, Irisdoris Rodrigues de SOUZA¹, Natália de Albuquerque VITA², Andrezza Di Pietro Micali CANAVEZ², Desirée Cigarán SCHUCK², Cynthia Bomfim PESTANA¹, Daniela Morais LEME¹

¹Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil ²Grupo Boticário, Departamento de Segurança de Produtos, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil

Introdução: Ingredientes de cosméticos são extensivamente avaliados quanto a efeitos à saúde humana. Entretanto, tais substâncias podem ter como destino os ecossistemas aquáticos, de forma a causar impactos à biota associada. Nesse âmbito, conservantes são uma categoria de ingredientes de cosméticos que levantam preocupações acerca de seus impactos ambientais. Por isso, é necessário avaliar o potencial de toxicidade em modelos representativos de organismos aquáticos.

Objetivos: Este trabalho visou avaliar o potencial de toxicidade aguda em peixes dos conservantes álcool benzílico e etilhexilglicerina por métodos *in vitro* com linhagens celulares permanentes de peixes.

Material e Métodos: Foram conduzidos ensaios de citotoxicidade com células RTgill-W1 (derivadas de brânquias de *Oncorhynchus mykiss*) de acordo com o método de teste OECD 249, e com células ZFL (derivadas de fígado de *Danio rerio*) segundo uma adaptação proposta por nosso grupo de pesquisa. Assim, células RTgill-W1 e células ZFL foram expostas (24 h) aos conservantes (Álcool benzílico: 0,01 a 10 mg/mL; Etilhexilglicerina: 0,01 a 5 mg/mL) em placas de 24-poços e 96-poços, respectivamente. Viabilidade celular foi, então, determinada por três marcadores diferentes: alamarBlue (metabolismo celular), CFDA-AM (integridade de membrana) e vermelho neutro (atividade lisossomal). Resultados de viabilidade celular foram determinados em porcentagem (%) relativa ao controle negativo. Todos os experimentos foram realizados na presença de controles apropriados (branco, controles negativo e positivo). **Resultados:** Resultados preliminares mostraram que ambos os conservantes causam citotoxicidade nas células de peixes, sendo o efeito da etilhexilglicerina um pouco mais acentuado do que o do álcool benzílico. No entanto, ainda são necessários experimentos adicionais para obtenção de valores de concentração efetiva média (EC50) e, conseqüente, classificação de perigo a ambientes aquáticos. Além disso, nossos resultados sugerem uma maior sensibilidade da linhagem RTgill-W1 na avaliação dos conservantes do que as células ZFL. **Conclusão:** Dados de toxicidade aquática de conservantes são importantes para o desenvolvimento de cosméticos eco-friendly e, nesse sentido, informações de toxicidade aguda em peixes podem ser úteis para o desenvolvimento de formulações de menor periculosidade a biota aquática.

Palavras-chave: Álcool benzílico; cosméticos; ecotoxicologia; etilhexilglicerina; linhagem celular permanente.

Órgãos de fomento ou financiadores: CNPq, CAPES.

30 | AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE ANIMAIS APÓS RESOLUÇÕES NORMATIVAS DO CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Lília Ribeiro SERODIO¹, Octavio Augusto França PRESGRAVE², Cláudia Maria da CONCEIÇÃO², Saulo Cabral BOURGUIGNON³, Marcelo Salabert GONZALEZ³

¹ Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia (PPBI) da Universidade Federal Fluminense; ² Doutores do Brazilian Center for Validation of Alternative Methods (BraCVAM/Fiocruz); ³ Professores titulares do Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense (UFF)

E-mail autor correspondente: lilia.serodio@gmail.com, octavio.presgrave@gmail.com, claudia.conceicao@fiocruz.br, saulocb@id.uff.br e msgonzalez@id.uff.br

Introdução: Os métodos dos testes alternativos ao uso de animais nas pesquisas e regulação, são desenvolvidos baseados no princípio dos 3 Rs (*Replacement, Reduction, Refinement*). Há mais de 25 anos, a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) reconheceu a necessidade de reduzir animais em trabalhos experimentais e, a partir de 1981, Guias de Teste (GT) foram publicados para introduzir aspectos dos princípios dos 3 Rs. Em consequência da evolução mundial, no Brasil foi implantado em 2008 o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), o qual publicou Resoluções Normativas (RN) que obrigam a substituição do método original pelo método alternativo. Em 2012, foi estabelecida a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA) e o *Brazilian Center for Validation of Alternative Methods* (BraCVAM/Fiocruz). **Objetivo:** Avaliar o quantitativo de animais utilizados antes e após as atualizações dos GTs pela OCDE, os quais são preconizados pelas RNs do CONCEA. **Materiais e Métodos:** Foi realizado um mapeamento das avaliações consideradas pelo CONCEA nas RNs 18/2014, 31/2016 e 45/2022, comparando as versões anteriores dos GTs da OCDE para quantificar os animais utilizados por substância antes da aplicação do princípio dos 3 Rs. Foram calculadas as porcentagens de animais excluídos no total de avaliações por lote de substância. **Resultados e conclusões:** Foram mapeados 12 GTs e um método preconizados anteriormente pela OCDE e farmacopeias européia e brasileira. As atualizações dos GTs e farmacopeias resultaram em 28 métodos *in vitro* substitutivos e 8 testes aplicados para redução no quantitativo de animais. Segundo as resoluções do CONCEA, que adotam os GTs atualizados pela OCDE e Farmacopeia Européia, 100% de um total de 187 animais por lote de substância foram substituídos por métodos *in vitro* para 11 efeitos. Houve uma redução de 67,85% na utilização de um total de 140 animais por lote de substância em 3 avaliações. Em quatro anos, foram reconhecidos no Brasil quatro órgãos robustos e interligados para a implantação de métodos alternativos ao uso de animais. Após a vigência das RNs do CONCEA, entre 2019 e 2024, houve uma redução significativa no uso de animais em pesquisa e controle de qualidade dos fabricantes.

Palavras-chave: Métodos alternativos, Instruções Normativas, métodos *in vitro*.



31 | BIOCOMPATIBILIDADE DE CÉLULAS-TRONCO HUMANAS COM MEMBRANAS POLIMÉRICAS

Paula Letícia de Melo SOUZA¹, Ana Karulline Garcia UNGARATTI¹, Aliny Pereira de LIMA¹, Marize Campos VALADARES¹

¹ Laboratório de Ensino e Pesquisa em Toxicologia *In vitro*- TOX IN-Faculdade de Farmácia/ Universidade Federal de Goiás.

Introdução: As células do epitélio pigmentado da retina (RPE) oriundas de células-tronco, têm sido amplamente estudadas para o tratamento de doenças da retina, como a Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI). Tais células são transplantadas no espaço subretiniano lesionado na forma de suspensão ou ancoradas em uma biomembrana, sendo que nesta última forma, a eficácia do tratamento tem tido melhor êxito. O nosso grupo de pesquisa desenvolveu e caracterizou uma biomembrana de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), revestida de matriz extra celular órgão específica para o ancoramento de células tronco, ou ainda células progenitoras de RPE com potencial de aplicar em transplantes de terapias avançadas da retina. **Objetivos:** Investigar a biocompatibilidade da biomembrana elaborada com células-tronco dentárias, bem como células controle, as células 3T3. **Material e Métodos:** A biomembrana utilizada foi confeccionada com a solubilização do PLGA 10% em solução de 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFP) 90% (v/v), com e sem revestimento de uma camada de matriz extracelular (MEC) oriunda de córnea bovina, sendo moldada em insertos de 24 mm suspensos sem as membranas de tereftalato de polietileno. Para a biocompatibilidade utilizou-se células-tronco dentárias e células controle, 3T3, cultivadas até atingirem 80%-90% de confluência, separando-se posteriormente, uma suspensão celular de 5 x 10⁵ células/mL e adicionando-a a biomembrana previamente esterilizada. O teste de viabilidade celular foi realizado com o LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity Kit, monitorado por 24 horas, e a análise ocorreu em Microscopia Confocal, em High-Content Analysis (HCA; TermoFisher). **Resultados:** Após o período de monitoramento da viabilidade, tanto as células controle, 3T3, quanto as células-tronco dentárias continuaram apresentando características morfológicas típicas de suas linhagens. Em análise de fluorescência no HCA, observou-se predominância de células vivas coradas em verde pela calceína AM frente as células mortas coradas em vermelho pelo homodímero de etídio-1, para ambas as linhagens celulares. As biomembranas revestidas com MEC apresentaram melhor distribuição das células, sugerindo maior potencial de ancoramento celular. **Conclusão:** Os resultados apresentam biocompatibilidade da membrana elaborada com células-tronco dentárias e células 3T3, demonstrando ainda resultados promissores na presença da combinação da membrana com a MEC, devido a maior rugosidade e complexidade necessárias para a distribuição e adesão das células.

Palavras-chave: Células-tronco dentárias. Degeneração Macular Relacionada à Idade. Epitélio pigmentado da retina. High-Content Analysis.

Órgãos de fomento ou financiadores: CNPq, FINEP, CAPES.

32 | *C.elegans* AS MODEL TO STUDY THE LIPOSOMES LOADED EXTRACTS EFFECTS AGAINST AMYLOID-BETA AGGREGATION

Flávia Suelen DE OLIVEIRA PEREIRA¹, Gabriel Pedroso VIÇÓZZI², Andreia Limana TAMBARA¹, Cristiane Casagrande DENARDIN¹ and Daiana Silva ÁVILA^{1,2}

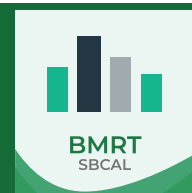
¹ Federal University of Pampa (UNIPAMPA), Uruguiana, Brasil-RS;

² Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Brasil-RS;

Introduction: Amyloid-beta (A β) aggregation is a principal hallmarker of Alzheimer's disease (AD). In humans, AD affects the memory and lifespan, being the available treatment limited in containing the progress of this disease. For this reason, the search for new therapeutic strategies using *in vivo* models is necessary. A limitation to use transgenic mammals is the high cost and difficulty in evaluating the all progression of A β aggregation on longevity. **Objectives:** Investigate the efficacy of liposomes loaded with Purple Pitanga (PP) extract to contain the toxic effects caused by A β aggregation in *C.elegans*. **Material and Methods:** We used the strains N2 (wild-type), CL2006 (*dvls2* [pCL12(*unc-54/human Abeta peptide 1-42 minigene*) + *rol-6(su1006)*], CL2355 (*dvls50* [pCL45 (*snb-1::Abeta 1-42::3' UTR(long)*) + *mtl-2::GFP*] I), CF1553 (*muls84* [(*pAD76*) *sod-3p::GFP* + *rol-6(su1006)*]), SJ4100 (*zcls13* [*hsp-6p::GFP* + *lin-15(+)*]) and TJ356 (*zls356* [*daf-16p::daf-16a/b::GFP* + *rol-6(su1006)*])). These worms were submitted to a chronic exposure with the PP at concentrations of 100 to 500 μ g/mL CAE/mL. After 48 hours, we evaluated the survival rate, Superoxide dismutase-3::GFP (SOD-3) expression, chaperone HSP-6 expression and DAF-16 localization. The worms of strain CL2006 were transferred to new plates for evaluation of paralysis phenotype and longevity, during the all lifetime. In the adult stage, the egg-laying response to levamisole, amyloid aggregates (quantified using Thioflavin S as dye), memory and lipofuscin content also were evaluated. The data were analyzed using GraphPad Prism 8.0.2, $p < 0.05$ were considered significant values. **Results:** The liposomes formulation demonstrated to decrease the survival of worms in the highest concentration tested. In addition, the non toxic concentrations decrease the paralysis phenotype, increasing the longevity. These anti-aging effects are probably due to an increase in the *sod-3*, modulated by *daf-16* activation, and *hsp-6* expression, which resulted in a decrease in lipofuscin and A β aggregates content. A beneficial effect also was demonstrated in the egg-laying and memory behaviors. **Conclusion:** Using *C.elegans* with these results it was possible to demonstrate that liposomes loaded PP protects against the toxic effects caused by A β aggregation

Key words: alternative models. Alzheimer's disease. chaperones. lipofuscin. memory.

Funding: CAPES and CNPq.



33 | CHARACTERIZATION AND DEVELOPMENT FROM DENTAL CELLS OF NEURONAL MICROTISSUES APPLIED TO MICROPHYSIOLOGICAL SYSTEMS

Leandro Leal Rocha de OLIVEIRA¹, Lauren Dalat de Sousa COELHO¹, Aliny Pereira de LIMA¹, Artur Christian Garcia da SILVA¹, Larissa MATUDA¹, Thaisângela Rodrigues Lopes e Silva GOMES¹, Evelyn Rayani Araújo FARIAS¹, Lucas Canêdo de OLIVEIRA¹, Júlia Cristina Lucio da CUNHA² Jacqueline Alves LEITE,² and Marize Campos VALADARES¹

¹ Laboratório de Ensino e Pesquisa em Toxicologia *In vitro* (ToxIn), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil.

² Laboratório de Ensino, Pesquisa e Extensão em Neurociências Aplicadas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil.

Introduction: Introduction: The inability of animal models to predict therapeutic responses to human neuropsychiatric and neurodegenerative diseases is a major problem that also challenges their use for basic research. Human teeth are an important source of adult stem cells, capable of self-renewal and differentiate in multilineage, accessible, lower cost in relation to iPSC, and then an interesting tool for the development of microtissues applied to microphysiological systems (MPS). **Objective:** This study aimed to determine the potential of human dental stem cells from apical papilla, pulp and periodontal ligament, to use in MPS in neurotoxicological and pharmacological screenings. **Methods:** Ethical protocol: #44067021.0.00005083. Dental stem cells were isolated, cultured, and then characterized by flow cytometry and differentiated into neurospheres. **Results:** The cellular phenotype from the cells were positive for CD90, CD105, Nanog, Oct 3/4 and Nestin, and negative for CD34 and CD45. These cells differentiated into neural progenitor cells, in particular from apical papilla. Characterization of neurospheres generated from human dental stem cells revealed positive expression of Nestin, GFAP and Ki67, and negative CD90. On MPS, the neurospheres from papilla and pulp were viable for up to 7 days but the ligament, apparently showed adherence on the system. LDH tests were performed every 48 hours to evaluate the viability of the neurospheres and it was seen that the neurospheres were stable with no signal of cytotoxicity. **Conclusions:** Our data support the potential use of dental stem cells for the development of neural human microtissues to be used in MPS systems for modeling drug discovery for neuropsychiatric and neurodegenerative diseases.

Key words: Neurospheres. Neurodegenerative diseases. Microphysiological systems. flow Cytometry.

Financial support: FAPEG, CAPES and CNPq.

34 | CHARACTERIZATION OF GENETIC MODULATION IN SKIN-MICROBIOME INTERACTION IN 3D SKIN MODELS

Tugstênio Lima de Souza¹, Carolina Motter CATARINO¹, Ariane Caroline Campos PASCHOAL¹, Bruna BOSQUETTI¹, Meg Cristina de Castilho COSTA¹, Andrezza Di Pietro Micali CANAVEZ¹, Desirée Cigaran SCHUCK¹

¹ Safety Assessment Management - Grupo Boticário, São José dos Pinhais - PR

Introduction: The use of 3D skin models provides a more accurate *in vitro* representation of human skin characteristics, especially for cosmetics testing. However, there is a need to increase the complexity to have more realistic models and, in this sense, it is important to consider the impact of the microbiome on skin physiology. The development of 3D models capable of mimicking the skin-microbiome interaction can be considered a revolutionary way of evaluating the efficacy of cosmetic products, without the need for human testing, due to the greater phenotypic and physiological similarity of the test model. **Objectives:** Characterize genetic modulation in 3D skin models cultivated with the presence of organisms that mimic the microbiota present in human skin. **Material and Methods:** Datasets GSE129864 and GSE171720 were obtained from the NCBI-GEO database, both consisting of an *in vitro* experiment of co-cultures of EpiDermFT™ skin tissue (MatTek) and two different skin isolates (*Micrococcus luteus* and *Pseudomonas oleovorans*). Skin without co-culture was used as a control group. After 8 days, the samples were analyzed using Affymetrix Human Clariom S. Biological duplicates were performed for the controls and replicates for each treatment. The two data sets were evaluated using the R package bioconductor - limma to compare the experimental conditions. Volcano plot and venn diagram analyses were used to obtain the genes that were significantly (*padj*. <0.05) differentially expressed. **Conclusion:** The meta-analysis revealed that *P. oleovorans* promotes greater genetic modulation (385 genes) compared to *M. luteus* (38 genes). Co-culture with *P. oleovorans* with 3D skin significantly increased the expression of genes in pathways related to collagen production, cell junctions and epidermal development. Despite the few genes identified for *M. luteus*, this bacteria promoted an increase in the expression of important genes for skin maintenance, such as: *flg2*, *tchh* and *krt2*. In this sense, the use of 3D skin models in association with the microbiota can be a powerful tool in the evaluation of cosmetic products, as well as the development of new claims associated with skin physiology due to the improvement in the genetic characteristics observed.

Key words: 3D skin. Microarray. Microbiome. Transcriptomics.

Sponsor: Grupo Boticário.



35 | COMBINAÇÃO DE SISTEMAS MICROFISIOLÓGICOS E TRANSCRIPTÔMICA PARA AVALIAÇÃO DE CARCINOGENICIDADE

Nathalia de Carvalho INDOLFO^{1*}, Melissa Dibbernn GANZERLA¹, Tábata Renée Doratioto¹, Thayná Mendonça AVELINO², Larissa Bueno TOFANI², Kelen Fabíola ARROTEIA¹, Ana Carolina Migliorini FIGUEIRA².

¹ Natura Cosméticos, Cajamar, São Paulo, Brasil; ² Laboratório Nacional de Biociências, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, São Paulo, Brasil

E-mail autor correspondente: nathaliaindolfo@natura.net

Introdução: Testes em modelo animal para avaliação toxicológica de ingredientes cosméticos, além de eticamente questionáveis, se distanciam da filogenética humana, limitando o seu poder de predição. O banimento destas metodologias pela indústria cosmética trouxe à tona a necessidade de desenvolvimento de metodologias alternativas, porém ainda há gaps para avaliação de desfechos toxicológicos complexos. Atualmente, metodologias alternativas tradicionais são baseadas em testes *in vitro* com culturas de células ou tecidos isolados, que cobrem o aspecto humano devido à origem das células cultivadas, mas se distanciam da complexidade de um organismo devido à ausência do aspecto sistêmico. Os sistemas microfisiológicos, também conhecidos como *organ-on-a-chip* ou *human-on-a-chip*, combinam equivalentes de órgãos humanos em dispositivos microfluídicos, trazendo uma nova abordagem metodológica (NAM) mais fisiológica e relevante para a predição de efeitos em humanos. Neste trabalho, um sistema microfisiológico, contendo equivalentes de pele, fígado e intestino, foi combinado com análise transcriptômica para a predição de carcinogenicidade após tratamento tópico. **Objetivos:** Desenvolvimento de NAM combinando um sistema microfisiológico de três equivalentes de órgãos e análise transcriptômica de um painel gênico para avaliação de carcinogenicidade. **Material e Métodos:** O painel gênico foi elaborado contemplando as principais vias de sinalização moduladas no câncer. Equivalentes de pele, fígado e intestino foram desenvolvidos e caracterizados utilizando metodologias como histologia, microscopia confocal, viabilidade celular, ensaios metabólicos, integridade de barreira e expressão gênica. Os equivalentes foram integrados ao dispositivo microfluídico Chip3plus (TissUse GmbH) e tratamento tópico foi realizado com Formaldeído, um carcinogênico com classificação de perigo harmonizada. Foram avaliados efeitos nos três equivalentes de órgãos por análises de viabilidade celular e do painel de expressão gênica para efeitos carcinogênicos. **Resultados:** A caracterização dos equivalentes indicou morfologia e funcionalidade adequadas e estáveis tanto na condição estática como quando inseridos no sistema. Após tratamento com químico carcinogênico, foram observados efeitos de acordo com o esperado, visto que vias de sinalização canônicas do câncer foram moduladas. **Conclusão:** A NAM desenvolvida se mostrou promissora e com potencial aplicação na indústria cosmética. Testes utilizando outros tóxicos carcinogênicos de proficiência, que atuam por outros mecanismos de ação, são necessários para comprovar a robustez do modelo.

Palavras-chave: Avaliação de segurança. Sistemas microfisiológicos. Carcinogenicidade.

Órgãos de fomento ou financiadores: Empresa Brasileira de Pesquisa e Inovação Industrial (Embrapii) e Natura Cosméticos.

36 | CREME DESINFETANTE PARA AS MÃOS PHTALOX AÇÃO ANTIVIRAL CONTRA SARS-COV-2

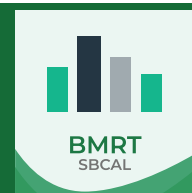
Guilherme Pereira Scagion¹, Érika Donizetti Candido¹, Vanessa Nascimento Chalup¹, Bruna Leal Oliveira², Rodrigo De Vecchi³, Edison Luiz Durigon¹

¹ Laboratório de Virologia Clínica e Molecular, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brazil; ² Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, São Paulo, Brazil; ³ EPISKIN Brasil Biotecnologia, Rio de Janeiro, Brasil

Introdução: Phtalox é uma ftalocianina usada para reduzir os sintomas de COVID-19 em enxaguatórios bucais. **Objetivos:** Avaliar a capacidade antiviral do creme higienizador de mãos contendo Phtalox e o tempo de permanência utilizando modelo Reconstructed Human Epidermal (SkinEthic™ RHE), células CCL-81 VERO e vírus SARS-CoV2/human/Bra/SP02cc/2020 (Genebank MT350282). **Material e métodos:** Os experimentos foram conduzidos no Laboratório NB-3 seguindo os regulamentos de Biossegurança da OMS em conformidade com as Boas Práticas de Laboratório. O produto de teste foi aplicado em RHE e a solução viral foi testada quanto à citotoxicidade. Após 30 minutos, o sobrenadante foi inoculado em diferentes poços contendo células Vero. A solução viral foi armazenada até a quantidade SARS-COV-2 por RT-PCR após 72 h de incubação em DMEM. A cultura celular foi fixada e corada com Naftol Blue Black (Sigma-Aldrich). **Resultados:** Nenhuma citotoxicidade foi observada em células VERO. Os resultados do RT-PCR mostraram que ambos os desinfetantes para as mãos foram capazes de reduzir a carga viral em 100% em 5 minutos e 1 hora. Após 2 horas de aplicação o creme a 0,05% apresentou redução de 89%; durante 3 e 4 horas uma redução de 100%. A 0,25% a redução foi de 91%, 98% e 74% em termos de carga viral, após 2 horas, 3 horas e 4 horas, respectivamente. **Conclusão:** Os desinfetantes para as mãos com Phtalox não foram citotóxicos para células Vero e apresentaram capacidade de reduzir a carga viral até 4 horas após a aplicação em modelo de Epiderme Humana Reconstruída.

Palavras-chave: Creme, SARS-CoV-2, Epiderme Humana Reconstruída *in vitro*.

Órgãos de fomento ou financiadores: Phita-Mask. CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico



37 | CRYOPRESERVED PORCINE PRECISION CUT LUNG SLICES: PRESERVING INSIGHTS INTO PULMONARY PHYSIOLOGY

Marcella Miranda Siqueira FURTUOSO¹, Rafaela Campos de MENEZES¹, Artur Christian Garcia da SILVA¹, Marize Campos VALADARES¹

¹Laboratory of Education and Research in *In vitro* Toxicology, Tox In, Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

Introduction: Porcine Precision Cut Lung Slices (pPCLS) function as a profoundly relevant *ex vivo* model for studying pulmonary physiology, faithfully reproducing the inherent structure and cellular constitution of lung tissue, encompassing respiratory parenchyma, small airways, and immunocompetent cells. However, the process is not without challenges. Laboratories capable of generating larger quantities of slices encounter a dilemma: either employ all slices instantly or forfeit them due to impractical preservation methods. Nonetheless, recognizing the significance of these models, the establishment of effective cryopreservation techniques is paramount. Such advances not only enhance accessibility but also promote broader utilization, enabling sustained investigations into intricate lung physiology and pathologies. **Objective:** To develop reliable preservation methodologies for pPCLS with the ability to maintain tissue integrity and functionality at a high standard after extended storage periods. **Materials and Methods:** pPCLS were obtained using the Tissue Slicer DTK-3000W apparatus. Specimens intended for preservation were carefully placed into cryovials containing 250µL of a proprietary CryoStor® (CS10) or a standard freezing medium (culture medium and DMSO). They were subsequently stored in freezing containers at temperatures below or equal to -80°C for 4–72 hours. The cryovials were then transferred to liquid nitrogen and stored until use. The assessment of tissue viability employed the tetrazolium reduction (MTT) technique after 1 month, 2 months, and 4 months of cryopreservation. **Results:** The findings indicated that samples frozen using the standard freezing medium exhibited reduced tissue viability after 1 month of cryopreservation. However, samples frozen using the CS10 kept the tissue viability after thawing without significant variations. **Conclusion:** In summary, cryopreserving and storing pPCLSs offer a valuable strategy to keep these models in the laboratory for longer, enhancing translational investigations into lung physiology and pathology.

Key words: Cryopreservation; Long-term *ex vivo* culture; New Approach Methodologies; PCLS.

Funding Organizations: CAPES, CNPq, and FINEP.

38 | DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS PARA IMPRESSÃO 3D DE ARCABOUÇOS CONTENDO CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS: UM ESTUDO DE CARACTERIZAÇÃO E BIOCAMPATIBILIDADE

Samarah Vargas HARB¹, Cintia Delai da Silva HORINOUCI¹, Thayná Mendonça AVELINO¹, Vanessa Kiraly Thomaz RODRIGUES¹, Ana Carolina Migliorini FIGUEIRA^{1*}.

¹Laboratório Nacional de Biotecnologia – Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais – LNBio/CNPq.

E-mail autor correspondente: ana.figueira@lnbio.cnpem.br

Introdução: Na busca por modelos humanos não clínicos, as técnicas de bioimpressão 3D tem se destacado por promover a fabricação de protótipos de tecidos humanos artificiais ao combinar materiais e células humanas permitindo o desenvolvimento de modelos robustos, mais preditivos e fisiologicamente relevantes. Para tanto, é necessário o desenvolvimento de biotintas que possuam propriedades reológicas compatíveis com a impressão e ao mesmo tempo mantenham a viabilidade celular e funcionalidade do tecido fabricado. **Objetivos:** O objetivo desse trabalho foi desenvolver composições de biotintas, baseadas em gelatina metacrilada (GelMa), fibrina, e uma blenda de GelMa/Alginato(Alg)/poly(ethylene glycol)(PEG) e caracterizá-las em relação a biocompatibilidade, estabilidade e printabilidade para fins de aplicação em modelos de cultivo 3D. **Material e Métodos:** Foram produzidas as seguintes biotintas: 4%GelMa, 4%GelMA-0.5%Alg-0.5%PEG, 4%GelMA-2%Alg-1%PEG e fibrina. Para avaliação da estabilidade foram feitas medidas de perda de peso e volume ao longo do tempo. A printabilidade foi avaliada por parâmetros reológicos como viscoelasticidade obtidos com as tintas antes e após a reticulação em reômetro compacto modular. Para avaliação de biocompatibilidade, células-tronco mesenquimais humanas de cordão umbilical (Lonza) foram adicionadas às tintas (10000 células/50 µL) e após reticulação dos bioconstrutos foram avaliadas a viabilidade (CellTiter-Glo® 3D) e perfil de necrose e apoptose (RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay) após 24 e 48 horas. **Conclusão:** Todos os hidrogéis produzidos apresentaram boa estabilidade, com baixa perda de massa e volume em função do tempo. Ensaios de reologia mostraram que tanto o GelMA quanto as blendas apresentam as propriedades de pseudoplasticidade e elasticidade, as quais predizem suas boas printabilidades. A solução de fibrinogênio, precursora da fibrina, por apresentar comportamento Newtoniano precisará ser impressa com uma agulha coaxial para que possa ser utilizada de maneira proveitosa na composição de biotintas. A formulação GelMA-2%Alginato-1%PEG reduziu a viabilidade celular e promoveu um maior nível de necrose secundária. Os hidrogéis de GelMA e fibrina apresentaram melhor biocompatibilidade.

Palavras-chave: Bioimpressão 3D. Engenharia tecidual. Hidrogéis. Células-tronco mesenquimais.

Órgãos de fomento ou financiadores: CNPq/MCTI.



39 | DESENVOLVIMENTO DE MODELO 3D CO-CULTIVO PULMONAR HUMANO PARA AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA TOXICOLÓGICA DE PEPTÍDEO ANTIFÚNGICO

Marcos William de Lima GUALQUE¹, Carolina Orlando VASO¹; Kelvin Sousa dos SANTOS¹; Mariana Galeane VICENTIN¹; Paulo César GOMES¹; Andrei MOROZ¹; Maria José Mendes GIANNINI¹; Ana Marisa Fusco ALMEIDA¹.

¹ Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara 14800-903, SP, Brasil.

E-mail autor correspondente: ana.marisa@unesp.br

Introdução: Nos últimos anos tem se visto um grande avanço no uso de modelos tridimensionais (3D), sobretudo na busca de tratamento para várias doenças. Os esferoides de co-cultivo são modelos 3D, interessantes como ferramentas para o entendimento das interações célula-célula e células-matriz extracelular. **Objetivos:** A fim de se avaliar a segurança toxicológica de um peptídeo para o tratamento de criptococose, esse estudo tem como objetivo estabelecer um modelo de co-cultivo 3D de esferoide pulmonar utilizando linhagens de células imortalizadas. **Material e Métodos:** O modelo co-cultivo tridimensional foi desenvolvido utilizando as linhagens celulares A549 e MRC-5. Os orifícios das placas de 96 poços foram revestidos com 50 µL de agarose 1,5%. As células foram preparadas na concentração de 1x10³ células/poço em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37 °C à 5% de CO₂ durante 7 dias. Imagens dos esferoides foram obtidas no quarto e sétimo dia de cultivo e analisadas usando o software ImageJ, determinando parâmetros morfológicos. Foi selecionado um peptídeo denominado PepM2 derivado da *Galleria mellonella* para os testes subsequentes. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do peptídeo foi testada pelo método M27-A2 (CLSI) contra cepas de *Cryptococcus*, tendo como controle o fármaco anfotericina-B. A concentração fungicida mínima foi avaliada pela espotagem de alíquotas em ágar Sabouraud-Dextrose. Após a formação dos esferoides, foram retirados 100 µL do meio da placa e adicionados 100 µL de diferentes concentrações do peptídeo (500 a 31,25 µg/mL) e incubados por mais 72 h. A viabilidade celular foi verificada pela adição de revelador resazurina. **Resultados:** O peptídeo pepM2 apresentou CIM variando de 250 a 31,25 µg/mL e perfil fungicida contra *Cryptococcus* spp. O co-cultivo foi obtido com sucesso, obtendo-se no último dia de análise um diâmetro médio de 338,2 µm com parâmetros morfológicos satisfatórios. Não foi observado toxicidade do peptídeo, mesmo na maior concentração testada de 500 µg/mL. **Conclusão:** O co-cultivo 3D foi eficiente para a determinação da citotoxicidade do peptídeo pois corroborou com os resultados observados em modelo monocamada, também se mostrou útil para estudos futuros de interação parasita-hospedeiro e triagem de drogas.

Palavras-chave: Co-cultivo 3D. Criptococose. Esferoides. Modelos tridimensionais. Peptídeos.

Órgãos de fomento ou financiadores: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e processo CAPES 88887.847382/2023-00. Processo 2021/14839-9 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

40 | DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL PARA PREDIÇÃO DA MUTAGENICIDADE DE PRODUTOS NATURAIS

Mayara Fregonezi PALUDETTI^{1,2}, Joyce Villa Verde Bastos BORBA¹, Rodolpho de Campos BRAGA³, Igor Henrique SANCHES¹, Gustavo da Silveira GOMES², Taina Louise PACHECO², HenricPietro Vicente GIL¹, Sabrina Silva MENDONÇA¹, Paulo Ricardo Pimenta da Silva RAMOS¹, Jade Milhomem LEMOS¹, Arthur Ricardo de Sousa VITORIA⁴, Lucas Pedersen PARIZZI², Bruno Junior NEVES¹, Kelen Fabiola ARROTEIA², Daniela ZIMBARDI², Arlindo GALVÃO⁴, Carolina Horta ANDRADE^{1,4*}.

¹ Laboratório de Planejamento de Fármacos e Modelagem Molecular, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil; ² Natura Cosméticos, Cajamar, São Paulo, Brasil; ³ InsilicAll, São Paulo, São Paulo, Brasil; ⁴ Centro de Excelência em Inteligência Artificial, Instituto de Informática, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil

E-mail autor correspondente: mayarapaludetti@natura.net

Introdução: Composições botânicas consistem em misturas complexas de produtos naturais e são amplamente utilizadas em cosméticos. Um dos maiores desafios na avaliação de segurança destes ingredientes é a geração de dados toxicológicos utilizando *New Approach Methodologies (NAMs)*. Métodos *in silico*, tais como os modelos de *Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR)*, podem ser utilizados na etapa prévia de avaliação de segurança para melhor direcionar os métodos *in vitro* necessários. Porém, os atuais modelos de QSAR para predição da toxicidade de compostos apresentam limitações para avaliação de produtos naturais, devido principalmente ao espaço químico destes modelos. Neste contexto, o desenvolvimento de novos modelos de QSAR que tenham elevada abrangência de produtos naturais em seu espaço químico pode resultar em uma maior assertividade nas predições. **Objetivos:** Desenvolver modelos de inteligência artificial para predição da mutagenicidade de produtos naturais. **Material e Métodos:** Realizou-se um levantamento de dados de mutagenicidade de compostos avaliados em teste de Ames nos principais bancos toxicológicos públicos, além de um levantamento em publicações científicas focado em produtos naturais. Seguidamente foi feito o tratamento dos dados, e a remoção de replicatas de dados de mutagenicidade de acordo com o protocolo experimental. A partir deste conjunto de dados foram desenvolvidos modelos de QSAR usando *machine learning e deep learning* com diferentes descritores moleculares. Foi avaliado o desempenho dos modelos individuais e de consenso para a predição da mutagenicidade de um conjunto externo de compostos teste. Depois, o melhor modelo de consenso foi comparado com os principais modelos disponibilizados publicamente em relação ao desempenho para predição da mutagenicidade de produtos naturais em teste de Ames. **Resultados:** O banco de dados de mutagenicidade de compostos obtidos após o tratamento dos dados consistiu em 11.436 estruturas químicas. O modelo que resultou no melhor desempenho geral, constituído pelo consenso de três modelos de QSAR individuais, apresentou acurácia balanceada de 0,96. Também apresentou desempenho superior comparado aos modelos disponíveis nos *softwares* VEGA, QSAR Toolbox e EPA T.E.S.T. para a predição da mutagenicidade de produtos naturais. **Conclusão:** O modelo de consenso desenvolvido consiste em um método *in silico* promissor para a avaliação pré-clínica de segurança de novos ativos naturais.

Palavras-chave: Inteligência Artificial, Segurança de Cosméticos, Toxicologia Computacional.

Órgãos de fomento ou financiadores: Empresa Brasileira de Pesquisa e Inovação Industrial (CEIA – Unidade Embrapii) e Natura Cosméticos.



41 | DESENVOLVIMENTO DE MODELO *IN VITRO* DE EPIDERMES NEONATAL (BOTI BABY SKIN®) PARA AVALIAÇÃO DE SEGURANÇA E EFICÁCIA DE PRODUTOS COSMÉTICOS DESTINADOS AO PÚBLICO INFANTIL.

Ariane Caroline Campos PASCHOAL¹, Ana WEIHERMANN¹, Bruna BOSQUETTI¹, Carolina Motter CATARINO¹, Renata BRITTO², Rodrigo COLLINA², Andrezza Di Pietro Micali CANAVEZ¹, Desiree Cigaran SCHUCK¹.

¹SafetyAssessmentManagement-GrupoBoticário,SãoJosédosPinhais-PR; ² Product Development Management - Grupo Boticário, São José dos Pinhais - PR;

E-mail autor correspondente: ana.marisa@unesp.br

Introdução: A pele neonatal passa por um período de maturação que se estende até 34 semanas, tornando-a mais suscetível a irritações químicas e infecções quando comparada com a pele adulta. Isso se deve principalmente pela fragilidade da barreira cutânea. Métodos de avaliação *in vitro* são muito utilizados para análise de eficácia e segurança de produtos cosméticos, tornando-se necessário o desenvolvimento de um modelo que considere as particularidades fisiológicas de uma epiderme neonatal. **Objetivo:** Desenvolvimento de um modelo de epiderme reconstruída que mimetize as características morfológicas da pele neonatal para avaliação de produtos e/ou ingredientes cosméticos destinados a esse público. **Material e Métodos:** Foi realizado um estudo comparativo entre o modelo de epiderme adulta e o modelo em desenvolvimento de epiderme neonatal. O modelo de epiderme adulta foi realizado com queratinócitos adultos em um período de diferenciação de 10 a 12 dias. Já o modelo Baby foi elaborado com queratinócitos neonatais com a redução do período de diferenciação. Análises histológicas comparativas (coloração com HE) foram realizadas. Ensaios de tolerabilidade cutânea por medida de viabilidade celular (MTT) foram conduzidos na pele neonatal a fim de observar as respostas ao tratamento com o controle positivo (SDS) e um complexo de ativos cosméticos destinados ao portfólio Baby. **Resultados:** Os resultados obtidos demonstraram que a origem celular não influenciou na sensibilidade do modelo, mas que o período de diferenciação está diretamente relacionado com a fragilidade do tecido. Na análise de tolerabilidade cutânea observamos que com diferença de 24 horas do período de diferenciação a viabilidade foi significativamente reduzida (~40%) perante ao tratamento com o controle positivo, corroborando para a escolha do período de diferenciação de maior fragilidade para mimetizar a pele neonatal. Para o complexo de ativos a viabilidade se manteve em 100% mesmo no tecido de maior fragilidade. **Conclusão:** A implementação da epiderme baby *in vitro* corrobora com a crítica análise de segurança que deve ser realizada antes de estudos clínicos com formulações cosméticas baby. Como perspectivas futuras estudos comparativos de imunomarcagem e expressão gênica estão sendo conduzidos para verificar as principais diferenças de barreira cutânea entre o modelo adulto e o neonatal.

Palavras-chave: Neonatal. Epiderme Reconstituída. Segurança e eficácia.

42 | DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA PARA EXPOSIÇÃO DE RADIAÇÃO UVA E POLUIÇÃO AMBIENTAL POR NEBULIZAÇÃO EM RHE

Isadora de Jesus DASILVA¹, Nayara Fernanda Tokashike DE ARAÚJO¹, Maria da Graça LANDIMBRAVO¹, Henrique Marana MIELI¹, Ana Carolina JORDÃO¹, Maisa Oliveira MELO¹, Vanja DAKIC^{2,3}, Rodrigo DE VECCHI^{2,3}, Hosana Maria DEBONSI¹, Lorena Rigo GASPAR¹, * ¹ Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil.

² L' Oréal Pesquisa e Inovação, Rio de Janeiro, Brasil.

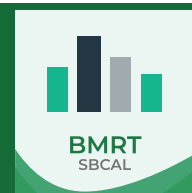
³ Episkin Brasil Biotecnologia, Rio de Janeiro, Brasil.

E-mail autor correspondente: lorena@fcrp.usp.br

Introdução: A radiação UVA, proveniente da luz solar, induz a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), associadas a danos como fotoenvelhecimento e alterações no DNA, que podem levar ao desenvolvimento de câncer de pele. Isso pode se intensificar com a exposição às partículas provenientes da poluição urbana, que contém substâncias fotossensibilizantes e que podem aumentar a produção de ERO e agravar os danos da exposição à radiação solar. Neste contexto, o modelo SkinEthic™ RHE fornece resultados mais preditivos tanto para avaliação da toxicidade quanto para a avaliação da eficácia, sendo que o uso do sistema VitroCell Cloud para nebulização do material particulado aproxima o estudo das condições reais de uso e exposição de produtos cosméticos. **Objetivos:** Desenvolver um sistema para exposição de modelos de epiderme humana reconstituída à radiação UVA e poluição ambiental por meio de nebulização via Vitrocell Cloud™ e análise da produção de ERO por fluorescência. **Material e Métodos:** Os modelos RHE foram expostos a diferentes doses de radiação UVA e ao material particulado (MP 2,5), utilizando o equipamento Vitrocell Cloud™. Os modelos de pele foram submetidos a doses de radiação UVA de 6 e 10 J/cm² e duas concentrações da sonda fluorescente (25 e 50 μM), DCFH2-DA, utilizada para a quantificação de ERO. O α-tocoferol foi utilizado como controle positivo. **Resultados:** A concentração da sonda e a dose de radiação UVA mais adequadas para as análises dos cortes histológicos, foram de 25 μM e 6 J/cm², respectivamente. Houve aumento de 1113% e 150% na geração de ERO quando os modelos foram expostos apenas à radiação UVA ou poluição, respectivamente, quando comparados ao controle não exposto à radiação e poluição. Já a combinação de ambos elevou a produção em 1663% de ERO. A ação antioxidante do α-tocoferol foi comprovada nas diferentes concentrações analisadas. **Conclusão:** Foi possível padronizar um sistema de exposição para avaliação dos efeitos da radiação UVA e poluição ambiental através da análise da produção de ERO no modelo SkinEthic™. A radiação UVA foi a principal responsável pela produção de ERO, entretanto a poluição também induziu a formação de ERO.

Palavras-chave: Epiderme Humana Reconstituída; Métodos alternativos; Poluição; Mecanismos de proteção; Exossoma.

Órgãos de fomento ou financiadores: Os autores agradecem à Episkin e à L'Oréal Pesquisa e Inovação, pelo fornecimento dos modelos SkinEthic™ RHE, à CAPES, ao CNPq, à FAPESP e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP) pelo apoio para o desenvolvimento deste trabalho.



43 | DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO ALTERNATIVO INOVADOR EM SUBSTITUIÇÃO AO USO DE ANIMAIS PARA ANÁLISE DE ECG NO AGRONEGÓCIO

Luciana Chain VERONEZ^{1,2}, Malena Martínez PÉREZ^{1,2}, Carla Carolina MUNARI¹, Daniel Blaskes CARRÃO¹, Nayara Cristina Perez de ALBUQUERQUE¹, Franciane MARQUELE-OLIVEIRA^{1*}, Danielle Aparecida GUIMARÃES², Elaine Cabrini ZAMPRONIO², Giovanna de Fatima Moreno AGUIAR^{2*}

¹Eleve Science Pesquisa e Desenvolvimento, Supera Parque Tecnológico, Ribeirão Preto - SP, Brasil; ²Ourofino Saúde Animal, Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento Analítico.

E-mail autor correspondente: giovanna.aguiar@ourofino.com e franciane.oliveira@elevescience.com

Introdução: Atualmente, o controle de qualidade de produtos contendo gonadotrofina coriônica equina (eCG), hormônio amplamente utilizado na medicina veterinária para indução da reprodução em bovinos, é baseado em método farmacopeico in vivo, utilizando ratas. Diante da crescente preocupação mundial a respeito do princípio dos 3R's, buscando a redução, refinamento ou substituição do uso de animais, existe a necessidade do desenvolvimento de ensaios alternativos *in vitro* que sejam seguros e eficazes. **Objetivos:** O objetivo deste trabalho foi desenvolver duas novas ferramentas analíticas baseadas em cromatografia e cultura celular que se complementam a fim de serem empregadas no controle de qualidade de produto comercial contendo eCG. **Material e Métodos:** Foram desenvolvidos 2 métodos complementares, sendo o primeiro um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (HPLC-DAD) e o segundo uma metodologia empregando modelo celular através da estimulação da produção de progesterona em células de Leydig (linhagem MA-10). As células foram tratadas com diluente e diferentes concentrações de eCG por 24 horas, seguido de coleta do sobrenadante e quantificação de progesterona por ELISA. Os métodos foram desenvolvidos empregando produtos comerciais contendo eCG (Sincro eCG - Ourofino) e o padrão de referência (PMSG). **Resultados:** O perfil cromatográfico do padrão PMSG e dos produtos avaliados foram similares, apresentando dois picos com tempo de retenção de 42,8 e 48,5 minutos, respectivamente. Portanto, o método foi capaz de identificar os picos correspondentes ao eCG. Os resultados da cultura celular mostraram que tanto células tratadas com padrão, quanto as tratadas com produtos comerciais, apresentaram maior produção de progesterona em comparação ao controle (diluente). Além disso, essa resposta ocorreu de forma dose-dependente, demonstrando a atividade biológica dos produtos testados. **Conclusão:** Os resultados indicam que a combinação dos métodos desenvolvidos, HPLC-DAD e cultivo celular, possuem o potencial para predição da atividade biológica de eCG, podendo representar alternativas sustentáveis no controle de qualidade de produtos veterinários em substituição aos métodos in vivo.

Palavras-chave: cromatografia. Cultura celular. ECG. Métodos alternativos.

Órgãos de fomento ou financiadores: Conselho Nacional de Desenvolvimento.

44 | DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO TRIDIMENSIONAL DE CULTURA DE CÉLULAS DE CARCINOMA MAMÁRIO MURINO 4T1 EM BIOMATERIAIS PARA INVESTIGAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA GALECTINA-3 NA PROGRESSÃO TUMORAL

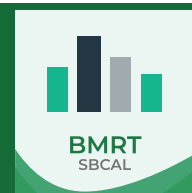
Paula Lopes CASCABULHO¹, Evelyn Emyli Barros ROSA¹, Ana Carolina Borges CAMPOS¹, Márcia Cury EL CHEIKH¹ e Ronaldo José Farias Corrêa do AMARAL¹

¹ Laboratório de Proliferação e Diferenciação Celular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro;

Introdução: O modelo de cultivo de células bidimensionais (2D) é amplamente utilizado para o estudo do câncer, mas tem limitações na mimetização do microambiente tumoral, o que dificulta a translação de novas terapias para a clínica. Este modelo não mimetiza o microambiente tumoral natural devido às limitações em reproduzir as comunicações celulares (célula-célula) e com a matriz extracelular (célula-matriz). Para superar essas limitações, os sistemas de cultivo tridimensionais (3D) estão passando por um contínuo aprimoramento e tornaram-se cruciais para investigações fundamentais na área da biologia de tumores e engenharia de tecidos. Adicionalmente, eles oferecem a perspectiva de reduzir a dependência da utilização de animais em testes de triagem de drogas. **Objetivos:** Portanto, o objetivo desta pesquisa foi investigar o cultivo de células tumorais em biomateriais feitos à base de gelatina, ao mesmo tempo em que investiga o papel desempenhado pela proteína galectina-3 (Gal-3) na progressão tumoral nesse modelo. **Material e Métodos:** Utilizamos a linhagem de carcinoma mamário murino 4T1 como modelo de estudo. Além das células selvagens (4T1WT), também utilizamos células silenciadas para a proteína galectina-3 (shRNAGal-3) para analisar o papel dessa proteína na progressão do tumor. Por meio das técnicas de microscopia eletrônica e óptica, examinamos as propriedades do biomaterial utilizado como plataforma tridimensional de cultivo e sua interação com as células 4T1WT e 4T1 shRNA-Gal-3. **Resultados:** Os resultados obtidos revelaram uma adesão bem-sucedida das células ao biomaterial, assim como a presença de células dispersas e interligadas na matriz de colágeno. Além disso, identificamos diferenças na viabilidade celular e na degradação do scaffold entre as células 4T1 shRNA-Gal-3 e as células 4T1WT, com uma considerável degradação do biomaterial pelas células nas quais a galectina-3 foi silenciada. **Conclusão:** Essas descobertas ampliam nossa compreensão sobre a interação entre células e biomateriais em um contexto tridimensional, fornecendo informações valiosas para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e direcionados. Ao mesmo tempo em que contribuem para a redução da necessidade de utilizar animais em pesquisas.

Palavras-chave: Câncer de mama. cultivo tridimensional. biomaterial e Galectina-3.

Órgãos de fomento ou financiadores: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).



45 | DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE ENSAIO DE ADIPOGÊNESE PARA PESQUISA DE AGENTES ANTI-OBESIDADE E DISRUPTORES ENDÓCRINOS

Juliana Helena PAMPLONA¹, Alessandra Melo de AGUIAR¹

¹Instituto Carlos Chagas/Fiocruz-PR;

E-mail autor correspondente: juliana.pamplona@fiocruz.br e alessandra.aguiar@fiocruz.br

Introdução: Segundo a Organização Mundial da Saúde, 1,9 bilhões de adultos estavam acima do peso em 2016; destes, 650 milhões eram obesos. A obesidade é um problema pandêmico em adultos e crianças, e causa grandes custos aos sistemas de saúde, devido à sua associação com diabetes tipo 2, síndrome metabólica, doenças cardiovasculares e cânceres. Dentre as possíveis e diversas causas, estão os fatores ambientais: algumas substâncias (contaminantes ambientais) têm a capacidade de interferir no sistema endócrino de humanos e animais, e receberam a denominação de disruptores endócrinos. As células-tronco adultas humanas se mostram promissoras como modelos de estudo de doenças e avaliação de novas drogas, uma vez que é possível avaliar seus efeitos não apenas na viabilidade celular mas também no processo de diferenciação. Assim, vêm sendo de grande aplicação como métodos alternativos ao uso de animais em ensaios pré-clínicos e avaliação de toxicidade de diversas substâncias, pois a diferenciação tem se mostrado mais sensível que a viabilidade celular, inclusive em células humanas. Este projeto aborda o problema de proporções pandêmicas - a obesidade, e busca assim desenvolver métodos alternativos ao uso de animais baseado na diferenciação adipogênica de células-tronco adultas humanas derivadas de tecido adiposo, para prospecção de agentes antiobesidade e disruptores endócrinos. **Objetivos:** Desenvolver e validar método funcional *in vitro* e molecular de adipogênese para pesquisa de agentes antiobesidade e triagem de disruptores endócrinos e determinar as vias moleculares envolvidas. **Material e Métodos:** As células foram plaqueadas em placas de 96 poços e mantidas em meio de diferenciação celular com trocas de meio e de adição de químicos a cada 3 ou 4 dias por 14 dias, coradas com Dapi para visualização de núcleos e Vermelho Nilo para gotículas lipídicas, com avaliação por High Content Screening e leitora de micropoços. **Conclusão:** Os resultados produzidos até o momento indicam que a metodologia é passível para a identificação de agentes que interferem com a adipogênese *in vitro*, confirmado pelos dados de que a rosiglitazona, um agonista de PPARG, favorece a indução adipogênica nas células utilizadas. Outros compostos com potencial de inibição e de indução da adipogênese estão em avaliação.

Palavras-chave: Obesidade. Disruptores endócrinos. Adipogênese. Células-tronco. Métodos alternativos.

Órgãos de fomento ou financiadores: Capes; Programa Inova Fiocruz; Rede de Plataformas Tecnológicas Fiocruz.

46 | DEVELOPMENT OF 3D STEATOSIS SPHEROIDS HUMAN HEPATIC MODEL FROM ADIPOCYTES DIFFERENTIATED

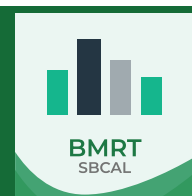
Larissa Bueno TOFANI¹, Melissa Dibbern GANZERLA¹, Thayná Mendonça AVELINO¹, Rafael Junior de AZEVEDO¹, Maiara Ferreira TERRA¹, Ana Carolina Migliorini FIGUEIRA¹

¹Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio); CNPEM; Campinas; Brazil.

Introduction: Steatosis is characterized by lipid accumulation in consequence of alteration in synthesis and elimination of triglycerides, affecting mainly the liver. 3D cell culture has gained great attention once it promotes more realistic conditions with native tissues, being an alternative to experimental animal model. **Objectives:** Develop a 3D spheroids human hepatic HepaRG:HHSTec steatosis model from adipocytes differentiated tissues. **Material e Methods:** For this, HepaRG cells were cultured in William's medium supplemented with 0.5 μ M hydrocortisone hemi-succinate and 5.0 mg/mL insulin. HHSTec cells were cultured in Stellate Cell Medium, while the pre-adipocytes 3T3-L1 were cultured in DMEM medium. All mediums were supplemented with 10% v/v of fetal bovine serum (FBS). Firstly, HepaRG cells were differentiated into hepatic and canalicular structures after 14 days in culture with 2% v/v of dimethyl sulfoxide (DMSO). Then, pre-adipocytes 3T3-L1 were maintained in a differentiated cocktail (1 μ M dexamethasone, 1 μ g/mL insulin and 0.5 mM IBMX) for 48 hours and 8 days to obtain the conditioned medium I and II, respectively. HepaRG:HHSTec spheroids (1.0x10⁶ cells) were incubated with conditioned medium I and II for 14 days to verify their influence in steatosis modulation. Results: As results, we verified the increase of triglycerides quantification of HepaRG:HHSTec spheroids treated with conditioned medium I and II (25 and 15 mg/dL, respectively), when compared to only medium (5 mg/dL). For Oil red O[®] analysis, we observed the higher quantification of lipid accumulation in HepaRG:HHSTec spheroids treated with conditioned medium I (2.5-fold change) than control. No difference was observed to conditioned medium II. Confocal microscopy demonstrated the higher lipid accumulation (BODIPY[®]) and higher Lipoprotein-Lipase (LPL) expression in HepaRG:HHSTec spheroids treated with conditioned medium I, than control (only medium) and conditioned medium II. We observed higher glycogen accumulation (15 μ g) and higher Aspartate Aminotransferase (AST) - 1.6 milliunits/mL - in HepaRG:HHSTec spheroids treated with conditioned medium I, then compared to the control (5 μ g and 1.0 milliunits/mL), demonstrating its influence in hepatic functions modulation in consequence of steatosis induction. **Conclusion:** As results, we obtained and characterized a 3D steatosis model of spheroids human HepaRG:HHSTec from conditioned medium of mature adipocytes.

Key words: Alternative animal model. 3D hepatic spheroids. Mature adipocytes. Steatosis.

Financial support: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, process 2022/11485 4)



47 | DEVELOPMENT OF A 3D BRONCHIAL CO-CULTURE MODEL FOR IN VITRO ASSESSMENT OF RESPIRATORY SENSITIZERS

Artur Christian Garcia da SILVA¹, Amanda Cecília Guimarães BORGES¹, Izadora Caroline Furtado de MENDONÇA¹, Daniel GRAZIANI², Marize Campos VALADARES¹

¹Laboratory of Research and Education in *In vitro* Toxicology (Tox In), Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás; ²Multiuser Laboratory for Molecules, Cells and Tissues, School of Veterinary and Zootecnics, Federal University of Goiás.

Introdução: Low-molecular-weight (LMW) respiratory sensitizers are substances that induce allergic asthma through repeated inhalation, primarily in occupational environment. Despite being classified as highly concerning by EU REACH, there is a lack of approved methods for assessing the toxicity and risk of these chemicals. Although *in vivo* inhalation assessments can provide acute toxicity data, they poorly capture the immune system-related effects triggered by chemicals like LMW sensitizers, thus failing to predict their impact on human health. In previous research, we investigated the responses of seven LMW sensitizers on lung cells, uncovering distinct reactions in bronchial epithelial, endothelial, and monocytic cell lines. Integrating these cells into a single 3D co-culture model holds promise for comprehending chemically-induced asthma and yielding physiologically relevant insights into pulmonary toxicity. **Objectives:** This study aims to establish a 3D co-culture at an air-liquid interface, which will later be incorporated into a microphysiologic system containing recirculating human neutrophils. **Material and methods:** We employed 8.0µm pore size Transwell inserts for 24-well plates to reconstruct the epithelial model. Bronchial epithelial cells (BEAS-2B) were cultivated in the upper compartment, while EA.hy926 endothelial cells grew on the basolateral side. Various culture media combinations were assessed, and cell viability was evaluated after 7 days of air-liquid interface cultivation using the Live/Dead staining procedure. Immunofluorescence was used to analyze CD31 and MUC1 biomarker expression for model phenotypical characterization. The HL-60 cell line was differentiated into neutrophils through cultivation with dimethylsulfoxide and characterized by flow cytometry. **Conclusion:** Results demonstrated that the BEBM:DMEM media combination was optimal for both endothelial and epithelial cell lines, yielding higher rates of live cell staining. Furthermore, after 7 days of cultivation, the endothelial and epithelial portions exhibited consistent expression of CD31 and MUC1, respectively. Successful differentiation of neutrophils was confirmed by their high levels of CD11b and CD18 expression. Collectively, these findings underscore the potential utility of the developed model for assessing pulmonary toxicity caused by LMW inhaled sensitizers.

Key words: Pulmonary toxicity, air-liquid interface, chemically-induced asthma, respiratory sensitization, new approach methodologies.

Acknowledgements: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Lush Prize.

48 | DEVELOPMENT OF A HUMAN-BASED TERATOGEN SCREENING PLATFORM USING DENTAL STEM CELLS

Lauren Dalat de Sousa COELHO¹, Leandro Leal Rocha de OLIVEIRA¹, Aliny Pereira de LIMA¹, Lucas Canêdo de OLIVEIRA¹, Jacqueline Alves LEITE², Marize Campos VALADARES¹.

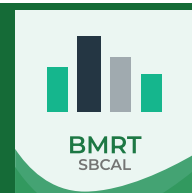
¹Laboratório de Ensino e Pesquisa em Toxicologia *In vitro* (ToxIn), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil.

²Laboratório de Ensino, Pesquisa e Extensão em Neurociências Aplicadas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil.

Introduction: Exposure to teratogenic chemicals during pregnancy can harm embryonic development. Currently, animal testing is still the gold standard for predicting potential teratogens, but it is resource intensive, time consuming, ethically questionable, and may not accurately mimic human responses. Consequently, there is a need for new *in vitro* model approaches to reduce animal testing and enhance the prediction of developmental toxicity. Human dental stem cells offer a potential solution, as a source of adult stem cells, presenting high plasticity and multipotential capabilities and are readily available as discarded byproducts. **Objectives:** Development of a teratogen screening platform using dental stem cells as a human-based model. **Materials and Methods:** Dental stem cells derived from apical papilla (*Ethical protocol: #44067021.0.00005083*) were extracted, cultured, and characterized to CD90, CD105, STRO-1, Nanog, Oct 3/4, Nestin, and CD34 by flow cytometry. The classical teratogenic compound 5-fluorouracil (0.77 – 2430 µM) was used as a positive control, and the cell viability was assessed by MTT assay, at 24 and 48h, after exposure to the drug to determine CV80. In addition, the expression of CD90 and Nestin biomarkers was evaluated by flow cytometry at test concentrations of 77, 104 and 240 µM for 48h. **Results:** These cells exhibited positive expression for CD90, CD105, STRO-1, Nanog, Oct 3/4, and Nestin, while they were negative for CD34. No cytotoxicity was observed for any concentrations within 24h. However, the CV80 value were determined at 104 µM (p<0.05) after 48h of exposure. Preliminary results suggest an increase in CD90 expression by the presence of a 5-FU. On the other hand, Nestin expression was notably lower after exposure to 5-FU 240 µM compared to the control group. **Conclusion:** This study demonstrates the potential of human stem cells as a promising model for teratogen screening. They showed sensitivity to exposure to 5-FU at specific concentrations, and could represent a significant advancement in reducing animal usage while enhancing the ability to predict human developmental toxicity.

Key words: Developmental toxicity. Cytotoxicity. Flow cytometry. NAMS. 5-Fluorouracil.

Financial support: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).



49 | DEVELOPMENT OF AN ACELLULAR MEMBRANE-BASED SCREENING ASSAY FOR OCULAR TOXICITY ASSESSMENT

Jordana Andrade SANTOS¹, Artur Christian Garcia DA SILVA¹, Marize Campos VALADARES¹

¹Universidade Federal de Goiás;

Introduction: Ocular opacity is a crucial parameter for assessing ocular risk. The extracellular matrix organized in the structure of the cornea can be altered by interactions between possible irritants and their components, leading to disorders such as coagulation and complexation. Substances with irritating properties induce these alterations, evident in the increase in corneal turbidity. The Bovine Corneal Opacity and Permeability test is indicated for evaluating ocular irritants, but obtaining fresh, high-quality material presents challenges. **Objectives:** In the current context of developing methods with improved predictive capacity, accessibility, and alternatives to animal testing in the assessment of ocular toxicity, this study aims to develop a screening assay using an acellular approach. This involves the use of decellularized extracellular matrix membranes from bovine corneas, obtained from food industry waste. **Materials and methods:** Bovine corneas were decellularized using a 1% SDS solution, followed by solubilization through chemical digestion (pepsin) and mechanical processing (tissue grinder). This process aimed to obtain a hydrogel, which was placed in inserts for 6-well plates. After drying the hydrogel at 37°C for 24-48 hours, the extracellular matrix membrane was removed from the insert. This membrane was positioned between the anterior and posterior chambers of the holders (DURATEC Analysentechnik GmbH). The membranes were hydrated at 32°C using a PBS solution for 24 hours. The following day, after renewing the PBS, the baseline light intensity was measured using an Opacitometer (DURATEC GmbH). The membranes were exposed to Category 1 and uncategorized substances for one hour, with PBS as a negative control. After exposure, the membranes were rinsed, and the chambers were refilled with PBS for the final light intensity reading. The data was recorded in Lux and converted into opacity values. GraphPad Prism 8 software was used to analyze the data. **Conclusion:** The data indicated an increase in membrane opacity after exposure to Category 1 substances compared to uncategorized substances and PBS. Thus, the membrane appears suitable for screening ocular toxicity based on opacity. This approach not only increases accessibility but also reduces the number of corneas required for studies while directing future analysis of eye irritants.

Key words: Membrane, opacity, eye toxicity.

Funding agencies: CAPES, CNPq, FAPEG.

50 | DEVELOPMENT OF ANIMAL-FREE RECONSTRUCTED SKIN MODELS

Carolina Motter CATARINO¹, Amanda Ferreira KATO¹, Emanoela Lundgren THÁ¹, Tugstênio Lima de SOUZA¹, Bruna BOSQUETTI¹, Meg Cristina De Castilho COSTA¹, Andrezza Di Pietro Micali CANAVEZ¹, Desiree Cigaran SCHUCK¹

¹ Safety Assessment Management - Grupo Boticário.

Introduction: The development of alternative methods to animal tests was a milestone in the life sciences field. It allowed us to fulfill ethical and scientific concerns, leading to advances at speed never seen before, and at a lower cost. However, most of such methods still heavily rely on animal-derived components. Besides ethical concerns, their use also raises concerns regarding relevance of results in studies focused on human health. The replacements of such components by human-derived or chemically defined alternatives are extremely relevant. **Objectives:** Therefore, the aim of this project was to evaluate alternatives to animal-derived components used in the development of 3D reconstructed human epidermis and full-thickness skin models. With that, we aimed to develop a more humanized, ethical, and relevant skin model. **Material and Methods:** Fibroblasts were adapted to an animal-free condition by gradually replacing fetal bovine serum by human platelet lysate and use of animal-free trypsin. Morphological analysis, proliferation rate and gene expression profile of key biomarkers were used to compare the cells. Animal-free fibroblasts, along with commercially available animal-free keratinocytes were used to develop the full-thickness and epidermal reconstructed skin models. Morphological analysis was performed to compare the control an animal free model. **Conclusion:** Adapted fibroblasts maintained morphological characteristics and cell viability, but with reduced doubling time and differential gene expression of biomarkers. When these cells were combined with keratinocytes to develop full-thickness 3D skin models we achieved a tissue that presented better morphology and reduced contraction. And lastly, we have been able to successfully develop a RHE model 100% free of animal derived components. These models could be used in safety evaluation of substances and efficacy tests of cosmetic ingredients improving reproducibility and delivering a truly animal-free test.

Key words: Animal-free models; reconstructed skin; cosmetics testing.

Sponsors: Grupo Boticário.



51 | EFFECTS OF PULMONARY INHALATION: AEROSOL EXPOSURE OF TRIBUTYL PHOSPHATE IN AN PCLS MODEL

Marcella Miranda Siqueira FURTUOSO¹, Rafaela Campos de MENEZES¹, Igor Silva de OLIVEIRA¹, Jacqueline Alves LEITE¹, Marize Campos VALADARES¹

¹Laboratory of Education and Research in *In vitro* Toxicology, Tox In, Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

Introduction: A complex merging of historical and contemporary flame retardants (FRs) is evident, intricately integrated into consumer and industrial materials like plastics, furnishings, and electronics. This ubiquitous distribution spans indoor and outdoor environments, permeating the atmospheric milieu, permeating aquatic mediums, intercalating terrestrial matrices, and even the alimentary continuum. Hence, these FRs tend to be respired into the pulmonary system, potentially instigating deleterious repercussions on human health. **Objective:** Therefore, the objective of this work is to test the effects of flame retardants using an *ex vivo* porcine PCLS (precision-cut lung slices) from food industry waste to evaluate mechanisms of pulmonary toxicity. **Materials and Methods:** Porcine lungs were provided as a donation from a local slaughterhouse. The Precision Cut Lung Slices (PCLS) were acquired using the Tissue Slicer DTK-3000W apparatus. The tissue viability assessment was conducted using the tetrazolium reduction (MTT) technique. Exposure of the tissue to various concentrations of nebulized tributyl phosphate were performed on the fifth day of cultivation within the Vitrocell® Cloud 12 exposure chamber. The existence of reactive oxygen species (ROS) was quantified through DCFH-DA staining. Additionally, caspase was assessed using an indirect immunofluorescence approach. **Results:** The findings revealed that the response of cytotoxicity induced by tributyl phosphate was not contingent upon concentration. Interestingly, it was observed that the intermediate concentration of 175 µg/cm² exhibited the most pronounced cytotoxic effect, and this observation was accompanied by a statistically significant difference. Assessments of caspase activation following aerosolized tributyl phosphate exposure provided insights into toxicity mechanisms. **Conclusion:** The aerosol exposure of tributyl phosphate using the *ex vivo* porcine PCLS model revealed its intrinsic potential for toxicity. These findings underscore the necessity for further comprehensive investigations to elucidate its intricate mechanisms and potential implications.

Key words: Inhalation toxicity assessments; New Approach Methodologies; Precision Cut Lung Slices.

Funding Organizations: CAPES, CNPq, and FINEP.

52 | ELABORAÇÃO DE BIOMEMBRANAS DE POLI(ÁCIDO LÁCTICO-CO-ÁCIDO GLICÓLICO) PARA TERAPIA CELULAR

Paula Letícia de Melo SOUZA¹, Ana Karulline Garcia UNGARATTI¹, Marize Campos VALADARES¹

¹ Laboratório de Ensino e Pesquisa em Toxicologia *In vitro*- TOX IN- Faculdade de Farmácia/ Universidade Federal de Goiás.

Introdução: O poli(ácido láctico-co-glicólico) é um copolímero sintético de ácido polilático (PLA) e ácido poliglicólico (PGA) biodegradável e biocompatível, amplamente usado na produção de diversos dispositivos terapêuticos e estudado como promissor para o suporte e ancoramento celular em terapias celulares para patologias que atingem a retina, como a Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI). **Objetivos:** Produzir uma membrana biodegradável e biocompatível com o espaço subretiniano para futuro uso em terapias celulares. **Material e Métodos:** Inicialmente determinou-se que as membranas seriam confeccionadas pela técnica de moldagem por evaporação com solvente compatível, testando-se o etanol, 1,4-dioxano e 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFP), sob agitação por 12 horas observando a dissolução do PLGA. Foram testadas diferentes proporções dos componentes. Como moldes, foram testadas placas de Petri de vidro de 4 cm, placas de Petri de poliestireno cristal virgem de 4 cm, placas de cultivo de 6 wells, insertos suspensos de 24 mm e de 8 mm. Em seguida, as amostras foram secas a 37°C, durante 24 horas, para eliminar o solvente residual. Priorizou-se para os testes posteriores as membranas visualmente finas, de fácil desmolde, translúcidas, facilmente reidratáveis, maleáveis e resistentes à tração física, selecionou-se os melhores exemplares para adição de combinações da membrana com colágeno (3 mg/mL) (COL) e matriz extracelular oriunda de córnea bovina (MECC). A morfologia foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). **Resultados:** No teste de solubilidade do PLGA, definiu-se o HFP 90% (v/v) como solvente padrão para PLGA 5%, 10% e 20% (m/v). Quanto ao molde, os insertos suspensos sem as membranas de tereftalato de polietileno foram considerados satisfatórios para a preparação das membranas. A caracterização por MEV das membranas apresentou, em todas as concentrações testadas do PLGA, superfícies sem rugosidades, relacionadas à hidrofobicidade do copolímero. A combinação com MECC resultou em abertura discreta de poros, apresentando superfície com maior rugosidade e complexidade, o que não foi observado nas membranas combinadas com Col. **Conclusão:** A membrana elaborada com PLGA 10% com adição de MECC apresentou os melhores resultados nos testes realizados, sendo selecionada como a membrana padrão para os testes futuros.

Palavras-chave: Copolímero sintético. Degeneração macular relacionada à idade. Microscopia eletrônica de varredura. Retina.

Órgãos de fomento ou financiadores: CNPq, FINEP, CAPES.



53 | ENSAIO IN-VITRO PARA DETECÇÃO DE PIROGÊNIOS: ALTERNATIVA AO USO DE ANIMAIS EM CONTROLE DE QUALIDADE

Milena C. S. MAGALHÃES¹, Weriton B. ALMEIDA¹, Sérgio CALDAS¹, Rita F. L. RIBEIRO¹, Víctor Hugo M. MONTEIRO¹

¹ Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

Introdução: O Teste de Pirogênio em Coelhos (TPC) é um método empregado no controle de qualidade de produtos injetáveis, o qual se baseia na mensuração da variação da temperatura corporal de coelhos. Contudo, a substituição de métodos *in vivo* por métodos *in vitro* é um princípio ético e preconizado na legislação brasileira. O teste de endotoxinas bacterianas (LAL) é uma alternativa para detecção de pirogênios, entretanto, apresenta interferências quando utilizado em produtos biológicos, como soros hiperimunes e vacinas. Por outro lado, o Teste de Ativação de Monócitos (MAT, do inglês Monocyte Activation Test), por ELISA, é um método alternativo capaz de substituir o TPC3 no controle de qualidade desses produtos. Entretanto, o MAT-ELISA é uma técnica demorada e de alto custo para ser utilizada na rotina do controle de qualidade. Neste sentido, o desenvolvimento de métodos alternativos capazes de substituir o TPC torna-se necessário. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), tendo em vista o uso de sangue total humano. (KAAE67896523.1.0000.9507) **Objetivos:** Padronizar parâmetros para a realização do MAT-PCR em tempo real (MAT-RT-PCR) de rápida execução e menor custo que o MAT-ELISA, visando a substituição do TPC. **Material e Métodos:** Desenho de primers e sondas (IL-1 β e RNaseP); estimulação com LPS de cultura monocítica (THP-1) e sangue total humano; análise por ELISA para doseamento de IL-1 β , a partir de kit comercial disponível; extração do RNA contido no material celular e avaliação da expressão de RNAm a partir de RT-PCR. **Conclusão:** Os resultados apresentados demonstram que o teste de MAT-qPCR em desenvolvimento se mostra promissor para o avanço dos estudos em direção à sua implementação como método substitutivo.

Palavras-chave: ELISA. Ensaio in-vitro. Métodos alternativos. Pirogênio. RT-PCR.

Órgãos de fomento ou financiadores: Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

54 | ESTABELECIMENTO DE BANCO DE LINHAGENS CELULARES APLICADAS A PESQUISA CIENTÍFICA E ENSAIOS TOXICOLÓGICOS IN VITRO

Crisciele Kuligovski¹, Anny Waloski Robert¹, Camila Azeredo¹, João Antonio de Palma Setti², Bruno Dallagiovanna¹, Alessandra Melo de Aguiar¹

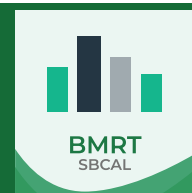
¹Instituto Carlos Chagas FIOCRUZ PR

²Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Introdução: O Instituto Carlos Chagas (ICC) é a unidade técnico-científica da FIOCRUZ que desenvolve pesquisa biomédica no Paraná. Dentre os diversos projetos de pesquisa e ensaios experimentais destacam-se aqueles que avaliam interação parasita-hospedeiro, produção de biomoléculas, ensaios de citotoxicidade, diferenciação de células-tronco, entre outros. Todas essas grandes áreas de conhecimento têm em comum o uso de cultivos celulares entre seus modelos de estudo. Considerando a necessidade de padronizar os procedimentos relacionados à manipulação e controle de qualidade das culturas celulares, a rastreabilidade do material biológico para os projetos de pesquisa ou de prestação de serviços e desenvolvimento tecnológico, a implementação de um sistema centralizado de banco de células no ICC-FIOCRUZ/PR ganha destaque. **Objetivos:** Implementar um Banco de Linhagens Celulares e um laboratório multiusuário de cultivo de células no ICC-FIOCRUZ/PR seguindo um sistema de gestão e controle de qualidade. **Material e Métodos:** Foram aplicadas a ferramentas de gestão 5W2H e sistema 5S para fazer o diagnóstico inicial da estrutura e organização laboratorial e definir escopo de documentos e metodologias a serem implantadas. De acordo com a demanda, foram adquiridas linhagens celulares para estabelecimento dos Bancos de células Mestre (BM) e de trabalho (BT). Todas as linhagens foram submetidas a ensaios de controle de qualidade, de viabilidade celular e detecção de micoplasma pela Reação da Cadeia da Polimerase e por um kit comercial. **Resultados:** As metodologias 5W2H e 5S auxiliaram na organização do espaço laboratorial, na criação de rotinas e na priorização de atividades para estabelecimento do Banco de Células. Em 2 anos foram estabelecidos BM e BT para as linhagens celulares NHDF, V79-4, CHO K1, Balb/c 3T3, H9C2, MG63, HOS e A549. Somente células com mais de 80% de viabilidade e que não apresentaram contaminação foram armazenadas e disponibilizadas aos pesquisadores. **Conclusão:** Com esse trabalho foi possível elaborar e implementar o controle de procedimentos de qualidade registro e relatórios, entre outros documentos que garantiram a rastreabilidade e confiabilidade dos dados. Além disso, os BM e BT estabelecidos irão contribuir para o desenvolvimento das pesquisas do ICC-FIOCRUZ/PR, conferindo maior reprodutibilidade aos resultados científicos.

Palavras-chave: Banco de células; controle de qualidade; linhagens celulares; reprodutibilidade; micoplasma; boas práticas de cultivo celular.

Órgãos de fomento ou financiadores: Instituto Carlos Chagas FIOCRUZ PR.



55 | ESTEATO-CHIP: UM NOVO MODELO PARA INVESTIGAR A DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA POR MEIO DA INTEGRAÇÃO DE CULTIVOS 3D DE ADIPÓCITOS E CÉLULAS HEPÁTICAS

Thayná Mendonça AVELINO¹, Larissa Bueno TOFANI¹, Melissa Dibbern GANZERLA¹, Rafael Junior de AZEVEDO¹, Giovanna Blazutti ELIAS¹ Ana Carolina Migliorini FIGUEIRA¹

¹ Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais – CNPEM

Introdução: A epidemia global de obesidade e a crescente incidência da síndrome metabólica têm levado a um aumento na ocorrência da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). Se não tratada, a DHGNA pode evoluir para condições mais graves, como cirrose e câncer de fígado. Para entender melhor a fisiopatologia e a progressão dessa doença, pesquisadores têm se dedicado ao desenvolvimento de modelos de fígado *in vitro*. **Objetivos:** Desenvolvimento e caracterização de um modelo microfluídico composto por organoides de adipócitos representando tecido adiposo branco (WAT) e câmaras funcionais de esferoides de células hepáticas HepaRG em meio recirculante para estudar os aspectos da DHGNA. **Material e Métodos:** As células HepaRG foram cultivadas em meio Williams contendo hemissuccinato de hidrocortisona e insulina. As células-tronco mesenquimais humanas (hMSC) foram cultivadas em meio quimicamente definido. Os organoides e esferoides foram formados, com as células crescendo em moldes de agarose por 96h (HepaRG) e 48h (hMSC). Após a formação, os cultivos 3D foram dissociados do molde e diferenciados em placas repelentes com coquetel de diferenciação específico para cada tecido. Os esferoides de fígado e os organoides de WAT foram integrados em um sistema microfluídico no chip HUMIMIC chip2 (TissUse). Todos os cultivos foram perfundidos por um meio de cultura que conectava as duas câmaras dos chips e mantidos a 37°C e 5% de CO₂, com fluxo por 48h, com os seguintes parâmetros: pressão à 300mbar, vácuo à -300mbar e frequência com que o fluxo é impulsionado à 0,5 Hz. **Resultados:** O sistema validou a influência indireta da fisiologia dos adipócitos nos hepatócitos que modelaram aspectos importantes da progressão da DHGNA, incluindo biomarcadores de resistência à insulina, sinalização diferencial de genes associados à DHGNA e aumento da esteatose induzida por meio condicionado contendo TNF- α . **Conclusão:** Demonstramos que esta plataforma pode ser usada para preencher a lacuna entre os ensaios realizados em linhagens de células ou animais e a eficácia humana de longo prazo, e podendo ser um recurso valioso para fornecer informações importantes no estudo da DHGNA.

Palavras-chave: Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA); organ-on-a-chip, fígado, metabolismo, tecido adiposo, esteatose.

Órgãos de fomento ou financiadores: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo 2022/11485-4).

56 | ESTRATÉGIA IN SILICO PARA AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE IMEDIATA DE INGREDIENTES COSMÉTICOS

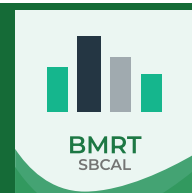
Mayara Fregonezi PALUDETTI^{1*}, Kelen Fabiola ARROTEIA¹, Cyro Hauaji ZACARIAS¹, Andréia Ávila Soares de OLIVEIRA¹, Leonardo Bruno FEDERICO¹.

¹ Natura Cosméticos, Cajamar, São Paulo, Brasil

E-mail autor correspondente: mayarapaludetti@natura.net

Introdução: Uma importante tendência global do setor cosméticos é o desenvolvimento de formulações cada vez mais sustentáveis e *eco-friendly*, a fim de reduzir e mitigar os impactos ambientais pós-consumo. A biodegradabilidade pode ser definida como um processo bioquímico em que moléculas orgânicas são decompostas pela ação de microrganismos em moléculas menores, e em dióxido de carbono, água e sais. Dependendo da extensão e do tempo necessário para a degradação do ingrediente em um dado protocolo experimental, tal substância pode receber diferentes qualificações de biodegradabilidade. A biodegradação imediata refere-se a um ingrediente para o qual se espera uma maior rapidez e facilidade para eliminação do meio ambiente. Pode ser avaliada pelos testes do protocolo OECD 301, pelo qual uma substância pode vir a ser classificada como “prontamente biodegradável”. Quando um ingrediente cosmético não apresenta dados experimentais de biodegradabilidade publicados em bancos toxicológicos, este desfecho pode ser avaliado por meio de métodos computacionais. **Objetivos:** Elaborar uma estratégia *in silico* para avaliar a biodegradabilidade imediata de ingredientes cosméticos que apresentam gaps de dados toxicológicos experimentais publicados na literatura técnica. **Material e Métodos:** Os modelos *in silico* baseados em alertas estruturais utilizados foram o START, disponível no software Toxtree, e o *Ready Biodegradation model no software VEGA*. Os modelos de Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) utilizados foram Biodegradation Probability Program (BIOWIN) 1-7, Case Ultra model, Leadscope model e SciQSAR model, disponíveis no software QSAR Toolbox. A análise por read-across pode ser executada no software QSAR Toolbox, acessando bancos com dados experimentais para identificação de compostos similares. **Resultados:** Os compostos *isopropyl stearate* e *polyglyceryl-2 caprate* são exemplos de estudo de caso presentes no banco de dados Natura que puderam ser classificados como prontamente biodegradáveis por meio do racional *in silico* proposto. Para avaliação por read-across foram consideradas: (1) similaridade estrutural, (2) similaridade de valores de propriedades físico-químicas, as quais influenciam no particionamento da substância no meio ambiente, e (3) similaridade de resultados obtidos com os modelos BIOWIN. **Conclusão:** O racional proposto pode ser utilizado para atribuir uma classificação de biodegradabilidade à substâncias sem dados experimentais, trazendo robustez na avaliação de segurança ambiental.

Palavras-chave: Biodegradabilidade, Inteligência Artificial, Segurança de Cosméticos.



57 | ESTUDO DE TOXICIDADE COMPARATIVA ENTRE BPA E BPS APÓS EXPOSIÇÃO ORAL E TÓPICA EM SISTEMAS MICROFISIOLÓGICOS

Melissa Dibbernn GANZERLA^{1*}, Nathalia de Carvalho INDOLFO², Maiara Ferreira TERRA¹, Tábata Renée DORATIOTO², Thayná Avelino MENDONÇA¹, Larissa Cleres Moreira OLIVEIRA¹, Larissa Bueno TOFANI¹, Kelen Fabíola Arrosteia², Ana Carolina Migliorini FIGUEIRA¹.

¹ Laboratório Nacional de Biociências, Campinas, São Paulo, Brasil

² Natura Cosméticos, Cajamar, São Paulo, Brasil

E-mail autor correspondente: medibbernn@gmail.com

Introdução: A padronização, disponibilização e difusão de métodos alternativos ao uso de animais de laboratório é urgente no contexto nacional e mundial. No processo de desenvolvimentos de novos compostos e moléculas desenvolver modelos com uma maior capacidade de prever e avaliar a eficácia, e que identifiquem de forma precoce as adversidades, reduzindo assim tempo e custo no processo de descoberta é vital. Essas demandas em agilizar o processo, reduzir os custos no desenvolvimento de novos compostos impulsionam o desenvolvimento de testes *in vitro* como alternativas bastante viáveis e vantajosas. Os compostos de bisfenol são comumente encontrados em diversos produtos presentes no dia a dia, como em embalagens plásticas utilizadas no armazenamento de alimentos e água, em embalagens de produtos infantis, como fórmula e mamadeiras. Apesar de estar presente no cotidiano, os bisfenóis são conhecidos como disruptores endócrinos, atuando no sistema endócrino dos seres humanos, mimetizando os hormônios naturais e estão associados a alterações na função reprodutiva. **Objetivos:** Neste estudo propomos uma junção de três diferentes culturas 3D (pele, intestino e fígado) em um dispositivo microfluídico para verificar a administração tópica e oral de Bisfenol A (BPA) e Bisfenol S (BPS). Após o tratamento, avaliamos toxicidade sistêmica, disrupção endócrina e carcinogênese por transcriptômica. **Material e Métodos:** Modelos de equivalente de pele humana, equivalente de barreira intestinal e esferoides hepáticos, foram desenvolvidos e caracterizados histologicamente, morfológicamente e funcionalmente. Essas culturas 3D foram integradas ao dispositivo microfluídico Chip3plus (TissUse GmbH) e os compostos BPA e BPS foram administrados oral e topicamente nos modelos. **Conclusão:** Nossos modelos de culturas 3D demonstraram viabilidade, funcionalidade, simulando as funções primordiais dos órgãos. A exposição ao BPA resultou na absorção do composto, causando lesões hepáticas e modulações gênicas nas vias endócrinas, vias de toxicidade sistêmica e carcinogênese, conforme esperado. Intrigantemente, o BPS, considerado um substituto seguro do BPA, também induziu toxicidade hepática e modulação gênica das mesmas vias. Esses resultados ressaltam a importância do desenvolvimento contínuo da tecnologia como uma ferramenta confiável e promissora para avaliação de toxicidade de compostos.

Palavras-chave: Sistemas microfisiológicos. Toxicidade sistêmica. Disrupção endócrina. BPA e BPS.

Órgãos de fomento ou financiadores: Empresa Brasileira de Pesquisa e Inovação Industrial (Embrapii).

58 | ESTUDO DE TOXICIDADE REPRODUTIVA COM ZEBRAFISH

Luiza AGGIO^{1,4}, Paloma Vitória Lima PEIXOTO^{2,4}, Cristina VIRIATO^{3,4}, Lílian Cristina PEREIRA^{1,4}

¹Faculdade de Ciências Agrônômicas, ² Faculdade de Medicina de Botucatu, ³ Instituto de Biociências, ⁴ Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a Saúde Humana (TOXICAM)

E-mail autor correspondente: luiza.aggio@unesp.br

Introdução: O herbicida Diuron (biologicamente ativo) é utilizado para controlar plantas infestantes em diversas culturas. Contudo, é considerado contaminante ambiental de preocupação emergente. Para análises toxicológicas voltadas para a saúde única, o Zebrafish (*Danio rerio*), tem sido amplamente utilizado já que possui o genoma sequenciado, tendo a similaridade genética de 71%; fisiologia e metabolismo semelhante ao humano. Neste contexto, o presente modelo tem se destacado como ferramenta experimental para redução do número de animais experimentais e substituição de organismos adultos vertebrados para diferentes *endpoints* toxicológicos. **Objetivos:** Assim, o trabalho objetivou avaliar a toxicidade reprodutiva do Diuron e sua influência na prole utilizando o Zebrafish. **Material e Métodos:** Foi utilizado o Diuron (0,5 - 10µM) e controle negativo (água ISO). A exposição dos peixes adultos baseou-se na OECD N^o229, semi-estática e subcrônica (21 dias). Ao final foi realizado acasalamentos em diferentes condições, a fim de obter os efeitos quando em exposição materna, paterna e co-parental. Observou-se a quantidade e a qualidade dos embriões na geração F1, sendo 20 ovos selecionados aleatoriamente para a observação do desenvolvimento morfofisiológico até 144 hpf, conforme a OECD N^o 236, e os *endpoints* de Nagel. **Resultados:** Foi observado redução na quantidade de embriões obtidos nos acasalamentos, com exceção ao da concentração de 5 µM (condição materna) que apresentou maior quantidade de embriões, mas taxa de fecundação inferior a 70%. Na prole, a não eclosão da larva, um efeito letal, apresentou significância na concentração de 10µM, na condição co-parental. Os efeitos subletais encontrados foram edema de pericárdio e edema de saco vitelínico; sendo o edema de saco vitelínico o mais frequente nas concentrações de 5 e 10 µM. Também foi observado a não-inflação da bexiga natatória em todas as condições experimentais, com destaque para a prole da exposição materna e co-parental (10 µM) observados em 144 hpf. **Conclusão:** Em conjunto, os resultados permitem concluir que o Zebrafish foi um bom modelo alternativo para avaliação de toxicidade reprodutiva. Diuron afetou a capacidade reprodutiva dos peixes adultos, causando efeitos letais e subletais de desenvolvimento na prole.

Palavras-chave: Diuron. Toxicidade reprodutiva. Toxicidade de desenvolvimento. Efeitos na prole.

Órgãos de fomento: Pró-Reitoria de Pesquisa da UNESP, FAPESP e CNPq.



59 | EVALUATION OF THE EFFECTS OF FLAME-RETARDANTS ON DENTAL STEM CELLS

Leandro Leal Rocha de OLIVEIRA¹, Lauren Dalat de Sousa COELHO¹, Aliny Pereira de LIMA¹, Lucas Canêdo de OLIVEIRA¹, Jacqueline Alves LEITE² and Marize Campos VALADARES¹.

¹ Laboratório de Ensino e Pesquisa em Toxicologia *In vitro* (ToxIn), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil.

² Laboratório de Ensino, Pesquisa e Extensão em Neurociências Aplicadas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil.

E-mail autor correspondente: medibbernn@gmail.com

Introduction: There are over 200 categories of flame-retardants sorted by the predominant chemical components of the formulation; they are used to reduce the spread of flame on surfaces. These substances can also damage neural development and seems to be related to Spectrum Autism Disorder. Dental stem cells have been used to develop *in vitro* methods to study toxicity of the neuronal development. **Objective:** In this work, we used human dental stem cells to investigate the effects of flame-retardants on the expression of the neuronal biomarker Nestin. **Methods:** Dental stem cells were isolated, cultured and characterized (Ethical protocol: #44067021.0.00005083). The cells were cultured in 12 wells-plate with 100.000 cells/well overnight at 37°C, CO₂ 5%. After that, the cells were exposed to the testing compounds: Tributyl Phosphate and Butoxyethyl with concentration of 10µg/mL, 31.6µg/mL, 40 µg/mL to determine the IC₅₀, that was 80% and 80%, respectively. The cells were then exposed to 10 µg/mL, 31.6µg/mL, 40µg/mL, and the expression of Nestin was evaluated by flow cytometry. Results: Our results demonstrated that the exposure to dental stem cells to flame retardant reduces the expression of Nestin. Tributyl Phosphate decreased 50%, 45% and 50% in concentrations of 10µg/mL, 31.6µg/mL, 40 µg/mL, respectively. While, Buxyoethyl decreased 65 %, 47%, 60% in concentrations of 10µg/mL, 31.6 µg/mL, 40 µg/mL respectively of the Nestin expression after exposure. Conclusion: Our data support the potential use of dental stem cells for the development of neural microtissues to be used for modeling drug discovery for neuropsychiatric and neurodegenerative diseases.

Key words: Dental stem cells. Flame retardant. Autism. Flow cytometry.

Financial support: FAPEG, CAPES and CNPq.

60 | EYE DAMAGE REVERSIBILITY IN AN IN VITRO MODEL OF BOVINE CORNEA TO REPLACE THE DRAIZE TEST COMPLETELY.

Martina BENEDETTI^{1,2}, Mariela LENZE^{1,2}, Julieta ROCO^{1,2}, Romina MARTINEZ³, Maria Laura GUTIERREZ^{1,2}

¹ CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina)

² Instituto de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina

³ Hospital Dr Julio Méndez, Buenos Aires, Argentina

Introdução: One of the requirements for the registration of substances such as agrochemicals is to provide evidence about their potential eye damage. The Draize test performed in rabbits allows the products to be classified into four categories, considering both the severity of the lesions produced in the animal's eye as well as its healing time. The available alternative methods to this live animal test do not allow documenting the damage reversibility, nor the time necessary for such reversibility to occur, as required by the UN GHS classifications. **Objetivos:** Our proposal is to complement the *in vitro* model that uses the bovine cornea as a substrate to predict whether a substance is irritating or non-irritating (BCOP), with a strategy that allows predicting if the observed irritation is reversible and the time it takes to revert. This is necessary to finally replace the Draize test completely. **Material e Métodos:** Limbal stem cells are known to play an important repairing role in corneal injury; therefore we isolated these cells from bovine cornea and used them to evaluate the cell sensitivity to reference products. A wound healing assay was also performed to study whether these products differentially affect the replication and migration capacity of the cells. Furthermore, a tissue explant and an organotypic cornea culture model were implemented to study if the chemical exposure alters cell's replication, migration and overall wound healing differentially. **Conclusão:** In conclusion, a combination of the approaches used seem to be effective to detect the four categories of GHS reference products

Palavras-chave: BCOP, STEM CELLS, ALTERNATIVE METHODS.

Órgãos de fomento ou financiadores: National Council of Science of Argentina and Ministry of Science of Argentina.



61 | GENOTOXICITY AND CYTOTOXICITY OF SILVER LAWSONATE APPLYING IN SILICO, IN VITRO AND 3D CULTURE METHODS

Bárbara Verena Dias GALVÃO¹; Letícia Mota Candal de MATOS¹; Alana da Cunha GOLDSTEIN¹; Raissa Miranda SCHARF¹; Luana Pereira BORBA-SANTOS²; Caroline Deckmann NICOLETTI³; Patrícia Garcia FERREIRA³; Fernando de Carvalho da SILVA⁴; Vitor Francisco FERREIRA³; Debora Omena FUTURO³; Sonia ROZENTAL²; Carlos Fernando ARAUJO-LIMA^{1,5}; Israel FELZENSZWALB¹

¹ Laboratório de Mutagênese Ambiental, Departamento de Biofísica e Biometria, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ; ² Laboratório de Biologia Celular de Fungos, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; ³ Departamento de Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ; ⁴ Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil; ⁵ Departamento de Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

E-mail autor correspondente: galvao.barbara@posgraduacao.uerj.br

Introduction: Sporotrichosis is the most frequent subcutaneous mycosis in Latin America, caused by fungus of the genus *Sporothrix*. As a neglected disease, treatment options are restricted and compromised by high cost, side effects and resistance. We previously synthesized 1,4-naphthoquinone derivatives and identified a silver lawsonate (SL) able to inhibit *S. brasiliensis* and *S. schenckii* growth and biofilm formation, although its toxicity remains unclear. **Objectives:** we aimed to investigate SL pharmacokinetics, genotoxicity and differential cytotoxicity through *in silico* and *in vitro* studies. **Materials and Methods:** Pharmacokinetics and toxicity were predicted on pkCSM and SwissADME platforms. Mutagenicity was assessed by the Ames Test on five *Salmonella Typhimurium* strains (TA1535, TA97a, TA98, TA100, TA102). Genotoxicity was evaluated by *in vitro* micronucleus assay in HepG2 cells. Hepatocytotoxicity was assessed on F C3H and HepG2 monolayer (2D) cultures by WST-1 and LDH assays. 2D and three-dimensions (3D) cytotoxicity was compared using BALB/3T3 fibroblasts spheroids based on alginate scaffolds. **Results:** *In silico* analyses suggested a good drug-likeness, lead-likeness and bioavailability profile. Furthermore, SL was considered permeable to the blood-brain barrier, indicating possible applications in brain fungal infections. SL was predicted to be a CYP1A2 inhibitor, related to potential drug interactions, although in terms of toxicity, SL was not predicted to be hepatotoxic, cardiotoxic, or mutagenic. Confirming the predictions, SL was not mutagenic in the Ames test, however, it induced a significant increase in micronucleus and nuclear buds formation at higher concentrations ($\geq 50 \mu\text{M}$). In both types of cell death assays, SL induced greater toxicity in BALB/3T3 cells cultured in 2D than in 3D. At 48 h, 2D half-maximal cytotoxic concentration (CC50) was $8.9 \mu\text{M}$ for WST-1 and $12.9 \mu\text{M}$ for LDH, while 3D CC50 reached $2,019 \mu\text{M}$ for WST-1 and $> 5,000 \mu\text{M}$ for LDH. At 48 h F C3H CC50 was $53.9 \mu\text{M}$ for WST-1 and $86.8 \mu\text{M}$ for LDH, while HepG2 CC50 was $507.6 \mu\text{M}$ for WST-1 and $1,115 \mu\text{M}$ for LDH. **Conclusion:** Our data corroborate previous evidence of clastogenicity of naphthoquinones, and indicated 3D culture as a promising and affordable model for investigating the cytotoxicity of novel antifungals.

Key words: 1,4-Naphthoquinone. 3D cell culture. DNA damage. Lawsonia. Sporotrichosis.

Financial support: CAPES; CNPq; FAPERJ.

62 | GERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ORGANOIDES CORTICAIS A PARTIR DE hiPSCs DERIVADAS DA POLPA DENTAL

André Luíz TELES E SILVA^{1,*} & Bruno Yukio YOKOTA-MORENO^{1,*}, Mariana Silva BRANQUINHO¹, Geisa Rodrigues SALLES², Thiago Cattuzo de SOUZA¹, Ronald Almeida de CARVALHO⁴, Gabriel BATISTA⁴, Karina GRIESI-OLIVEIRA¹, Maria Rita PASSOS BUENO³, Marimélia Aparecida PORCIONATTO², Roberto Hirochi HERAI⁴, Lionel Fernel Gamarra CONTRERAS¹, Andrea Laurato SERTIÉ¹

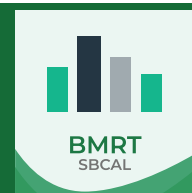
¹Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brasil; ²Departamento de Bioquímica, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil; ³Centro de Estudos do Genoma Humano e Células Tronco, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil; ⁴Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Escola de Medicina, Laboratório de Bioinformática e Neurogenética, Curitiba, Paraná, Brasil

E-mail autor correspondente: andrea.sertie@einstein.br

Introdução: Organoides corticais tri-dimensionais (3D) derivados de células-tronco pluripotente induzidas humanas (hiPSCs) oferecem um sistema *in vitro* poderoso para estudar o desenvolvimento e doenças do cérebro humano. Por esta razão, são considerados potenciais modelos biológicos substitutos do uso de animais em experimentos científicos voltados à área da neurociência. Apesar disso, limitações no emprego dos organoides persistem, incluindo altos custos, variabilidade, obtenção invasiva de hiPSCs, e carência de metodologias para análise da estrutura 3D e da conectividade neuronal dos organoides. **Objetivos:** Os objetivos deste projeto foram verificar se hiPSCs derivadas de células-tronco da polpa de dentes decíduos humanos (SHEDs), as quais podem ser obtidas de forma completamente não-invasiva, são capazes de gerar organoides corticais estruturados, e se metodologias inovadoras, como bioimpressão 3D, ressonância magnética e matrizes de microelétrodos (MEA) fornecem dados sobre a estrutura 3D e o funcionamento elétrico dos organoides inteiros. **Materiais e Métodos:** Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein. Por meio de um protocolo custo-efetivo e reprodutível, os organoides corticais foram gerados a partir de hiPSCs obtidas pela reprogramação de SHEDs, e caracterizados por imunocitoquímica bidimensional (2D), assim como pela bioimpressão, ressonância magnética, e MEA em organoides inteiros. **Resultados:** Observamos que os organoides corticais gerados recapitulam aspectos-chave da corticogênese humana, tais como a organização polarizada de zonas germinativas de células progenitoras neurais com a presença de células-tronco da glia radial externa, e a diferenciação de neurônios corticais de camadas superficiais e profundas, bem como células gliais. Demonstramos também, pela primeira vez, que a bioimpressão 3D e a ressonância magnética são abordagens alternativas e complementares para desvendar características críticas da arquitetura 3D dos organoides inteiros em estágios iniciais de desenvolvimento. Por fim, registros elétricos extracelulares em organoides inteiros demonstraram redes neuronais funcionais. **Conclusão:** Nossos achados sugerem que os organoides corticais derivados de SHEDs constituem um modelo atrativo para o estudo do neurodesenvolvimento humano, e sustentam a ideia de que a combinação de técnicas 2D e 3D para analisar a estrutura e função dos organoides pode auxiliar a aprimorar esta tecnologia promissora e a diminuição do uso de animais de experimentação

Palavras-chave: Células-tronco pluripotentes induzidas; Bioimpressão 3D; Organoides cerebrais; Ressonância magnética, MEA.

Órgãos de fomento ou financiadores: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Fundação de Amparo às Pesquisas do Estado de São Paulo (FAPESP).



63 | IMPLEMENTAÇÃO DE ALTERNATIVA MÉTODOS NA ARGENTINA PARA AVALIAR IRRITAÇÃO CUTÂNEA E OCULAR DE PRODUTOS COSMÉTICOS

Germán Polizzi¹, Mariano Nigro¹, Esteban Preux¹, Leandro Subiaga¹, Fiorella Panichelli¹, Rodrigo De Vecchi², Pablo Quiroga¹ and María Laura Gutiérrez^{3,4}

¹ Laboratorios Bagó SA, Argentina;

² EPISKIN Brasil Biotecnología, Río de Janeiro, Brasil;

³ CONICET, Argentina; ⁴Instituto de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina

Introduction: A implementação de métodos alternativos na Argentina é um novo desafio. Embora atualmente não existam leis que restrinjam ou proibam o uso de animais para avaliação de produtos cosméticos na Argentina, por questões éticas, de demanda social e para acompanhar os avanços globais, é necessário trabalhar na implementação de metodologias sem animais. Por esta razão, os Laboratórios Bagó SA decidiram apostar na implementação de testes *in vitro*. Optou-se por iniciar com dois testes para avaliar o potencial de irritação ocular: STE (Short Time Exposure – OECD TG 491) e HET-CAM (teste de membrana corioalantóica de ovo de galinha); e um ensaio para avaliação de irritação cutânea: SkinEthic™ OECD Test Guideline 439. Numa primeira etapa, foram realizados testes de proficiência com produtos químicos recomendados pelas diretrizes. Uma vez demonstrada a competência metodológica, uma série de testes foi realizada. Avaliamos 48 produtos da HET-CAM, 15 produtos da STE e 8 produtos da SkinEthic. Entre os produtos testados estavam cremes antissépticos e cicatrizantes; protetores solares em spray, creme e emulsão; cremes hidratantes; linha de produtos para cabelos (shampoos e condicionadores); cremes faciais e corporais; soro facial e matérias-primas e ingredientes. A implementação da metodologia foi realizada com sucesso, não sendo realizados mais testes em animais para avaliação de irritação cutânea e ocular no laboratório Bagó. Atualmente estamos trabalhando na implementação de uma abordagem *in vitro* para avaliação da sensibilização cutânea para substituir definitivamente o uso de animais na avaliação de produtos cosméticos.

Palavras-chave: Treinamento. Argentina. Implementação. Epiderme Humana Reconstruída.

Órgãos de fomento ou financiadores: CONICET - Conselho Nacional de Pesquisas Científicas e Técnicas, Argentina. Bagó Laboratórios.

64 | INFLUÊNCIA DO ÓLEO DE COPAÍBA NA FRAGMENTAÇÃO DE DNA E CICLO CELULAR DE CÉLULAS MURINAS

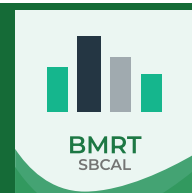
Nathalia Stephanie Oliveira NASCIMENTO¹, Maria Eduarda Souza Leite AMORIM¹, Jonas Pereira RAMOS¹, Barbára Moreira AMARAL¹, Larissa Camila Ribeiro de SOUZA¹, Brenner Cunha CARVALHO¹, Anne Josiele de Lima VITAL¹, Carlos A. TAGLIATI¹

¹ Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais

Introdução: O óleo de copaíba (*Copaifera ssp.*) e seus derivados são amplamente utilizados mundialmente. No entanto, estudos sobre sua segurança são controversos e limitados, principalmente em relação à toxicidade genética. Esse fator reafirma a importância de pesquisas sobre a influência da copaíba no ciclo celular e no material genético da célula, já que fragmentações de DNA podem indicar eventos genotóxicos e até mesmo apoptose. **Objetivos:** O presente estudo teve como objetivo avaliar a segurança genética de duas amostras: óleo de copaíba 10% (oil) e hidrogel polimérico à base do óleo resina (Hgel). **Material e Métodos:** Foram utilizadas células V79-4 devido à sua estabilidade genética. Também se avaliou a influência dos metabólitos hepáticos utilizando 20% de ativação metabólica exógena (mix S9). Foram testadas concentrações das amostras (33; 16.5 e 4.13 µg/mL) em placas de 6 poços com 1 x 10⁶ células por poço, as quais foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após a incubação, as células foram transferidas para tubos Falcon, submetidas à centrifugação e tratadas com uma solução fluorocrômica hipotônica contendo Iodeto de Propídio e Triton X-100. As placas foram então incubadas a 4-8 °C e, posteriormente, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo. Os resultados foram obtidos com ajustes de tensão e parâmetros de FL2 e foram analisados no programa FlowJo 10.8®. **Conclusão:** Os resultados revelaram a ocorrência de fragmentação do DNA nas amostras com ativação metabólica, especificamente nas concentrações de 33 µg/L e 4.13 µg/L. Além disso, observamos uma alteração significativa no ciclo celular da linhagem V79-4, causando redução na porcentagem de célula na fase S na concentração de 33 µg/L com ativação metabólica. A diminuição na quantidade de células nessa fase é de grande importância, pois ela desempenha um papel crucial na divisão celular e na preservação da estabilidade do DNA. Esse efeito indica uma possível genotoxicidade ou apoptose, sendo necessário estudos adicionais como o ensaio de Anexina e Iodeto de propídeo, para investigar se há necrose ou apoptose. Os resultados obtidos são de extrema relevância devido o amplo uso desse produto pela população.

Palavras-chave: Copaíba, Citometria de fluxo, Fragmentação de DNA, Genotoxicidade, Linhagem Celular, Teste *in vitro*.

Órgãos de fomento ou financiadores: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)



65 | INTERACTION NETWORK AS A TOOL FOR BIOMARKER DISCOVERY IN NEPHROTOXICITY

Larissa Camila Ribeiro de SOUZA (1)*, João Paulo Ataíde MARTINS (1), Héilton Martins Reis FILHO (1), Anne Josiele de Lima VITAL (1), Jonas Pereira RAMOS (1), Brenner Cunha CARVALHO (1), Nathalia Stephanie Oliveira NASCIMENTO (1), Bárbara Moreira AMARAL (1), Maria Eduarda Souza Leite AMORIM (1), Olívia Maria Drummond Pires AVIDAGO (1), Ana Maria WAAGA-GASSER (2), Carlos Alberto TAGLIATI (1)

*Federal University of Minas Gerais (UFMG), ²Harvard Medical School

Introduction: A drug-induced nephrotoxicity is a worldwide concern, leading to mortality and morbidity. The adverse effects of drugs on kidney function, known as nephrotoxicity, are particularly worrisome because the kidneys play a critical role in drug elimination. Traditional biomarkers for nephrotoxicity exhibit late detection, emphasizing the need for early biomarkers capable of identifying potential injury or renal failure before substantial damage occurs. Alternative methods to animal research can be an advancement in biomarker discovery. In this regard, leveraging computational tools and big data can significantly enhance the identification of novel biomarkers. **Objectives:** To build interaction networks to integrate computational tools as an alternative to animal use in biomarker discovery. Integrating diverse biological data holds substantial value as it allows for the establishment of connections, such as interaction networks, facilitating a deeper understanding of underlying pathways and the prediction of potential nephrotoxicity biomarkers. **Methods:** Computational search in BioSNAP, followed by data curation and interaction network construction using Python was applied. **Results:** The interaction networks were executed by integrating drug-gene and drug-side effect data sourced from BioSNAP. Computational analysis used Python within the Jupyter notebook interface. Subsequently, the generation of network visualizations was achieved using the Visdcc library, coupled with interactive visualization through Dash. The interaction networks were filtered and analyzed based on the findings, leading to the selection of specific markers for further investigations. The interaction networks revealed interesting new observations, with promising markers and pathways related to drug-induced nephrotoxicity. Also, some drugs discovered in our network can change some point of views in this field. **Conclusion:** This study sheds a spotlight on the untapped potential of computational methodologies and the integration of big data in the early detection and prediction of drug-induced nephrotoxicity. This newfound approach holds the promise of catalyzing the development of more effective monitoring and prevention strategies, thus marking a transformative leap forward in the field of nephrotoxicity research.

Key words: Alternative methods. Biomarkers. New technologies. Renal toxicity. Interaction network.

Funding: Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), CAPES/PrInt Program, and Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG (PRPq/UFMG).

66 | LEGISLAÇÃO E NORMATIVAS QUE IMPLEMENTAM E REGULAMENTAM A UTILIZAÇÃO DE MÉTODOS ALTERNATIVOS NO BRASIL

Raissa Paula Araújo ALVES¹

¹ Universidade Federal do Delta do Parnaíba

E-mail autor correspondente: raissa@ufpi.edu.br

Introdução: Métodos alternativos ao uso de animais são métodos que podem ser utilizados para substituir, reduzir ou refinar o uso desses na pesquisa ou ensino. **Objetivo:** Compilar as legislações que regulam o assunto no Brasil, proporcionando uma compreensão completa e organizada ao leitor. **Material e Métodos:** Por meio da disponibilização das informações em sites de domínio público, sobre a legislação que trata do assunto, foi possível compilar que o marco inicial foi com a Lei nº 11.794/2008 (Lei Arouca), que estabelece ao Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) reconhecer os métodos alternativos aplicados ao uso de animais. O CONCEA mantém uma Câmara Permanente de Métodos Alternativos ao uso de Animais, estabelecendo diretrizes à implantação desses métodos. A Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA), implementa essas diretrizes regulatórias e implanta os métodos alternativos já validados pelo Centro Brasileiro para validação de Métodos Alternativos (BRACVAM). As Resoluções Normativas (RN) do CONCEA que abordam sobre o tema são as de nº 17, que estabelece os critérios para o reconhecimento dos métodos alternativos, a de nº 18¹, nº 31² e nº 45³ relacionam os métodos validados no Brasil, sendo eles: Avaliação do potencial de sensibilização, de irritação e corrosão da pele (Métodos OECD DT 430¹, 431¹, 435¹, 439¹, 429¹, 442A¹, 442B¹, 442C², 442D²); Potencial de irritação e corrosão ocular (Métodos OECD DT 437¹, 438¹, 460¹, 491² e 492²); Potencial de fototoxicidade (Método OECD DT 432¹); Absorção cutânea (Método OECD DT 428¹); Toxicidade Aguda (Métodos OECD DT 129¹, 420¹, 423¹ e 425¹); Genotoxicidade (Método OECD DT 487¹); Toxicidade reprodutiva (Métodos OECD DT 421² e 422²); Contaminação pirogênica em produtos injetáveis²; Ativação de Monócitos para avaliação da contaminação pirogênica em produtos injetáveis³. A Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RDC nº 35, dispõe sobre a aceitação dos métodos alternativos reconhecidos pelo CONCEA. A RN 54 do CONCEA, trata do reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em atividades de ensino e pesquisa científica e dá outras providências. **Conclusão:** O Brasil possui normativas que norteiam e orientam para a substituição efetiva de animais, com técnicas eficazes, contribuindo para a redução significativa do uso de animais.

Palavras-chave: 3Rs, Métodos alternativos, Uso de animal.



67 | MACHINE LEARNING TOOLS FOR THE ASSESSMENT OF STEATOTIC CHEMICAL-MEDIATED HEPATOCELLULAR TRIGLYCERIDE ACCUMULATION

William J. Zamora^{*1,2,3}, Edwin León^{*2}, Antonio Piedra³, Freddy Arias², Jeniffer Sandi², Silvana Pinheiro^{*1,2}

¹Cbio3 Laboratory, School of Chemistry, University of Costa Rica, San Pedro, San José, Costa Rica; ²Laboratory of Computational Toxicology and Artificial Intelligence (LaToxCIA), Biological Testing Laboratory (LEBi), University of Costa Rica, San Pedro, San José, Costa Rica; ³Advanced Computing Lab (CNCA), National High Technology Center (CeNAT), Pavas, San José, Costa Rica

E-mail autor correspondente: william.zamoraramirez@ucr.ac.cr; silvana.desouza@ucr.ac.cr; edwin.leon@ucr.ac.cr

Introduction: Nonalcoholic hepatic steatosis, also known as nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), is one of the most common causes of chronic liver disease in the developed world and primarily affects men. Hepatic steatosis occurs when intrahepatic fat is $\geq 5\%$ of liver weight and is considered a consequence of the hepatic manifestation of metabolic syndrome and is associated with type 2 diabetes mellitus, obesity, and dyslipidemia. The main causes are diet, sedentary lifestyle, and chemical exposure to endocrine-disrupting chemicals (EDCs) such as pesticides, plasticizers, metals, and perfluorinated compounds present in the environment. Up to now, animal models have significant limitations in reproducing the disease, so a computational model could significantly reduce the use of animals to determine the effects of various substances. From a molecular point of view, EDCs can trigger the xenobiotic activation of the pregnane-X-receptor (PXR) which is recognized as an adverse outcome pathway (AOP) for liver steatosis leading to hepatocellular triglyceride accumulation. Although there is strong evidence that PXR activation occurs primarily in the presence of mixtures of EDCs, some compounds can do so individually at concentrations as low as 3 mM. Accordingly, these EDCs should be of greater concern, and their early identification could be of great benefit in protecting global health. **Objectives:** This work aims to apply international and European regulatory criteria for the assessment of bioaccumulation of chemicals based on octanol/water (logP) and octanol/air (logK_{oa}) partition coefficients in the classification of steatotic xenobiotics that produce chemical-mediated hepatocellular triglyceride accumulation individually at low concentrations. For this purpose, machine learning tools will be developed for logP and logK_{oa} prediction of eight EDCs of which two of them show pregnane-X receptor activation at 3 mM concentrations. **Materials and Methods:** A set of 14041 and 475 experimental values of logP and logK_{oa}, respectively were compiled from previous works. All compounds were stored using their SMILES codes which were used to determine CDK and RDKit descriptors. Four feature selection methods were employed: Univariate Feature Selection (UFS), Recursive Feature Elimination (RFE), Sequential Feature Selection (SFS), and SHAP. Then, four different machine learning models were evaluated: Multiple Linear Regression (MLR), Random Forest (RF), Support Vector Machine (SVM), and XGBoost. Finally, the models were used to predict the logP and logK_{oa} for eight EDCs (amiodarone, benzoic acid, cyproconazole, flusilazole, imazalil, prochloraz, propiconazole and tebuconazole). **Conclusions:** Our machine learning metrics were able to rank the two steatotic xenobiotics that produced PXR activation at low concentrations (logP > 4 and logK_{oa} > 10) out of the 8 total of EDCs.

Key words: Machine Learning, Endocrine-disrupting Chemicals, Steatosis, Hepatotoxicity, Pregnane-X-Receptor.

68 | MAPEANDO O USO DE ANIMAIS EM ESTUDOS BASEADOS EM hiPSCs NA PESQUISA DO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

Bruno Yukio YOKOTA-MORENO^{1,2*}, André Luiz TELES E SILVA¹, Isabella de Sousa NÓBREGA¹, Lucas Barbosa ROSSETTI¹, Claudia Madalena Cabrera MORI², Paulo César MAIORKA², Andréa Laurato SERTIÉ¹

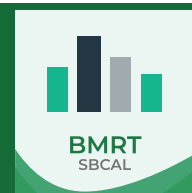
¹Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brasil; ²Departamento de patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

E-mail autor correspondente: bruno.yokota@alumni.usp.br

Introdução: O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é caracterizado pela deficiência na comunicação e interação social e interesses restritos e estereotipados. Estima-se que a prevalência global do TEA seja 1-2%. Nos últimos anos, diferentes modelos animais genéticos e não genéticos foram desenvolvidos para melhor compreender a patogênese do TEA e descobrir novas abordagens terapêuticas. No entanto, ainda nenhum modelo animal pode capturar completamente características humanas específicas e a complexidade genética do TEA. Desta forma, estudos baseados em células-tronco pluripotentes induzidas humanas (hiPSCs) têm surgido como uma alternativa aos modelos animais na pesquisa do TEA. No entanto, apesar do potencial das hiPSCs em substituir modelos animais de TEA, muitos estudos envolvendo hiPSCs ainda utilizam animais. **Objetivos:** Mapear todas as aplicações diretas de animais em estudos envolvendo hiPSCs na pesquisa do TEA, a fim de avaliar se o seu uso é essencial e como eles interferem no conhecimento sobre o TEA. **Material e Métodos:** Nesta revisão sistemática seguimos as diretrizes do PRISMA. A busca foi realizada nas bases de dados PubMed, SCOPUS e Web of Sciences para artigos de pesquisa desenvolvidos entre 2009 e 2022 usando os termos "autism" e "autism spectrum disorder" combinados com "induced pluripotent stem cells" e "organoids". **Resultados:** Identificamos 237 artigos científicos publicados entre 2010 e 2022 que utilizaram hiPSCs para estudar o TEA. Destes, 100 artigos (42,2%) utilizaram animais ou células derivadas de animais em conjunto com experimentos envolvendo hiPSCs. Dentre estes 100 artigos, 51 utilizaram modelos animais de TEA em conjunto com células neurais derivadas de hiPSCs cultivadas em monocamada ou organoides cerebrais (3D), os quais poderiam substituir muitas das análises feitas nos animais. Nos 49 artigos restantes, roedores imunodeficientes e selvagens foram utilizados em ensaios de formação de teratoma para confirmar a pluripotência das hiPSCs ou para se obter astrócitos primários para co-cultivá-los com neurônios derivados de hiPSCs, respectivamente. Em ambos os casos, o uso de animais poderia ter sido substituído por metodologias alternativas, como o uso de corpos embriões e astrócitos derivados de hiPSCs. **Conclusão:** Nossa revisão destaca o potencial uso desnecessário de animais em experimentos baseados em hiPSCs para o estudo do TEA.

Palavras-chave: Células-tronco pluripotentes induzidas; Métodos alternativos ao uso de animais; Transtorno do espectro autista.

Órgãos de fomento ou financiadores: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).



69 | MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS NO ENSINO E TREINAMENTO DE TÉCNICAS CIRÚRGICAS NA UNICAMP

Desenir Adriano PEDRO¹, Carlos Ralph Batista LINS¹, William Adalberto SILVA², Miguel Luiz CÂNDIDO², Waldemir Benedito COSTA², Ana Tada Fonseca Brasil ANTÍORIO^{1*}

¹Comissão de Ética no Uso de Animais, Pró-Reitoria de Pesquisa, Universidade Estadual de Campinas - Unicamp, Campinas, São Paulo, Brasil; ²Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas - Unicamp, Campinas, São Paulo, Brasil.

E-mail autor correspondente: anatada@unicamp.br

Introdução: O Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea) estabelece que a utilização de animais em atividades didáticas deve objetivar o desenvolvimento de habilidades psicomotoras e competências dos discentes. Dessa maneira, o uso de animais em aulas de técnicas cirúrgicas é justificável para determinados cursos de graduação na área da saúde. Por esse motivo, as Instituições de Ensino Superior devem sempre que disponível implementar metodologias que permitam o desenvolvimento prévio de algumas técnicas cirúrgicas sem o uso de animais vivos, com a finalidade de alcançar os 3Rs. **Objetivos:** Este resumo tem como objetivo apresentar os métodos alternativos ao uso de animais utilizados nas aulas de técnica cirúrgica do curso de graduação em Medicina da Unicamp. **Material e Métodos:** No curso de Medicina são utilizados em aulas práticas e treinamentos: caixa preta simulador de videolaparoscopia; manequim para intubação orotraqueal e drenagem torácica; pele artificial e língua bovina para incisão e sutura; pé de galinha para punção intraóssea; e programa de computador para simulação realística no atendimento de urgência. Somente após a preparação prévia com os modelos alternativos, os alunos realizam o treinamento das técnicas cirúrgicas em animais vivos. Tais técnicas são realizadas no porco doméstico, que recebe os cuidados veterinários necessários para manutenção do seu bem-estar. Os alunos são supervisionados pelos docentes durante toda a prática e recebem prévia orientação sobre ética no uso de animais. **Resultados:** As alternativas proporcionam o treinamento dos discentes em técnicas básicas antes de seguir para a prática com os animais e com o atendimento de pacientes. Os docentes têm a percepção de que os alunos apresentam maior segurança e realizam os procedimentos de maneira mais refinada. Ademais, após a adoção das metodologias alternativas, o número de animais vem sendo reduzido ao longo dos anos. **Conclusão:** Os métodos alternativos empregados no curso de graduação em Medicina da Unicamp permitem substituir, reduzir e refinar o uso de animais. Futuramente, o uso dos métodos alternativos e dos animais será alvo de estudos para avaliar seu real impacto na formação dos alunos.

Palavras-chave: Animais de laboratório, Atividades didáticas, Redução, Refinamento. Substituição.

70 | MICROCHANNEL-BASED KIDNEY-ON-A-CHIP FEATURING PROXIMAL TUBULAR STRUCTURE WITH RPTEC/HUVEC CELLS

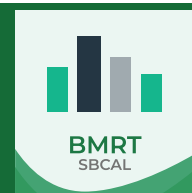
Ana Paula Pereira GUIMARAES¹, Italo Rodrigo CALORI¹, Roberta Sessa STILHANO², Antonio Claudio TEDESCO¹

¹Department of Chemistry, Center of Nanotechnology and Tissue Engineering, Photobiology and Photomedicine Research Group, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo 14040-901, Brazil; e-mail: atedesco@usp.br; ²Department of Physiological Sciences, Santa Casa de São Paulo School of Medical Sciences, São Paulo, Brazil.

Introdução: Kidneys play a vital role in waste filtration and fluid balance regulation in the human body. Traditional biomedical research often relies on animal testing to study kidney diseases and test drugs, raising ethical and animal welfare concerns. Kidney-on-a-chip systems represent a groundbreaking innovation in the field of biomedical research for animal substitution aligned with the 3R principle, offering a controlled and dynamic platform for drug testing and simulating key aspects of human renal function. **Objectives:** the research aims to develop a kidney-on-a-chip system based on microchannels within a PDMS matrix featuring a proximal tubular structure for cultivating RPTEC/HUVEC cells. This system is designed to simulate the functioning of the human kidney in a controlled laboratory environment, allowing for the study of drug toxicity and cell behavior and interactions. **Material and methods:** a microchannel was printed using Pluronic[®] on a dish, then covered with PDMS. After curing, pluronic was removed and surface was functionalized with plasma treatment (PDMS-P), included PVA (PDMS-P-P), and APTES and type-I collagen (PDMS-P+A+C). Then it was attached to a second PDMS part to form the complete chip. Cells were attached at microchannel through incubation for 30 min followed by medium flux. **Results:** surfaces revealed aggregates (SEM) and varying roughness (AFM) among PDMS samples. PDMS-P and PDMS-P-P treatments made PDMS surfaces hydrophilic, while PDMS-P-A-C exhibited an intermediate hydrophilicity. Cells showed superior adhesion in modified PDMS than to unmodified one. LIVE/DEAD assay revealed cell viability rate of nearly 100%, spanning the full length of the microchannel. Immunofluorescence imaging reveals randomized distribution of HUVEC-GFP and AQP1 staining RPTEC cells. Toxicity of Amphotericin B revealed significant difference with a more pronounced effect after 12 h incubation. **Conclusion:** the kidney-on-a-chip proposed here enabled the cultivation of RPTEC/HUVEC cells in a physiologically relevant environment. it has potential applications in biomedical research for assessing the toxicity of pharmaceutical drugs and the development of therapies related to kidney diseases and other renal disorders.

Key words: alternative model; animal substitution; drug testing; microfluidic; organ-on-a-chip.

Funding agencies or sponsors: CAPES, CNPq, FAPESP.



71 | MICRONUCLEUS TEST IN RECONSTRUCTED HUMAN SKIN MODEL FOR TOXICOGENETIC EVALUATION OF COSMETIC INGREDIENTS

Heloiza NICOLELLA¹, Camila Alessandra MINI¹, Giulia BALLESTERO¹, Nayara Cristina Perez de ALBUQUERQUE¹, Ana Luisa Abrahao DIAS², Nathalia De Carvalho INDOLFO², Tabata Renee DORATIOTO², Kelen Fabíola ARROTEIA², Melissa Dibbernn GANZERLA², Carla Carolina MUNARI¹, Franciane MARQUELE-OLIVEIRA¹

¹Eleve Science Pesquisa e Desenvolvimento, Supera Parque Tecnológico, Ribeirão Preto - SP, Brasil. E-mail: camunari@yahoo.com.br; franciane.oliveira@elevescience.com; ² Natura Cosméticos, Cajamar, São Paulo, Brasil.

Introduction: In response to national and international demands, Brazil has advanced in the implementation of alternative methods to the use of animals to evaluate the biological safety and efficacy of different products, especially in the cosmetic area. In this context, Eleve Science developed a model of reconstructed human skin (RHE) capable of evaluating the toxicological safety of chemical substances. **Aim:** The present study aimed the development of a Micronucleus assay using a RHE model according OECD approach and scientific literature in order to scientifically validate a human relevant model for the assessment of topical products. **Material and Methods:** This protocol was optimized based on *In vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test (OECD 487). Here we describe experiments using RHE for the evaluation of the genotoxicity effect of substances known true positive results in cell culture cells (vinblastine, benzo[a]pyrene and methyl methanesulfonate - MMS). All RHE models were exposed to positive, negative (non-treated) and solvent (acetone) control. The assay was performed using 48- and 72-hours of total exposure and with the presence of cytokinesis blocker. At the end of exposure, keratinocytes were released from the tissues, and deposited on histology slides to assess cytotoxicity and the frequency of micronuclei. To assess cytotoxicity, the relativity index was calculated. To assess genotoxicity, the frequency of micronuclei was determined by the ratio between the number of micronuclei and the total number of binucleated cells. **Results:** The solvent control (acetone) did not modify micronucleus frequency, cell viability, and model structure, compared with non-treated RHE. Among the protocols assessed, it was possible to establish conditions employing the treatment of RHE model with methyl methanesulfonate (MMS) with 48-hour exposure that scientifically validate the applicability of the model based on the binucleated cell rate and increased of micronuclei frequency. **Conclusion:** These preliminary results indicate that RHE model was scientifically validated and can identify the toxicogenetic potential of chemical substances meeting the requirements of regulatory agencies. In this context, this new protocol brings the innovative potential of employing human relevant model to assess the safety of cosmetic topic ingredients, next, helping to deliver safe products to the society.

Keywords: genotoxicity; safety toxicological; RHE model; *in vitro*, alternative methods .

Acknowledgements: FAPESP 2017/25246-3 and FINEP.

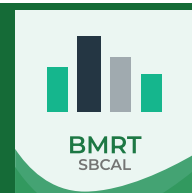
72 | MODELO EXPERIMENTAL DE CRESCIMENTO DE TUMOR DE MELANOMA DE PELE EM MEMBRANA CORIOALANTÓICA DE GALINHA

Raquel Michelle BATISTA¹, Luciana Maria SILVA¹, Silvia Ligório FIALHO¹

¹Fundação Ezequiel Dias- FUNED;

Introdução: O melanoma de pele é um tipo de câncer originado dos melanócitos, que são células responsáveis pela produção da melanina. A frequência de ocorrência do câncer de pele no Brasil é de 30%, entretanto, o melanoma representa apenas 4% das neoplasias deste órgão. O fator de malignidade é a capacidade de invadir tecidos próximos e se espalhar por outras partes do corpo. Uma forma para entender e compreender a caracterização de células tumorais é utilizando a membrana corioalantóica de galinha (CAM), um tecido altamente vascularizado e que oferece condições para o desenvolvimento e crescimento celular de enxertos. **Objetivos:** O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de um modelo de xenoenxerto para crescimento tumoral de melanoma de pele em membrana corioalantóica de galinha (CAM). **Material e Métodos:** A linhagem de melanoma humano SK-MEL-28 HTB-72™ (melanócitos isolados de tecido da pele) foi cultivada em modelo 2D x 3D em 2 placas de 96 poços. Foram utilizados 5 meios diferentes e analisados em relação ao crescimento e expansão celular. Foram utilizadas as células retiradas de cada um dos poços para implantação sobre a CAM, procedimento realizado no 7º dia. Houve uma quantidade variável de células para cada poço. A contagem das células indicou valores de 3,6 x10⁴, 1,5x 10⁴, 0,3x 10⁴, 2,7 x 10⁴ e 2,1x 10⁴, respectivamente. Neste ensaio os grupos foram divididos em Grupo 1 (aplicação de células em agarose, 1 ovo), Grupo 2 (aplicação de células de melanoma direto da placa 5 ovos) Grupo 3 (controle com PBS 1X). Análises preliminares dos cortes histológicos das membranas demonstram uma provável invasão tumoral neste tecido. **Conclusão:** O uso de metodologias de baixo custo e com eficácia comprovada é de grande importância na busca por novas estratégias de estudos e compreensão dos mecanismos que levam à progressão tumoral. Este método viabiliza experimentação buscando evitar o sofrimento animal.

Palavras-chave: Melanoma de pele, Membrana Corioalantóica de galinha, Xenoenxerto.



73 | MODELO MICROFLUÍDICO DE PELE HUMANA INERVADA

Rodrigo De Vecchi^{1,2}, Vanja Dakic^{1,2}, Margaret Magdesian³, Lionel Breton⁴, Charbel Bouez⁵

¹ L'Oréal Pesquisa & Inovação, Rio de Janeiro, Brasil;

² EPISKIN Brasil Biotecnologia, Rio de Janeiro, Brasil;

³ Ananda Devices, Laval, QC, Canadá;

⁴ L'Oréal Research & Innovation, Aulnay-sous-Bois, França;

⁵ L'Oréal Research & Innovation, Clark, Estados Unidos

Introdução: Modelos *in vitro* de pele humana estão disponíveis há muitos anos e estão sendo amplamente utilizados para avaliar irritação da pele, corrosão, exposição à radiação UV, etc. No entanto, os modelos existentes carecem de tato e sensibilidade. Devido à dificuldade de obtenção de neurônios humanos, diversos grupos têm utilizado neurônios não humanos com o objetivo de enriquecer a funcionalidade dos modelos *in vitro* existentes. **Objetivos:** Integração e uso de neurônios sensoriais periféricos humanos funcionais derivados de hiPSCs (células pluripotentes induzidas por humanos) para estabelecer um modelo *in vitro* de co-cultura com queratinócitos epidérmicos humanos primários. **Material e métodos:** A co-cultura foi estabelecida empregando uma tecnologia microfluídica (Ananda Devices, Canadá) especialmente projetada para avaliar potenciais interações funcionais entre neurônios e outros tipos de células. **Resultados:** O dispositivo microfluídico melhorou o crescimento axonal, a homogeneidade do subtipo neuronal e a maturidade dos neurônios sensoriais inervados. Este modelo *in vitro* proposto "neuroskin-on-a-chip" pode ser potencialmente usado como plataforma de teste de métodos alternativos para estudar a transdução de sinal na triagem de biomoléculas que atuam tanto em queratinócitos quanto em células cruzadas de neurônios sensoriais. **Conclusão:** Neste estudo, construímos um modelo miniaturizado de epiderme humana inervada em uma plataforma microfluídica composta por queratinócitos humanos e neurônios sensoriais derivados de hiPSCs, e potencialmente útil nas indústrias cosmética e farmacêutica.

Palavras-chave: Órgãos-no-chip. Pele. Neurônios humanos. hiPSC.

Órgãos de fomento ou financiadores: L'Oréal Brasil Pesquisa e Inovação.

74 | MODELO TRIDIMENSIONAL ESFERÓIDE (OSTEOSFERAS) PARA AVALIAÇÃO IN VITRO DE NOVOS TRATAMENTOS PARA O OSTEOSSARCOMA

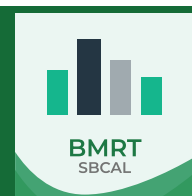
Joice Corrêa da SILVA¹, Ana Carolina Batista BROCHADO^{1,2}, Paulo Emílio LEITE^{1,2}, Gutemberg Gomes ALVES^{1,2}.

¹ Unidade de Pesquisa Clínica, Hospital Universitário Antônio Pedro, Universidade Federal Fluminense; ² Programa de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense.

Introdução: Osteossarcoma é o tumor maligno mais comum do tecido ósseo, com alto índice de metástase e baixa probabilidade de cura. Há décadas não são desenvolvidos novos medicamentos para o tratamento da doença, o que indica a urgência em desenvolver novos quimioterápicos. O Álcool Perílico (POH) é um monoterpene encontrado em diversos óleos essenciais e que tem se apresentado efetivo no combate às células tumorais de diversos tecidos, através, principalmente, da diminuição da proliferação e da expressão da RAS e proteínas relacionadas. Modelos de cultivo tridimensionais (3D) apresentam microarquitetura e fisiologia que se aproximam mais do tecido fisiológico *in vivo*, devido as interações célula-célula e célula-matriz presentes nesses modelos. Os modelos 3D de células tumorais são capazes de mimetizar o microambiente tumoral, o que auxilia no desenvolvimento de novas drogas quimioterápicas de forma mais preditiva. Dessa forma, o presente trabalho propõe um modelo tridimensional de osteossarcoma e um modelo tridimensional de osteoblasto primário para investigar a ação do Álcool Perílico em células de osteossarcoma, visando diminuir o uso de animais, o tempo e custos na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos. **Objetivos:** Caracterizar e padronizar modelos tridimensionais da célula de linhagem de osteossarcoma humano MG-63 e de osteoblastos humanos primários para avaliação da ação anticâncer do POH. **Material e Métodos:** Foram utilizadas a célula de osteossarcoma MG-63, e como controle, osteoblasto humano (OH) para produção de esferas pela técnica de sobreposição líquida. Os esferoides dos dois tipos celulares foram caracterizados em relação ao diâmetro, aspecto, densidade celular e histologia. Após padronização, os esferoides foram expostos a diferentes concentrações de POH para encontrar a concentração de inibição de 50% da viabilidade celular (IC50). Para isso, foi realizado o teste de LDH. **Conclusão:** O POH mostrou-se mais citotóxico para as células tumorais, demonstrando ser um possível candidato para o tratamento de osteossarcoma. Os modelos tridimensionais propostos possibilitaram a análise rápida e com custo otimizado da concentração necessária de álcool perílico para inibir 50% da viabilidade celular.

Palavras-chave: Cultivo de células 3D, testes *in vitro*, drogas anticâncer, álcool perílico.

Órgãos de fomento ou financiadores: CNPq, CAPES, PIBIC, FAPERJ, UFF.



75 | NOVA ABORDAGEM METODOLÓGICA PARA AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE SISTÊMICA *IN VITRO* UTILIZANDO SISTEMAS MICROFISIOLÓGICOS E TRANSCRIPTÔMICA

Nathalia de Carvalho INDOLFO^{1*}, Melissa Dibbern GANZERLA¹, Tábata Renée DORATIOTO¹, Thayná Mendonça AVELINO², Larissa Bueno TOFANI², Kelen Fabíola ARROTEIA¹, Ana Carolina Migliorini FIGUEIRA².

¹ Natura Cosméticos, Cajamar, São Paulo, Brasil; ² Laboratório Nacional de Biociências, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, São Paulo, Brasil

E-mail autor correspondente: nathaliaindolfo@natura.net

Introdução: Sistemas microfisiológicos humanos são o estado-da-arte no contexto de novas abordagens metodológicas para avaliação *in vitro* e, combinados à diferentes metodologias de análise, permitem uma avaliação mecanística dos efeitos causados por substâncias-teste. Esta tecnologia tem grande potencial de aplicação para cobrir gaps de disponibilidade de metodologias alternativas para avaliação de desfechos toxicológicos complexos, como por exemplo toxicidade sistêmica. Tal desfecho não possui metodologia alternativa *in vitro* validada. Na indústria cosmética, a avaliação desse desfecho para ingredientes sem dados disponíveis em literatura é baseada, por exemplo, em racionais de cálculos de segurança. Esses racionais muitas vezes limitam o uso dos ingredientes, pois é adotado o cenário mais conservador visando a proteção do consumidor. Neste trabalho, uma nova abordagem metodológica é proposta para avaliação do potencial de toxicidade sistêmica de ingredientes, combinando um sistema microfisiológico, contendo equivalentes de pele, fígado e intestino, com análises transcriptômicas. **Objetivos:** Desenvolvimento de NAM para avaliação de toxicidade sistêmica combinando um sistema microfisiológico de três equivalentes de órgãos com análise transcriptômica. **Material e Métodos:** Equivalentes de pele, fígado e intestino foram desenvolvidos e caracterizados. Após caracterização, foram integrados ao dispositivo microfluídico Chip3plus (TissUse GmbH) e tratamento tópico foi realizado com Acetaminofeno, um tóxico sistêmico reconhecido. Foram avaliados efeitos nos equivalentes de fígado e intestino por análises de viabilidade celular e da modulação da expressão gênica por meio de um painel exclusivo de marcadores relevantes para o desfecho toxicológico em estudo. **Resultados:** Os equivalentes apresentaram morfologia e funcionalidade adequadas e estáveis tanto na condição estática como quando inseridos em sistema microfisiológico. Após tratamento tópico com tóxico sistêmico, efeitos foram observados nos equivalentes de fígado e intestino de acordo com o esperado, observando-se modulação de vias biológicas relevantes. **Conclusão:** A NAM desenvolvida se mostrou promissora e com potencial aplicação na indústria cosmética. Testes utilizando outros tóxicos sistêmicos de proficiência, que atuem por outros mecanismos de ação, são necessários para comprovar a robustez do modelo. Além disso, modelos de extrapolação de doses *in vitro* para *in vivo* (IVIVE) devem ser aplicados para posterior avaliação de risco.

Palavras-chave: Avaliação de segurança, Sistemas microfisiológicos, Toxicidade sistêmica, Transcriptômica.

Órgãos de fomento ou financiadores: Empresa Brasileira de Pesquisa e Inovação Industrial (Embrapii) e Natura Cosméticos.

76 | O USO DE CÉLULAS ZFL E ZEM2S NA PREDIÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA EM PEIXES

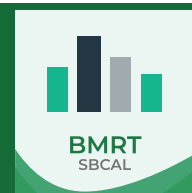
Júlia Beatriz Vaz de OLIVEIRA¹, Irisdoris Rodrigues de SOUZA¹, Tainá Wilke SIVEK¹, Andrezza Di Pietro Micali CANAVEZ², Natália de Albuquerque VITA², Desiree Cigaran SCHUCK², Marta Margarete CESTARI¹, Cynthia Bomfim PESTANA¹, Daniela Morais LEME¹.

¹Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil; ²Grupo Boticário, Departamento de Segurança de Produtos, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil.

Introdução: Testes de toxicidade aquática são empregados para identificar o perigo de substâncias diversas, como ingredientes cosméticos. Dentre os testes existentes, testes de toxicidade com peixes, como o teste FET (*Fish Embryo Test*, OECD TG 236), são normalmente requeridos. Entretanto, no âmbito da indústria de cosméticos, elevada restrição regulatória e política quanto ao uso de testes com animais é verificada. Assim, o desenvolvimento e uso de métodos baseados em linhagens permanentes de peixes (*in vitro*) tem sido cada vez mais estimulados no sentido de prover informações de toxicidade aquática de cosméticos. Apesar de já contar com um método de teste OECD publicado (OECD TG 249), ainda há grandes espaços para o desenvolvimento de novos métodos, principalmente frente a diversidade de espécies de peixes e necessidade de melhora a performance dos métodos existentes. **Objetivos:** Padronizar um ensaio com linhagens celulares de Danio rerio utilizando o vermelho neutro (VN) como um método alternativo ao teste FET. **Material e Métodos:** Foram utilizadas as linhagens ZEM2S (blástula) e ZFL (hepatócito) associada ao VN. Esse ensaio é uma adaptação proposta por nosso grupo de pesquisa, cujo fundamento é aferir a viabilidade celular a partir da incorporação e permanência do corante VN em lisossomos íntegros. Foram escolhidas 13 substâncias com variados modos de ação e concentrações letais médias (CL50) conhecidas em ensaios com embriões de D. rerio. Assim, os resultados de concentrações inibitórias médias (CI50) obtidos foram analisados quanto à correlação com os dados *in vivo* já existentes. **Resultados:** Todos os resultados de citotoxicidade obtidos apresentaram correlação significativa ($p < 0,05$, teste F) com os dados de toxicidade embrionária. Entretanto, destaca-se uma maior correlação da célula ZFL ($R^2 = 0,81 - 0,88$) do que a célula ZEM2S ($R^2 = 0,63 - 0,82$). **Conclusão:** A linhagem ZFL pode ser aplicada dentro de um contexto de previsão de toxicidade embrionária para D. rerio, utilizando ensaios como VN. Sua capacidade de metabolização indica uma vantagem dessa linhagem em relação à ZEM2S. Por meio da sua utilização, pode-se contribuir com o desenvolvimento de métodos livres de animais para estudos de toxicidade aquática.

Palavras-chave: Método *in vitro*; linhagens celulares de peixes; citotoxicidade, correlação *in vitro-in vivo*.

Órgãos de fomento ou financiadores: CAPES, Grupo Boticário.



77 | ORGANOCALCOGENIOS DERIVADOS DO AZT COMO UMA POSSIVEL TERAPIA PARA COVID-19: ENSAIOS TOXICOLOGICOS PRELIMINARES UTILIZANDO *C.elegans*

Gabriel Pedrosa VIÇOZZI^{1,2}, Flávia Suelen de Oliveira PEREIRA¹, Oscar Endrigo Dorneles RODRIGUES², João Batista Teixeira da ROCHA², Daiana Silva de ÀVILA^{1,2}

¹ Grupo de Pesquisa em Bioquímica e Toxicologia em *Caenorhabditis elegans* (GBToxCE), Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA, CEP 97500-970, Uruguaiana, RS, Brazil; ² Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

Introdução: O novo coronavírus (SARS-CoV-2) surgiu em 2019 na China causando mais de 6,7 milhões globais. Devido a urgência para encontrar uma cura, muitos estudos para desenvolver vacinas foram feitos e em 2021 foram distribuídos os primeiros lotes. Infelizmente, devido à impossibilidade de algumas populações para receber a vacina (alergias, por exemplo), há a necessidade de desenvolvimento de novos candidatos farmacológicos. Para tal, propomos os organocalcogênios derivados da zidovudina (AZT), uma vez que a mesma se demonstrou efetiva em estudos *in vitro*. Para realização de ensaios toxicológicos e antioxidantes iniciais o modelo animal *Caenorhabditis elegans* foi escolhido devido às vantagens que o mesmo apresenta como: homologia genética com mamíferos, ciclo de vida curto, cepas transgênicas, fácil manuseio e custo de manutenção inferior a roedores. **Objetivos:** No presente trabalho, objetivamos avaliar a segurança e potencial antioxidante de duas moléculas contendo Telúrio e Selênio respectivamente (S116l e S116h) derivados da zidovudina, utilizando o nematoide de vida livre *Caenorhabditis elegans* como modelo animal. **Material e Métodos:** Realizamos ensaios toxicológicos (sobrevivência, reprodução e tamanho corporal) visando obter dados que comprovem a segurança das moléculas no modelo proposto. Utilizamos uma faixa de concentração de 1-500 µM no ensaio de sobrevivência para obtenção de uma faixa de trabalho segura. Após estes ensaios, nos demais utilizamos somente a menor e maior concentração devido à ausência de toxicidade. Nos ensaios antioxidantes foi avaliado a formação de espécies reativas de oxigênio pelo método da diclorofluoresceína diacetato (DCF), expressão das enzimas superóxido desmutase-3 (SOD-3) e glutatona-S-trasferase-4 (GST-4), utilizando as cepas transgênicas CF1553 e Cl2166 respectivamente. Também foi realizada a atividade da GST. E por último, a translocação do fator de transcrição DAF-16 utilizando a cepa transgênica TJ356 foi realizada. **Resultados:** Observamos que a exposição aos compostos foram seguras na faixa de concentração avaliada, não causando desfechos toxicológicos nos parâmetros propostos. As moléculas foram capazes de diminuir a formação de espécies reativas de oxigênio, modular a expressão das enzimas antioxidantes e induzir a localização nuclear do fator de transcrição DAF-16. **Conclusão:** Nossos achados indicam que além de atividade antiviral, observada *in vitro*, os compostos podem ter importante ação anti-inflamatória, importante contra a COVID-19.

Palavras-chave: Selênio, Telúrio, *Caenorhabditis elegans*, COVID-19.

Órgãos de fomento ou financiadores: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

78 | ORGAN-ON-A-CHIP: UMA NOVA TECNOLOGIA PARA ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS DE MEDICAMENTOS E VACINAS

Christoph Schweitzer MILEWSKI^{1, 2}, Larissa Vasconcelos DUTRA¹, Wanise Borges Gouveia BARROSO¹

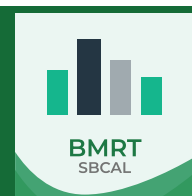
¹Fundação Oswaldo Cruz| Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos;

E-mail autor correspondente: christoph.milewski@fiocruz.br

Introdução: A validade científica de modelos animais não humanos na previsão da toxicidade humana em testes farmacêuticos pré-clínicos vem sendo questionada. Métodos alternativos vem sendo desenvolvidos para reduzir a utilização de animais em testes pré-clínicos. Por exemplo, os testes em animais estão sendo substituídos pela tecnologia *organ-on-a-chip* (OOAC), que tratam de sistemas microfisiológicos que imitam a estrutura e função de órgãos humanos, como pulmões, coração e fígado. Eles contêm canais microfluídicos ociosos revestidos com células humanas vivas e uma interface que reveste a superfície interna dos vasos sanguíneos e linfáticos. O OOAC pode ser revestido com células humanas para testes de drogas, modelagem de doenças e personalização do medicamento. O OOAC pode reduzir o risco de falhas no desenvolvimento de medicamentos e tempo de lançamento no mercado, o que significa acesso mais rápido a novos tratamentos e reduções significativas de custos. **Objetivo:** O objetivo do presente estudo consiste em identificar as principais empresas, áreas, inventores que estão realizando pesquisas e desenvolvimento com o OOAC. **Material e Métodos:** Realizou-se busca de patentes na base de dados Orbit/Questel, nos campos de título e resumos e empregou-se as palavras chave organ-on-a-chip, organ-on-chip, OOAC e OOC. **Conclusão:** A pesquisa de patentes na base de dados Orbit encontrou 862 pedidos de patente depositados referentes a organ on chip, onde os principais depositantes detentores dessa tecnologia são a Emulate, Harvard College e Massachusetts Institute of Technology. Os inventores que desenvolveram essa tecnologia são Donald Ingber e Daniel Levner e as áreas dos projetos dessas tecnologias são biotecnologia e engenharia química. Apesar de existirem diversas iniciativas ne grupos de pesquisa que realizam experimento nessa área no Brasil, não foram encontradas patentes depositadas no Brasil. Portanto, deve-se empreender esforços para criação de uma rede nacional referente a OOAC, bem como realizar colaboração ou transferência de tecnologia com instituições ou empresas que já trabalham com OOAC de modo a promover avanço tecnológico nessa área no Brasil.

Palavras-chave: Patente, organ on chip, medicamento, vacina, prospecção tecnológica.

Financiador: Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos.



79 | ORGAN-ON-A-CHIP” (OoC) COMO FERRAMENTA DE INOVAÇÃO PARA ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS EM ALINHAMENTO A CULTURA DOS 3Rs E ACEITAÇÃO REGULATÓRIA

Nubia Regina de OLIVEIRA¹, Christoph Schweitzer MILEWSKI¹, Wanise Borges Gouvea BARROSO^{1,2}

¹Fundação Oswaldo Cruz | Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos;

E-mail autor correspondente: wanise.barroso@fiocruz.br

Introdução: Tradicionalmente, muitos dos dados necessários para a avaliação de segurança regulatória de substâncias farmacêuticas, são obtidos de estudos experimentais com animais na fase dos estudos pré-clínicos. Os modelos pré-clínicos convencionais muitas vezes não detectam a toxicidade dos fármacos, ou seja, os danos ao ser humano muitas vezes só são identificados durante o ensaio clínico ou quando os medicamentos já estão sendo comercializados. Amplamente se discute a busca de métodos alternativos que se mostrem mais vantajosos em termos de confiabilidade, redução de custos e maior facilidade de incorporação pelos laboratórios, acompanhados da discussão das questões éticas ao uso de animais para o alinhamento da cultura dos 3Rs. Neste sentido a metodologia OoC têm sido alvo de muito interesse como método alternativo, principalmente em testes de toxicidade, devido a semelhança aos tecidos humanos e viabilidade mais longa da cultura de células, se comparada aos métodos convencionais *in vitro*. OoC são tecidos de cultura de células tridimensionais (3D) configurados em sistemas micro fluidicos (“chip”). Com isso, se abre a possibilidade de sugerir alterações no arcabouço regulatório e normativo frente às inovações nos estudos toxicológicos, podendo subsidiar pesquisas, com informações sobre a real aplicabilidade da metodologia como potencial preditivo regulatório. **Objetivo:** Avaliar a aplicabilidade da metodologia OoC nos estudos de toxicologia regulatória. Identificar e analisar a produção científica relacionada a metodologia OoC como subsídio das ações em vigilância sanitária. **Material e Métodos:** A escolha do método de revisão foi feita dentre aqueles que permitem a prática baseada na evidência científica. Foi realizada a revisão bibliográfica através da revisão de escopo e no levantamento, foram consideradas bases de dados indexadas com o uso de descritores controlados, no idioma português e inglês. Além disto, serão foram realizadas buscas com foco na aplicabilidade de OoC, nos sítios eletrônicos de agências reguladoras, entidades normativas, centros de validação mundiais e outros órgãos oficiais. **Conclusão:** Os resultados alcançados possibilitam a avaliação da aplicabilidade e da aceitação regulatória da metodologia OoC nos ensaios toxicológicos bem como demonstram o seu valor como método alternativo ao uso de animais em laboratório.

Palavras-chave: organ-on-chip, toxicology, regulatory assessment, preclinical studies, alternative methods.

Financiador: Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos.

80 | PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DA FOTOMUTAGENICIDADE EM MODELO DE PELE HUMANA RECONSTRUÍDA

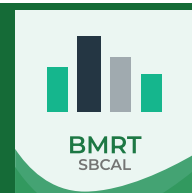
Thais Y. T. FUZINAGA¹, Ana Júlia P. GLUZEZAK¹, Renata S. N. TAVARES¹, Camila M. KAWAKAMI¹, Maria da Graça L. BRAVO¹, Flávia R. ABE¹, Danielle P. OLIVEIRA¹, Silvy S. MARIA-ENGLER², Lorena Rigo GASPAR¹

¹Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo; ²Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo

Introdução: Os avanços e aprimoramentos dos modelos 3D de tecidos vêm consolidando o seu uso para a avaliação da toxicidade de ingredientes e produtos acabados, uma vez que estes modelos conseguem mimetizar a exposição dérmica e estabelecer uma melhor correlação com resultados de ensaios *in vivo*. No campo da genotoxicidade, os modelos de pele 3D conseguem reduzir o alto índice de resultados falso-positivos observados em ensaios de culturas em monocamada, no entanto, até o momento não há ensaios validados para a avaliação *in vitro* do potencial fotogenotóxico ou fotomutagênico. **Objetivos:** O presente estudo buscou avaliar modificações no ensaio de mutagenicidade RSMN (Reconstructed Skin Micronucleus) para avaliação da fotomutagenicidade. **Material e Métodos:** Sob aprovação do CEP da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CAAE: 53899721.0.0000.5403), foram confeccionados os modelos de pele reconstruída *in house* e foi aplicado o controle positivo para fotomutagenicidade, 8-metoxipsoraleno (8-MOP), e o veículo, óleo de gergelim. Os modelos foram submetidos à irradiação UVA (7,8 J/cm²) e mantidos em meio de cultura DMEM com citocalasina-B (3 µg/mL) até o isolamento das células. Após o isolamento, as células foram aplicadas em lâminas, coradas com laranja de acridina e avaliadas por microscopia de fluorescência. **Resultados:** Os modelos de pele tratados com 8-MOP apresentaram resultados positivos para fotomutagenicidade e uma tendência para mutagenicidade, coincidindo com os dados da literatura que reportam o 8-MOP como sendo controle positivo para ensaios de fotomutagenicidade. Já os modelos tratados com o óleo de gergelim apresentaram resposta negativa para fotomutagenicidade e mutagenicidade. **Conclusão:** foi possível realizar a padronização de uma nova metodologia para avaliação do potencial fotomutagênico utilizando modelo de pele reconstruída, tendo a metodologia desenvolvida se mostrado uma promissora ferramenta para ensaios que visam reduzir os resultados falso positivos observados em ensaios *in vitro* de monocamada. Novos estudos devem ser realizados, incluindo novos controles positivos, concentrações e comparações inter laboratoriais para a submissão de uma proposta formal de validação do ensaio.

Palavras-chave: Fotomutagenicidade, Novas abordagens metodológicas, RSMN, Modelo de pele reconstruída, 8-metoxipsoraleno.

Órgãos de fomento ou financiadores: Os autores agradecem o apoio das agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP.



81 | PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO PELO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM *CAENORHABDITIS ELEGANS*

Pedro Henrique de Sousa SILVEIRA¹, Letícia da Silva INÁCIO¹, Samara Varela SANT'ANA¹, Cauã Belato Da Silva SIQUEIRA¹, Julia de Lacerda RUIZ¹, Manuel Gustavo Leitão RIBEIRO¹

¹Universidade Federal Fluminense;

Introdução: O uso de diferentes modelos de estudos permeia a pesquisa em diversas áreas com a busca daquele que forneça informações relevantes e que apresente uma alternativa aos modelos tradicionais. Com esse pensamento em vista, o uso do nematódeo *Caenorhabditis elegans* em estudos na área da saúde envolvendo vias metabólicas se torna atrativo pelo custo, praticidade e versatilidade envolvidos. **Objetivos:** O objetivo deste trabalho foi padronizar o método de avaliação do estresse oxidativo em *C. elegans*, um teste chave para o uso do nematódeo em estudos de citotoxicidade. Para isso foi utilizado o peróxido de hidrogênio, que é um oxidante eficaz e de fácil acesso. **Material e Métodos:** Foi realizada sincronização para obtenção da população de nematódeos na mesma fase L4 do ciclo de vida. 5 a 8 nematódeos em fase L4 foram transferidos da placa para poços de uma placa de 96 poços de fundo chato, contendo soluções de H₂O₂ nas concentrações de 0,0 mM (água), 0,06 mM, 0,12 mM, 0,3 mM, 0,6 mM, 1,2 mM, 3,0 mM, 6,0 mM e 20mM. Os nematódeos foram observados em lupa a cada 1h. **Conclusão:** Os resultados mostram que a padronização da metodologia de análise do estresse oxidativo foi satisfatória. Os experimentos envolveram também observar pequenos detalhes para sua otimização, como formas de obter melhor contraste e observação dos animais, escolha do número de indivíduos, técnica para “pinçar” os nematódeos e tempo máximo de exposição à luz. Com isso espera-se que se abram novas linhas de investigação no laboratório, como análise do efeito antioxidante de produtos naturais, além da utilização do *C. elegans* como modelo alternativa para investigação das alterações bioquímicas em doenças neurodegenerativas e transtornos, como o autismo, com o uso de cepas mutadas em genes que já foram relacionados a essas condições clínicas.

Palavras-chave: *Caenorhabditis elegans*, Citotoxicidade, Doenças neurodegenerativas, Estresse Oxidativo, Transtorno do Espectro Autista.

Órgãos de fomento ou financiadores: FAPERJ e PROPPI-UFF (auxílio financeiro) e CNPq (bolsa de pesquisa).

82 | PADRONIZAÇÃO DO TESTE DE ATIVIDADE HEMORRÁGICA DE VENENOS DE SERPENTES EM MEMBRANA CORIOALANTOICA (CAM) DE OVO DE GALINHA

Alcides de SOUSA NETO¹, Sílvia Ligório FIALHO¹, Valéria Gonçalves de ALVARENGA¹, Luciana Souza de OLIVEIRA¹, Eladio Oswaldo Flores SANCHEZ¹

¹Fundação Ezequiel Dias-Funed.

Introdução: A hemorragia é considerada um dos efeitos mais graves do envenenamento por mordidas de serpentes *Bothrops* e *Lachesis*. Os ensaios de atividade hemorrágica são utilizados para caracterização dos venenos e toxinas isoladas. Os modelos quantitativos utilizados para caracterizar a atividade hemorrágica são realizados em coelhos, ratos ou camundongos, com injeções intradérmicas de alíquotas na pele e quantificação do halo hemorrágico. A utilização da membrana corioalantoica (CAM) é um método in vivo alternativo aos métodos convencionais, sendo bem aceito na pesquisa nas áreas de câncer, angiogênese e toxicidade. **Objetivos:** Padronizar os ensaios de atividade hemorrágica de venenos de serpentes em modelo de membrana corioalantoica (CAM) de ovo de galinha embrionado. **Material e Métodos:** A CAM de ovos de galinha embrionados de 8 dias, foram expostas e receberam diferentes concentrações de venenos das serpentes *Bothrops jararaca*, *Bothrops neuwiedi* e *Crotalus durissus* (0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 µg/ovo) (SISBIO A24A925). Após 30 min, a CAM foi fotografada e a área hemorrágica quantificada utilizando o software ImageJ. Os resultados obtidos foram comparados com os obtidos pelo teste padrão realizado em camundongos (CEUA-Funed 024/22). **Resultados:** No modelo de CAM foi observado que o veneno de *C. durissus* não apresentou atividade hemorrágica e que o veneno de *B. jararaca* apresentou efeito hemorrágico mais potente que o de *B. neuwiedi*, concordando com os resultados obtidos em camundongos. **Conclusão:** O modelo de CAM para avaliação da atividade hemorrágica de venenos de serpentes, mostrou ser um método alternativo para substituição do ensaio realizado em animais, de acordo com o princípio dos 3Rs.

Palavras-chave: Atividade hemorrágica. Membrana corioalantoica. Venenos.

Órgãos de fomento ou financiadores: CNPq, FAPEMIG, FUNED.



83 | PELE HUMANA TRICAMADA RECONSTRUÍDA IN VITRO

Julia de Toledo Bagatin¹, Denisse Esther Mallaupoma Camarena¹, Silvyta Stuchi Maria-Engler¹

¹Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo

Introdução: O tecido adiposo hipodérmico possui importante papel na homeostase da pele humana de forma parácrina, como na cicatrização de feridas, imunidade inata e função barreira. Portanto, o desenvolvimento de um modelo de pele humana tricamada contendo a representação da hipoderme por suas células representativas, os adipócitos, podem ser de grande contribuição no estudo da associação da pele a doenças metabólicas e cicatrização de feridas, além disso fornece uma plataforma mais representativa à pele humana para teste de segurança e eficácia de produtos farmacêuticos. **Objetivos:** Estudar a interação parácrina entre as células epiteliais e o tecido adiposo dérmico em um modelo de pele reconstruída *in vitro* tricamada, principalmente sua influência na função de barreira e na recuperação pós-irritação química. **Material e Métodos:** As células mesenquimais multipotentes primárias foram induzidas à diferenciação a adipócitos como esferóides, que tiveram seu crescimento em tamanho e síntese de adiponectina acompanhados até o momento de sua maturação completa e inclusão destes em matriz de colágeno junto aos fibroblastos compondo a derme. Queratinócitos semeados na superfície completaram o modelo de pele tricamada. Esta foi comparada com o modelo tradicional bicamada em quantidade de adiponectina (ELISA), expressão proteica de marcadores de estratificação epidérmico por western blotting, testes de função barreira com SDS e resistividade elétrica; irritação aguda usando SDS com 42h de recuperação e quantificação de interleucina 1 alfa e 8 (ELISA). A análise estatística foi realizada por ANOVA ou t-test dependendo das variáveis ($\alpha=0,05$). **Conclusão:** O modelo de pele tricamada apresentou adipócitos com acúmulo lipídico e secreção de adiponectina ($p<0,001$). Também, a pele tricamada teve maior expressão involucrina ($p=0,0485$) por western blotting, o que nos levou a supor sua maior função barreira. Porém, a resistividade elétrica não demonstrou diferença em relação à pele bicamada. Ainda assim, a pele tricamada demonstrou maior recuperação pós-irritativa ($p=0,0318$) e menor inflamação por IL-8 ($p>0,001$), como descrito na literatura. Por fim, a pele tricamada representa uma ferramenta *in vitro* promissora e funcional para os estudos sobre metabolismo, adipocinas e sua relação com a pele humana.

Palavras-chave: Pele tricamada, hipoderme, irritação, recuperação.

Órgãos de fomento ou financiadores: CAPES (88887.363766/2019-00) e FAPESP (2019/14527-7).

84 | PERMEACÃO UNGUEAL IN VITRO: UMA ALTERNATIVA NA AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE MEDICAMENTOS TÓPICOS

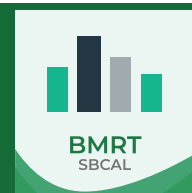
Juliana KISHISHITA¹, Camila de Almeida Perez PIMENTA¹, Yohana Souza SILVA¹, Davi Pereira de SANTANA¹, Maria Begõna DELGADO-CHARRO², Leila Bastos LEAL¹

¹Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC). Universidade Federal de Pernambuco; ²University of Bath, Bath, United Kingdom.

Introdução: Esmaltes medicamentosos são a forma de escolha para tratamento tópico de onicomicose, mas apesar de serem mais seguros, apresentam eficácia limitada. Isto porque são preparados a partir de uma mistura de solventes orgânicos, que após aplicação e secagem, formam um filme contendo o fármaco cristalizado, impedindo a permeação através da lâmina ungueal. Com isso, novos desenvolvimentos trazem esmaltes de base aquosa como promissores, visando melhorar a passagem transungueal de fármacos. **Objetivos:** Este trabalho teve como objetivo avaliar a permeação *in vitro* (IVPT) utilizando unhas humanas, a partir de novas formulações hidrofílicas e esmalte comercial (Micolamina[®]) contendo ciclopirox (CPO), associado ao método de microporação. **Material e Métodos:** Para avaliação do desempenho, foi realizado IVPT com recortes de unhas humanas sadias, obtidas após aprovação pelo comitê de ética em pesquisa (CAAE: 27554719.1.0005208). Os IVPTs foram realizados em células de difusão vertical com adaptadores de unha, sob oclusão à $32 \pm 1^\circ\text{C}$ e duração de 14 dias. Os testes de dose única em unhas microporadas (SD-MP), aplicaram uma dose de 50 μL , enquanto os testes de dose múltipla em unhas não poradas (MD-NP) envolveram doses de 10 μL /dia. A detecção por CLAE-UV foi usada para quantificar o fármaco nas amostras de líquido receptor, e na extração das unhas, ao final dos testes. **Resultados:** Após os experimentos iniciais, a retenção de CPO nas unhas no arranjo SD-MP foi aumentada 2,4-3,6 vezes frente ao arranjo MD-NP, sugerindo que a combinação da microporação com dose única favorece a permeação, portanto os demais testes foram com o arranjo SD-MP. Todas as formulações apresentaram retenção de CPO significativamente maior que a Micolamina[®]. Nos experimentos SD-MP, a passagem do fármaco através da unha, deixou clara a importância da microporação enquanto um promotor físico de permeação. **Conclusão:** O método *in vitro* utilizado para verificar a passagem transungueal, mostrou-se adequado na avaliação das formulações, sendo uma alternativa promissora na previsão do desempenho clínico de produtos. Além disso, as novas formulações disponibilizam o fármaco de forma mais eficiente do que o esmalte comercial através de unhas humanas microporadas.

Palavras-chave: Alternativas *in vitro*. Células de Franz. Permeação ungueal.

Órgãos de fomento ou financiadores: Academy of Medical Sciences Newton Advanced Fellowship (Concessão: NAF\R10\100041); Instituto Nacional de Ciência Tecnologia – Rede Norte Nordeste de Fitoprodutos (Projeto 465536/2014-0).



85 | PLATAFORMA DE BIOENSAIOS EM MÉTODOS ALTERNATIVOS EM CITOTOXICIDADE – FIOCRUZ-PR: PRESTAÇÃO DE SERVIÇOS E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO

Alessandra Melo de AGUIAR¹, Ana Paula Ressetti ABUD¹

¹Plataforma de Bioensaios em Métodos Alternativos em Citotoxicidade – FIOCRUZ-PR;

E-mail autor correspondente: alessandra.aguiar@fiocruz.br; ana.abud@fiocruz.br

A Plataforma de Bioensaios em Métodos Alternativos em Citotoxicidade faz parte da Rede de Plataformas Tecnológicas da FIOCRUZ e oferece ensaios *in vitro* de citotoxicidade para a determinação de concentrações tóxicas e predição de toxicidade de diversos compostos. A plataforma também atua no desenvolvimento tecnológico e inovação em métodos alternativos visando estabelecer ensaios com maior poder de predição para a saúde humana, baseados principalmente nas características de autorrenovação e de diferenciação de células-tronco. O uso racional e a busca de métodos alternativos à utilização de animais na pesquisa científica e desenvolvimento de fármacos e cosméticos é, atualmente, uma preocupação mundial. Porém, apesar dos esforços da comunidade científica, ainda não é possível abolir a experimentação animal nas chamadas fases não-clínicas do desenvolvimento de novos fármacos e outros produtos destinados à saúde humana. Dessa maneira, ressalta-se a importância do desenvolvimento de métodos alternativos que avaliem a citotoxicidade *in vitro*. O método em questão utiliza células-tronco de origem humana para definir, com precisão, ainda na fase *in vitro*, a toxicidade de uma nova substância, reduzindo o número de animais utilizados para o desenvolvimento desses novos produtos. Esse método é baseado na inibição do processo de diferenciação celular em adipócitos, de células-tronco adultas humanas, o qual resultou em concessão de patente (Carta Patente nº BR 102015025791-0). A Plataforma também se interessa em extrapolar esse método para adequação em sistemas de micro fluidica, o que resultará em maior proximidade com sistemas *in vivo*. Adicionalmente, outros ensaios estão em processo de implementação/desenvolvimento como ensaios de genotoxicidade. Atualmente a plataforma oferece serviços como ensaios de citotoxicidade quantitativos e qualitativos, oferta de insumos referentes aos ensaios oferecidos, consultorias, treinamentos, além de serviços relacionados ao uso da Leitora de microplaca Synergy H1M2F (Biotek®) pertencente à Plataforma. Até o momento, no ano de 2023, foram realizadas mais de 300 análises, com mais de 100 usuários atendidos. O perfil dos usuários da Plataforma abrange usuários internos da FIOCRUZ além de usuários de outras instituições públicas e privadas. Os serviços ofertados pela Plataforma consistem em importante estratégia para redução do uso de animais, em consonância com a orientação do governo brasileiro.

Palavras-chave: Células-tronco. Citotoxicidade. Serviços.

Órgãos de fomento ou financiadores: Rede de Plataformas Tecnológicas – FIOCRUZ; Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ-PR.

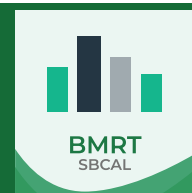
86 | PREDIÇÃO IN SILICO DE METABOLISMO E TOXICIDADE DO CARVACROL E DERIVADOS SINTÉTICOS PARA RATTUS NORVEGICUS

Michelli de Medeiros BUENO¹, Karina Gatti de ABREU¹, Matheus Nunes da ROCHA², Márcia Machado MARINHO², Emmanuel Silva MARINHO², Wesley Lyeverton Correia RIBEIRO¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará; ² Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, Universidade Estadual do Ceará

Introdução: A triagem virtual tem sido utilizada para prever a atividade e segurança toxicológica de moléculas sobre alvos-biológicos, visando, sobretudo, a redução do número de animais no desenvolvimento de novos produtos. **Objetivos:** O presente estudo objetivou avaliar a predição do sítio de metabolismo e toxicidade aguda do carvacrol (CV) e seus derivados sintéticos CV aldeído, CV Base de Schiff (BS) e BSCu²⁺ para *Rattus norvegicus*. **Material e Métodos:** A estabilidade metabólica dos análogos sintéticos do CV foi mediada via predição do sítio de metabolismo nos servidores SOMP-Way2Drug e STopTox, a partir de descritores de relação estrutura-atividade (QSAR). Os resultados foram relacionados aos descritores de substrato de isoformas do citocromo P450 do teste consensual de ADME, e da estimativa de dose letal (DL50) para por via oral para *R. norvegicus* através servidores ProTox-II e GUSAR Online. **Resultados e Conclusão:** A predição do sítio de metabolismo mostrou uma relação direta com a estimativa quantitativa da eficiência lipofilicidade-metabolismo (LipMetE), onde foi possível notar que os ligantes CV aldeído e BSCV mostraram uma maior lipofilicidade em função do efeito HBD intramolecular, resultando em uma menor estabilidade metabólica para estes ligantes. A estabilidade metabólica correlaciona-se diretamente com a predição de LD50. O valor de DL50 previsto para o CV foi de 810 mg/kg, apresentando similaridade de 100% com o valor experimental de LD50 do CV depositado na base de dados para toxicidade oral em *R. norvegicus*. O composto metabolicamente mais estável (BSCu²⁺) apresentou um valor de LD50 previsto na ordem de 2.450 mg/kg, dentro de um intervalo de idealidade para um indicativo de baixa resposta toxicológica por ingestão. No entanto, a descomplexação, ou seja, a formação da BSCV, reduz a toxicidade aguda para um LD50 para ordem de 3.500 mg/kg, constituindo um princípio ativo mais seguro em relação ao complexo metálico.

Palavras-chave: Carvacrol; Complexo metálico; Metabolismo; Toxicidade.



87 | PROFICIÊNCIA DO MODELO *IN VITRO* ES[®]RHE COMO ALTERNATIVA CONFIÁVEL PARA AVALIAÇÃO DE IRRITAÇÃO CUTÂNEA

Camila Alessandra MINI¹, Carla Carolina MUNARI¹, Giulia BALLESTERO¹, Nayara Cristina Perez de ALBUQUERQUE¹, Franciane MARQUELE-OLIVEIRA¹

¹Eleve Science Pesquisa e Desenvolvimento, Supera Parque Tecnológico, Ribeirão Preto - SP, Brasil.

E-mail autor correspondente: franciane.oliveira@elevescience.com

Introdução: No contexto da avaliação de segurança de produtos tópicos, o modelo de Epiderme Humana Reconstruída (RHE) tem se destacado como uma ferramenta promissora. Uma metodologia altamente reconhecida é o teste de irritação cutânea *in vitro*, conforme definido nas diretrizes da OECD. Diante da importância crescente das abordagens sem uso de animais e da demanda por alternativas confiáveis, o desenvolvimento do modelo ES[®]-RHE pela Eleve Science[®] responde a essas necessidades, tendo sido avaliado minuciosamente de acordo com os parâmetros estabelecidos. **Objetivos:** Avaliar a densidade óptica do controle negativo, função barreira e morfologia do modelo de Epiderme Humana Reconstruída da Eleve Science (ES[®]-RHE) e submetê-lo à lista mínima de químicos da diretriz 220 da OECD para avaliar a proficiência do modelo utilizando 20 produtos químicos de referência, além do desempenho de reprodutibilidade, morfologia, função de barreira e viabilidade celular do modelo. **Material e Métodos:** O modelo de Epiderme Humana Reconstruída (RHE) da Eleve Science[®] foi preparado, envolvendo a suspensão de queratinócitos em meio específico e desenvolvido por cerca de duas semanas. A qualidade do modelo foi avaliada através do controle da viabilidade celular por meio do ensaio MTT, da avaliação da função barreira por IC50 com tratamento SDS, e análises morfológicas e imunohistoquímicas para identificação de marcadores de diferenciação celular. Além disso, para a avaliação de proficiência, 20 substâncias químicas da Lista Mínima da OECD foram aplicadas ao modelo e submetidas ao mesmo protocolo de exposição e avaliação. Essa abordagem multidimensional permitiu uma avaliação completa da validade, qualidade e capacidade preditiva do modelo Eleve Science[®] - RHE, fornecendo uma base sólida para sua utilização em estudos de irritação cutânea *in vitro*. **Resultados:** O modelo ES[®]-RHE cumpriu os critérios de controle de qualidade estabelecidos. Na avaliação da viabilidade celular do controle negativo, a densidade óptica dos tecidos testados se situou dentro da faixa aceitável. Além disso, a função de barreira do modelo foi confirmada em diferentes lotes, que também se manteve coerente com os parâmetros internos e com modelos validados internacionalmente. A análise morfológica revelou a presença de camadas diferenciadas e multicamadas semelhantes à pele humana. Além disso, a exposição às 20 substâncias da Lista Mínima de Produtos Químicos de Referência demonstrou que o modelo apresentou sensibilidade, especificidade e exatidão, atendendo às recomendações da OCDE. **Conclusão:** o modelo demonstrou ser uma alternativa promissora e confiável para avaliar a irritação cutânea, cumprindo os rigorosos critérios de controle de qualidade. A integridade morfológica, função de barreira e respostas aos produtos químicos da Lista Mínima de Referência respaldam sua eficácia, contribuindo para reduzir a dependência de testes em animais e promovendo a ética na pesquisa.

Palavras-chave: métodos alternativos ao teste em animais. controle de qualidade, viabilidade celular, função barreira, teste de irritação cutânea.

Órgãos de fomento ou financiadores: FAPESP, FINEP.

88 | PROSPECÇÃO DE APLICAÇÃO BIOMÉDICA E AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE BISMUTO

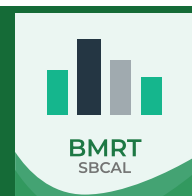
Natalie Mayara ERICH¹, Ana Paula Ressetti ABUD², Crisciele KULIGOVSKI¹, André Luiz Franco SAMPAIO³, Ana Paula FONTÃO³, Thiago Neves MACHADO⁴, Arandi Ginane BEZERRA Jr⁴, Anny Waloski ROBERT¹, Alessandra Melo de AGUIAR¹

¹ Laboratório de Biologia Básica de Células-Tronco, Instituto Carlos Chagas - FIOCRUZ PR, Curitiba - PR, Brasil; natalie.erich@hotmail.com (N.M.E.); anny.robert@fiocruz.br (A.W.R.); crisciele.kuligovski@fiocruz.br (C.K.) alessandra.aguiar@fiocruz.br (A.M.A.); ² Rede de Plataformas Tecnológicas FIOCRUZ — Bioensaios em Métodos Alternativos em Citotoxicidade, Instituto Carlos Chagas - FIOCRUZ, Curitiba - PR, Brasil; ana.abud@fiocruz.br (A.P.R.A.); ³ Rede de Plataformas Tecnológicas FIOCRUZ — Bioensaios para Triagem de Compostos Antitumorais - Instituto de Tecnologia em Fármacos — FIOCRUZ RJ, Rio de Janeiro — RJ, Brasil; ana.fontao@fiocruz.br (A.P.F.); andre.sampaio@far.fiocruz.br (A.L.F.S.); ⁴ Laboratório FotoNanoBio, Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, Curitiba - PR, Brasil. arandi@utfpr.edu.br (A.G.B); thiagomachado@alunos.utfpr.edu.br (T.N.M.)

Introdução: As nanopartículas (NPs) são materiais com pelo menos 1 dimensão de tamanho abaixo de 100 nm, apresentam grande superfície de contato e por isso são estudadas para o tratamento de doenças na busca mais efetiva de medicamentos. As NPs podem ser geradas por diferentes métodos que impactam não apenas pelas suas propriedades físico-químicas, como seus efeitos biológicos. As nanopartículas de bismuto (BiNPs) de síntese química demonstram potencial na aplicação biomédica como estimular a regeneração óssea e possuir atividade antitumoral, porém há poucos estudos com BiNPs de síntese física. **Objetivos:** Nesse contexto, o presente projeto busca avaliar o potencial de regeneração óssea e atividade antitumoral das BiNPs de síntese física. **Material e Métodos:** A primeira etapa do projeto consistiu na seleção de doses de BiNPs a partir de ensaios de citotoxicidade. As BiNPs foram testadas em células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (hADSCs – CEP – FIOCRUZ (CAAE: 10917112.9.0000.5248) e linhagem de fibroblasto murino (Balb/3T3 clone A31) através do ensaio de captação do vermelho neutro com 48h de exposição. Na segunda etapa, os efeitos na osteogênese foram avaliados em hADSCs submetidas ao processo de diferenciação na presença das BiNPs em diferentes concentrações e a quantificação foi realizada com Alizarina Red S. Por último foi avaliado o efeito das BiNPs na inibição de crescimento das linhagens tumorais K-562 (leucemia crônica mielocítica), SK-MEL-28 (melanoma) e MCF7 (adenocarcinoma de mama) realizado pelo ensaio de MTT. **Conclusão:** O IC50 da Balb/3T3 e hADSCs foi de 122,46±55,10 µg/ml e 294,19±91,36 µg/ml, respectivamente. Notamos que concentrações menores que 250 µg/ml não afetaram a viabilidade das hADSCs. Adicionalmente observou-se um aumento na diferenciação osteogênica nas concentrações de 2,02, 4,35 e 9,36 µg/ml das BiNPs. Tal achado sugere uma relação entre a presença das BiNPs e o estímulo à diferenciação osteogênica das hADSCs. Na avaliação da ação antitumoral, as BiNPs inibiram o crescimento de células da K562, atingindo até 90% de inibição em 100 µg/mL. Em suma, os resultados obtidos neste estudo abrem um portal de promissoras perspectivas para a pesquisa e desenvolvimento de novas terapias baseadas em nanopartículas.

Palavras-chave: Atividade antitumoral. Diferenciação osteogênica. Nanopartículas de bismuto. Regeneração óssea.

Órgãos de fomento: Edital do Programa de Estímulo à Pesquisa do Instituto Carlos Chagas (ICC) da Fiocruz - PEP (ICC-008-FIO-21-2-10); CNPq Universal (426063/2018-0); CNPq Proep-ICC (442375/2019-0)



89 | PULMONARY IRRITANT EFFECTS ASSESSED WITH 3D ALVEOLAR MODEL: EXPOSURE TO TOXICANT IN LIQUID AND AEROSOL

Marcella Miranda Siqueira FURTUOSO¹, Rafaela Campos de MENEZES¹, Kvetta Pinheiro Teixeira TAVARES¹, Marize Campos VALADARES¹

¹Laboratory of Education and Research in *In vitro* Toxicology, Tox In, Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

E-mail autor correspondente: marcellafurtuoso@discente.ufg.br

Introduction: The assessment of acute inhalation toxicity is currently performed by analyzing the respiratory tract of rodents; however, 21st-century toxicology aims to reduce animal usage. In this context, *in vitro* methods have been developed to evaluate the human respiratory system. Currently, no validated *in vitro* tests exist for assessing the inhalation toxicity of irritant compounds; therefore, it's important to develop animal-free techniques that mimic the human lung system. The 3D model using human A549 alveolar lung cells, previously established by the Tox In research group, can mimic human exposure through air-liquid interface cultivation. Moreover, this air-liquid interface cultivation allows exposure to toxicant aerosols, mimicking the kinetics of lung exposure to inhaled materials. **Objective:** To investigate the effects of exposure to Category 3 GHS pulmonary irritants in liquid and aerosol forms on the 3D alveolar model. **Materials and Methods:** In the present study, compounds categorized as inhalation irritants by the Globally Harmonized System (GHS) were evaluated. The 3D alveolar model was obtained using A549 cells cultured at an air-liquid interface. Pulmonary irritants were dispersed in PBS and tested through direct application in both liquid and aerosol forms by nebulization in the Vitrocell® Cloud 12 exposure chamber. Following exposure, tissues were incubated at 37°C for 3 hours and assessed using the MTT assay. **Results:** The findings indicate that the 3D alveolar model presented concentration-dependent cytotoxicity after exposure to lung toxicants, showing that aerosol exposure presented more sensitivity to detect the effect. **Conclusion:** These findings suggest that the 3D alveolar pulmonary model holds promise as a viable alternative to acute inhalation toxicity testing.

Key words: Acute inhalation toxicity; Air-liquid interface; Exposure to nebulization; *In vitro*.

Funding Organizations: CAPES, CNPq, and FINEP.

90 | PULMONARY TOXICITY: DEVELOPMENT OF AN EX VIVO MODEL FOR MECHANISTIC INSIGHTS

Marcella Miranda Siqueira FURTUOSO¹, Rafaela Campos de MENEZES¹, Igor Silva de OLIVEIRA¹, Kvetta Pinheiro Teixeira TAVARES¹, Bruna Cristiane Oliveira PEDRALI¹, Marize Campos VALADARES¹

¹Laboratory of Education and Research in *In vitro* Toxicology, Tox In, Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

E-mail autor correspondente: marcellafurtuoso@discente.ufg.br

Introdução: Currently, inhalation toxicity assessments, endorsed by global regulatory bodies, heavily rely on animal testing. This scenario emphasizes the need to explore innovative methods that replicate the respiratory system to reduce, refine, and eventually replace animal use. On the other hand, human ex vivo models, such as Precision-Cut Lung Slices (PCLS), simulate the cellular environment with functional lung cells and a simulated extracellular matrix. Yet, the limited availability of human tissue hinders widespread adoption. The porcine lung, resembling human lung characteristics, emerges as a promising candidate for an ex vivo PCLS model, holding potential for early toxicity evaluations. Such tissues can be obtained from food industry waste, representing a valuable and low-cost alternative to assessments performed in living animals. **Objective:** Develop and characterize an ex vivo porcine PCLS model to assess pulmonary toxicity mechanisms. **Materials and Methods:** Porcine lungs donated from a local industry were utilized. Precision-Cut Lung Slices (PCLS) were obtained using a Tissue Slicer DTK-3000W (Vibratome), cut to 300µm to 500µm thickness, and air-liquid cultured for twenty days. Tissue viability was assessed via tetrazolium reduction (MTT) method. Post-processing, hematoxylin-eosin staining aided histological analysis. On the fifth day of cultivation, PCLS were exposed to aerosolized paraformaldehyde, a well know pulmonary toxicant, using the Vitrocell® Cloud 12 exposure chamber. Reactive oxygen species (ROS) were quantified using DCFH-DA staining, and mitochondrial activity was gauged through MITOTRACKER® labeling. Caspase activity was studied via indirect immunofluorescence. **Results:** Initial observations suggest that the ex vivo porcine PCLS model maintained cell viability and alveolar morphology for twelve days, confirmed by histological and MTT assays, with no tissue degeneration. Assessments of ROS, mitochondrial activity, and caspase activation following aerosolized paraformaldehyde exposure provided insights into toxicity mechanisms. **Conclusion:** The ex vivo porcine PCLS model holds promise as a valuable tool for pulmonary toxicity assessment, presenting some key hallmarks that offer insights into mechanistic processes.

Key words: Inhalation toxicity assessments; New Approach Methodologies (NAMs); Precision Cut Lung Slices (PCLS).

Funding Organizations: CAPES, CNPq, and FINEP.



91 | PYROGENIC RESPONSE OF MEDICAL DEVICES AND BIOMATERIALS BY THE MONOCYTE ACTIVATION TEST: A SYSTEMATIC REVIEW

Izabela Gimenes LOPES^{1,2}, Janaína SPOLADORE¹, Bruno Andrade PARANHOS³, Gutemberg Gomes ALVES^{4*}

¹ Post-Graduation Program in Science and Biotechnology, Fluminense Federal University, Niteroi, Brazil; ² National Institute for Quality Control in Health, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil; ³ Carlos Chagas Filho Biophysics Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; ⁴ Cell and Molecular Biology Department, Institute of Biology, Fluminense Federal University, Niteroi, Brazil*

Introduction: Medical devices that contact the human body or blood must be free from contaminants to avoid potential risks to patients. Pyrogens are a particular concern, as they can cause fever, altered hemostatic responses, shock, and even death. The Pyrogen Activation Test (MAT) is a non-animal method that uses human whole blood, blood fractions, or cell lines to detect pyrogens. MAT can be applied to various materials, regardless of shape and size. Regulatory bodies recommend validating the test for each substance or material. Understanding MAT's suitability for diverse materials, exposure methods, and the obtained results is crucial for its future industrial applications. **Aim:** To scope the literature evidence on the use of MAT to assess health products (medical devices, biomaterials) identifying the main prospects and methodological challenges. **Materials and Methods:** A search was performed June 2022 on tree databases. Studies were included if comprising medical devices or biomaterials (Population) tested through or Monocyte Activation tested with MAT (Intervention) for the determination of pyrogenicity (Outcome). The methodological quality was assessed using ToxRTool. **Results:** From 321 identified studies, ten were included according to the eligibility criteria, five of them considered as "reliable without restriction" through the quality assessment. The synthesis was performed with results grouped according to the sample category, exposure protocols, cell source, Pyrogenicity detection parameter, Endotoxin Stimuli, Interference test, and comparison of RPT, LAL and MAT. The studies investigated various medical biomaterials, including implantable materials like titanium and polymeric materials. Cryopreserved blood was found effective for titanium alloys. Challenges in MAT protocols included adapting exposure to solid materials and determining interferences. Collaborative efforts for future validations and specific norms considering the material's domain of applicability are essential for advancing MAT and ensuring its effectiveness in safety and regulatory assessments. **Conclusions:** There is evidence that MAT could detect pyrogens without interference, but specific methodological adaptations are required. Standardization of the test is crucial for comparing results and expanding its scope in evaluating medical devices and biomaterials without animal use.

Key words: Alternative methods, medical devices. monocyte activation test. systematic review.

Funding: Brazilian agencies CAPES and CNPq.

92 | QMATRIX COMO ALTERNATIVA AO USO DE COLÁGENO ANIMAL EM BIOIMPRESSÃO 3D: UMA ANÁLISE COMPARATIVA

Pamela Ferreira do NASCIMENTO¹, Claudia Larissa Viana da SILVA¹, William da Silva Mendes TRIPER¹, Daniela Tiepo GOMES¹, Larissa Gonçalves de PASCHOAL¹, Laura Oliveira REBOUÇAS¹, Janaina de Andréa DERNOWSEK¹

¹ Quantis® Biotecnologia, Brasil

E-mail autor correspondente: pamela.ferreira@quantis.bio

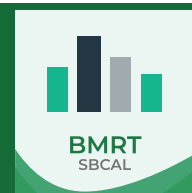
Introdução: O avanço na criação de biotintas compatíveis, destinadas à bioimpressão 3D, sem a necessidade de componentes de origem animal, requer uma abordagem multidisciplinar, unindo os campos da biofabricação e engenharia de tecidos. Estudos prévios revelaram que a inclusão de colágeno tipo I na formulação da biotinta não apenas reforça a integridade estrutural do material impresso, mas também a aderência e viabilidade celular, destacando-se como um potencial desenvolvimento de alternativas aos métodos tradicionais que envolvem o uso de animais.

Objetivos: O principal objetivo deste estudo está na avaliação de formulações de biotintas contendo colágeno tipo I de rato (Corning®) e de humanos (QMatrix, Quantis®) em diferentes concentrações isento de insumos animais. **Material e Métodos:** O cultivo de fibroblastos humanos primários foi realizado em meio quimicamente definido (Quantis®) e incorporados a fórmula patenteada de hidrogel (Quantis®). O colágeno humano e de rato foram adicionados à concentração de 2×10^6 células/mL e mantida incubada por 4 dias. A morfologia celular e do tecido 3D foi avaliada pelo método de microscopia óptica, enquanto a viabilidade celular quantitativa foi medida com ensaio de Resazurina (0,01 mg/mL em solução) e o ensaio Live/Dead para análise de viabilidade celular. Para a quantificação de colágeno, foi realizado o método Pricrossirius Red. **Resultados:** A biotinta com QMatrix® revelou baixa toxicidade, impulsinou migração celular e gerou o dobro de colágeno em comparação à formulação com colágeno animal, resultando em melhorias no ambiente tridimensional. O sucesso do QMatrix® pode ser atribuído à sua biocompatibilidade, criando um ambiente similar ao tecido humano. Mesmo com igual proteína, pequenas variações nos aminoácidos afetam colágeno, respostas celulares e remodelação. Embora as fontes xenogênicas sejam comuns, a pesquisa avança em materiais humanos, buscando biocompatibilidade e funcionalidade em aplicações médicas. **Conclusão:** Em resumo, o QMatrix® (colágeno tipo I humano) revelou notáveis propriedades regenerativas em uma estrutura tridimensional, superando o colágeno de rato, e demonstrou resultados promissores como uma alternativa viável aos insumos de origem animal. Essa descoberta abre perspectivas empolgantes para aplicações na medicina regenerativa e estética, com destaque para seu potencial em preenchimento dérmico e articular, devido a sua marcada biocompatibilidade.

Palavras-chave: Biofabricação. Biotinta. Colágeno tipo I. Meio quimicamente definido. Método alternativo.

Órgãos de fomento ou financiadores: PIPE II FAPESP (2021/12156-1, 2023/00258-0, 2022/07910-1); CATALISA.

Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE): 39384420.8.0000.8447



93 | RECONSTRUCTED HUMAN EPIDERMIS (ES®RHE) AS A PLATFORM FOR SENSITIZATION STUDIES FOR COSMETIC INGREDIENTS

Camila Alessandra MINI¹, Carla Carolina MUNARI¹, Giulia BALLESTERO¹, Nayara Cristina Perez de ALBUQUERQUE¹, Ana Luisa Abrahao DIAS², Nathalia De Carvalho INDOLFO², Tabata Renee DORATIOTO², Kelen Fabíola ARROTEIA², Melissa Dibbernn GANZERLA², Franciane MARQUELE-OLIVEIRA¹

¹Eleve Science Pesquisa e Desenvolvimento, Supera Parque Tecnológico, Ribeirão Preto - SP, Brasil. E-mail: franciane.oliveira@elevescience.com;

²Natura Cosméticos, Cajamar, São Paulo, Brasil

Introduction: The sensitization substance causes allergic response in organism. Considering the importance of marketing safe products, the use of *in vitro* safety assays for the evaluation of sensitization endpoints helps in the development of safe formulations. In this regard, OECD has published several methods to evaluate Adverse Outcome Pathway of sensitization endpoints employing 3R's methods.

Aim: Perform a scientific validation of a new *in vitro* method able to detect the sensitizing effect of substances based on the Keratinocyte activation Key Event. The assay employed Eleve Science®-RHE model and followed the sensitization OECD approach and scientific literature.

Material and Methods: The RHE model was submitted to proficiency substances to sensitization endpoints evaluation. In this protocol, it was used two sensitizing chemicals (DNCB and Cinnamaldehyde) and one non sensitizing chemical (SDS). Solutions of DNCB (1 and 10 mg/mL), Cinnamaldehyde (2 and 5 mg/mL), SDS (2.5 and 5 mg/mL) and the negative control (DMSO 1%: DMEM) were applied topically at RHE model. After 24 hours of exposure at 37°C, 5% CO₂, one model was used to morphological evaluation. For the evaluation of sensitizing potential, the conditioned medium was collected to Interleukin 8 quantification using ELISA assay. To consider a sensitizing potential, the Stimulation Index was calculated, it was considered a sensitization potential the Stimulation Index ≥ 2 . Results: DNCB and Cinnamaldehyde showed sensitizing potential with Stimulation Index ≥ 2 at the two concentrations used. On the other hand, SDS showed Stimulation Index < 2 , therefore, no concentration used shows sensitizing effect. Additionally, the morphological evaluation indicated cell death with changes in morphology tissue for sensitizing substances. **Conclusions:** The method was able to differentiate among sensitizing and non-sensitizing substances and the quantification of Interleukin 8 proved to be a good biomarker to evaluate sensitizing effect. The responsiveness of ES®-RHE model indicates the potential of the *in vitro* method to evaluate sensitizing effects of substances and cosmetic ingredients attending the second key of Adverse Outcome Pathway described in sensitization OECD guidelines, as well as it indicates the opportunity of employing this method as a valuable tool during the development of safe cosmetic products for society.

Key words: Adverse Outcome Pathway. Alternative Methods to Animal Testing. 3D Skin.

Acknowledgements: FAPESP, FINEP.

94 | REDUÇÃO DO TEMPO DO TESTE DE POTÊNCIA DOS PLASMAS DE EQUÍDEOS PRODUTORES DE SOROS ANTIOFÍDICOS

Francisco Eduardo de PONTES¹, Patricia Neves Castanheira de SOUZA¹, Nathalia de Souza MACHADO¹, Vera Lúcia Gomes MACHADO¹, Luiz Carlos de Oliveira NEVES¹, José Renato Duarte FAJARDO^{1,2}

¹Instituto Vital Brazil; ²Universidade Federal Fluminense

E-mail autor correspondente: pontes07@yahoo.com.br

Introdução: O Guia da Organização Mundial da Saúde (OMS), que trata da Produção e Controle de Soros Antiofídicos, recomenda a adoção dos Princípios dos 3Rs (*Reduction, Refinement, Replacement*) pelos fabricantes de soros antiofídicos. O refinamento pode ser introduzido em métodos em que os animais ainda não foram substituídos ou o seu número reduzido. O refinamento, entendido como aprimoramento de um método, pode ter como objetivo diminuir o sofrimento animal e pode ser obtido através da redução do tempo de conclusão de um teste (*Humane Endpoint*).

Objetivos: Avaliar a possibilidade de redução do tempo de conclusão do Teste de Potência Mínima dos plasmas de equídeos produtores de soros antiofídicos. **Material e Métodos:** Foram avaliados os resultados dos Testes de Potência Mínima dos plasmas de equídeos produtores de soros antiofídicos do Instituto Vital Brazil das Tropas Antibotrópica (n=98) e Anticrotálica (n=61) de 2023, nos tempos de observação 6/24/48 horas. O teste avaliado utiliza camundongos como modelo animal, onde o produto da soroneutralização (veneno específico + amostra de soro) é inoculado por via intraperitoneal com leitura final de camundongos sobreviventes em 48 h; os equídeos são aprovados para doação de plasma caso o número de sobreviventes seja $\geq 50\%$ dos animais testados. O Coeficiente Kappa de Cohen (k) mede a confiabilidade na concordância dos resultados quando dois avaliadores são comparados, excluindo o acaso, e foi utilizado na comparação do número de equídeos que seriam aprovados e reprovados em diferentes tempos (6h x 48h e 24h x 48h). **Resultados:** As tropas antibotrópica e anticrotálica, na comparação entre 24h x 48h, apresentaram máxima confiabilidade (100% de concordância – k=1,0), indicando a possibilidade de diminuição pela metade do tempo de sofrimento animal. Os valores de k entre os tempos 6h x 24h foi de 0,56 (Antibotrópico) e de 0,82 (Anticrotálico), não sendo aconselhável uma redução do tempo de conclusão do teste para 6 h. **Conclusão:** É possível reduzir para 24h o tempo de conclusão do Teste de Potência Mínima com total confiabilidade nas duas tropas avaliadas, não sendo recomendada reduzir para 6h. A redução para 24h representaria diminuição significativa do tempo de sofrimento animal.

Palavras-chave: Antibotrópico. Anticrotálico. Antiofídico. Refinamento. Soros.

Aprovação CEUA-Instituto Vital Brazil n° 0011/22.



95 | REFINAMENTO, REDUÇÃO OU SUBSTITUIÇÃO NOS MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS RECONHECIDOS PELO CONCEA

Desenir Adriano PEDRO1,4*, Julio Cesar Queiroz PENHA2,4, Renato de Souza ABOUD2, Maria Lucia BARRETO3, Helena Carla CASTRO4

¹Comissão de Ética no Uso de Animais, Pró-Reitoria de Pesquisa, Universidade Estadual de Campinas - Unicamp, Campinas, São Paulo, Brasil. ²Núcleo de Pesquisa em Animais de Laboratório, Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Universidade Federal Fluminense - UFF, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. ³Departamento de Imunobiologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense - UFF, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. ⁴Programa de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia - PPBI, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense - UFF, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil.

E-mail autor correspondente: desenirbio@gmail.com

Introdução: As entidades brasileiras que promovem, desenvolvem e validam os métodos alternativos ao uso de animais são o Brazilian Center for the Validation of Alternative Methods (Bracvam) e a Rede Nacional de Métodos Alternativos (Renama). O reconhecimento e a regulamentação das metodologias são atribuídos ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea). O Conselho reconheceu, nas Resoluções Normativas de n.º 18, 31, 45 e 56, o total de 41 metodologias alternativas baseadas em 39 ensaios publicados pela Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), um apresentado na Farmacopeia Brasileira e um na Farmacopeia Europeia, com descrição em estudos da Fiocruz. As alternativas ao uso de animais de laboratório visam: refinar os procedimentos, minimizando o sofrimento dos animais; reduzir o número utilizado para a quantidade estritamente necessária; ou substituir os animais, parcial ou integralmente, por metodologias validadas. **Objetivos:** Este resumo tem como objetivo identificar dentre os 41 métodos alternativos reconhecidos no Brasil pelo Concea quantos substituem total ou parcialmente os animais nas pesquisas e quantos reduzem e/ou refinam o seu uso. **Material e Métodos:** As diretrizes das metodologias foram consultadas nas páginas eletrônicas da OECD, da Farmacopeia Brasileira e da Fiocruz. Com base na "Análise de Conteúdo de Bardin", foram selecionadas e registradas as informações de interesse, referentes aos biomodelos e aos insumos empregados em cada método. Em seguida, os dados foram agrupados e quantificados. **Resultados:** Das 41 alternativas reconhecidas, as com maior representatividade foram as substitutivas totais ou parciais, correspondendo a 80%(33/41) dos métodos, enquanto 20%(8/41) reduzem e/ou refinam o uso de animais ao empregarem modelos vertebrados vivos. **Conclusão:** A maioria dos métodos alternativos ao uso de animais reconhecidos no Brasil são os substitutivos. Nem todas promovem a substituição integral dos animais ou de seus produtos em pesquisas, mas as 41 metodologias reconhecidas pelo Concea estão em consonância com o Princípio dos 3Rs, pois também permitem reduzir o número de animais utilizados e refinar as técnicas empregadas nos experimentos.

Palavras-chave: 3Rs. Animais de laboratório. Bracvam. Brasil. Renama.

96 | SUBSTITUIÇÃO DO SORO FETAL BOVINO POR PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO ISOLAMENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DE CORDÃO UMBILICAL

Almir Jordão da Silva JUNIOR², Ana Carolina Borges CAMPOS¹, Paula Lopes CASCABULHO¹, Juliana Ferreira VASQUES², Ronaldo José Farias Corrêa DO AMARAL¹, Rosália MENDEZ-OTERO².

¹Laboratório de Proliferação e Diferenciação Celular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro; ²Laboratório de Neurobiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Introdução: O uso de soro fetal bovino (SFB) em culturas celulares é controverso devido à forma como é obtido, por meio da punção cardíaca em fetos bovinos sem anestesia, e à alta variação entre lotes. Além disso, sua origem animal pode restringir sua aplicação em contextos clínicos. O plasma rico em plaquetas (PRP), um concentrado de plaquetas em pequeno volume de plasma, se apresenta como uma possível alternativa ao SFB, obtendo resultados promissores no que diz respeito a sua capacidade de promover a proliferação celular. Ademais, há indícios de que as vesículas extracelulares (EV) originadas de células estromais mesenquimais (MSC) desempenham funções análogas às das próprias MSC. Elas carregam moléculas bioativas destinadas às células-alvo, capazes de modificar seu fenótipo ou seu comportamento funcional.

Objetivos: Modular a secreção e o conteúdo das EV secretadas por MSC derivadas de cordão umbilical através de meios de cultura suplementados com diferentes concentrações de PRP, em substituição ao SFB, visando aumentar seu potencial terapêutico para que possam ser posteriormente utilizadas no desenvolvimento de um novo tratamento para osteoartrite.

Material e Métodos: As EV foram isoladas do sobrenadante de culturas de células de cordão umbilical por ultracentrifugação e caracterizadas quanto ao tamanho e concentração pela técnica de Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA). Análises adicionais, incluindo a Microscopia Eletrônica de Transmissão, para avaliar a morfologia; qPCR, para expressão de miRNAs modificados durante a osteoartrite (miR-140 e miR-337); e Western Blot, para expressão de proteínas típicas de vesículas (CD9, CD63 e CD81), estão em andamento. **Resultados:** A técnica de NTA indicou ser viável isolar quantidades semelhantes de vesículas extracelulares a partir do sobrenadante da cultura de MSC de cordão umbilical, quando suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB) em comparação com a suplementação de 2,5% PRP ($p > 0,05$). Adicionalmente, verificou-se que as vesículas isoladas apresentaram um tamanho semelhante em ambos os cenários (SFB: 131 ± 11 nm; PRP: 126 ± 21 nm). **Conclusão:** Há possibilidade de substituir o uso do SFB, um produto xenogênico, por PRP, de origem humana, para obtenção de vesículas extracelulares de MSC de cordão umbilical humano.

Palavras-chave: Células Estromais Mesenquimais. Plasma Rico em Plaquetas. Vesículas Extracelulares.

Órgãos de fomento ou financiadores: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). FAPERJ (Programa Jovem Cientista do Nosso Estado). Rede Nano Saúde.



97 | TOXICIDADE DAS CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS DE 2-HIDROXICALCONA CONTRA *Paracoccidoides brasiliensis* EM *Galleria mellonella* e *Caenorhabditis elegans*.

Ana Karla Lima Freire CABRAL^{1,2}, Beatriz Chiari Manzini BUGALHO¹, Lígia de Souza FERNANDES¹, Laís de Almeida CAMPOS³, Kaila Petronila Medina-Alarcón¹, Marcos William de Lima GUALQUE¹, Luis Octávio REGASINI⁴, Ana Marisa FUSCO-ALMEIDA¹, Maria José Soares MENDES-GIANNINI¹

¹ Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - FCF/UNESP - Campus de Araraquara, SP. ² Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal do Amazonas - FCF/UFAM. ³ Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO, Campus de Guarapuava-PR. ⁴ Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho" - IBILCE/UNESP - Campus de São José do Rio Preto, SP.

E-mail autor correspondente: gianninimj@gmail.com

Introdução: Chalconas são compostos precursores da biossíntese de flavonoides e que demonstram diversas propriedades farmacológicas, dentre elas, atividades antimicrobianas. **Objetivos:** Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de 2-hidroxicalcona em células planctônicas de *P. brasiliensis* e avaliar a toxicidade das concentrações em larvas de *G. mellonella* e *C. elegans*. **Material e Métodos:** A CIM foi determinada por microdiluição em série (0,12 - 62,5 µL/mL), conforme o protocolo M37-A2 (CLSI, 2008), em meio RPMI, utilizando-se a cepa de *P. brasiliensis* S1 isolado 18 (Pb18). O Índice Geral de Saúde (IGS) de *G. mellonella* foi determinado nestes grupos: Saúde (sem injeção), grupo PBS (controle de diluente), grupo Anfotericina B (AmB) (controle de fármaco - 8 µg/mL) e grupo 2-Hidroxicalcona (0,24 a 1,92 µg/mL). Após a injeção das substâncias, grupos de 20 larvas de *G. mellonella* foram monitoradas diariamente quanto aos seguintes atributos: atividade, formação de casulo, melanização e sobrevivência, sendo fornecida uma pontuação para cada um destes. A densidade dos hemócitos de *G. mellonella* foi verificada após 24 h do tratamento com 2-hidroxicalcona e AmB, realizando coleta de hemolinfa e diluição em PBS gelado (1:20) e contado em hematocitômetro. *C. elegans* (N2 e AU37) (n=20, cada) foram avaliadas quanto à frequência da taxa de sobrevivência, em faixa de concentração de 0,12 a 61,4 µg/mL. **Resultados:** A CIM de 2-hidroxicalcona frente às células planctônicas de Pb18 foi 0,96 µg/mL e de AmB foi 0,12 µg/mL. Quanto ao IGS de *G. mellonella*, os grupos Saúde e PBS apresentaram scores de 8,3 a 9 pontos e a do grupo com menor score foi com 2-hidroxicalcona (1,92 µg/mL): 6 pontos. A contagem de hemócitos foi diretamente proporcional ao aumento das concentrações dealcona, sendo de 9,28x10⁷ células/mL para AmB e 12,4x10⁷ células/mL em média para 2-chalcona. Quanto a *C. elegans*, a cepa AU37 demonstrou uma taxa de sobrevivência maior em torno da CIM para 2-hidroxicalcona (96%), ao passo que N2 apresentou uma frequência de 92,6% de larvas vivas. **Conclusão:** Os resultados demonstram que *G. mellonella* e *C. elegans* são modelos rápidos e úteis para avaliar a toxicidade de substâncias que podem ser usadas no tratamento de doenças fúngicas.

Palavras-chave: *Caenorhabditis elegans*. Chalcona. *Galleria mellonella*. *Paracoccidoides*.

Órgãos de fomento ou financiadores: CNPq, processo 310524/2018-0 e 431455/2019-0.

98 | TRANSCRIPTOMIC AND BIOINFORMATIC EVALUATION OF COSMETIC ACTIVE INGREDIENTS IN THE EPIDERMIS: PROSPECTION OF NEW BIOMARKERS

Tugstênio Lima de Souza¹, Carolina Motter CATARINO¹, Ariane Caroline Campos PASCHOAL¹, Bruna BOSQUETTI¹, Meg Cristina de Castilho COSTA¹, Andrezza Di Pietro Micali CANAVEZ¹, Desirée Cigaran SCHUCK¹

¹ Safety Assessment Management - Grupo Boticário, São José dos Pinhais - PR

Introduction: Considering the continuous advance of the cosmetics industry, the search for new biomarkers capable of evaluating the efficacy of products without the use of animals has become a topic of significant importance. In this context, transcriptomic bioinformatics tools have emerged as crucial resources fulfilling this objective. The integration of information available in databases enables comprehensive analysis of gene expression profiles, making it possible to identify differentially regulated genes and relevant biological pathways. Results obtained from high throughput techniques, such as microarray, allow the biological activity of active ingredients to be evaluated in an integrated manner, enabling the discovery of innovative biomarkers for evaluating the efficacy of cosmetic products. **Objectives:** Identification of new biomarkers for validating the efficacy of cosmetic products using a microarray database, to understand the response of epidermal cells after exposure to skin care actives. **Material and Methods:** Dataset GSE155789 was obtained from the NCBI-GEO database, which consists of an *in vitro* experiment where Immortalized human keratinocytes (hTERT) were treated with 100nM retinyl propionate (RP) or 100nM retinol (RT) for 24 hr and analyzed by microarray on the GeneTitan U219 array platform. The data was then evaluated using the R package bioconductor - limma to compare the experimental conditions. Volcano plot and venn diagram analyses were used to obtain the genes that were significantly (padj. <0.05) differentially expressed. **Conclusion:** The analyses demonstrated at least two potential specific biomarkers for RP and RT using the following biological processes: skin barrier establishment (RP: *cldn4*, *grhl3*; RT: *cldn1*, *stard7*), linoleic acid metabolism (RP: *fads1*, *fads2*; RT: none), keratinocyte proliferation (RP: *efnb2*, *mdk*; RT: *sdr16c5*, *areg*), skin development (RP: *itgb6*, *aqp3*; RT: *cnfn*, *ltb*), keratinization (RP: *krt6b*, *tmem79*; RT: *lce3d*, *spr2e*), ceramide metabolism (RP: *itgb8*, *sphk1*; RT: *b4galt6*, *degs1*) and tissue anchoring (RP: *marveld3*, *mpp7*; RT: *cdc45*, *sna12*). Based on these results, the genes evaluated could, in the future, be considered potential biomarkers for evaluating the efficacy of skin care cosmetic products in validating and attributing new claims to the product.

Key words: Gene expression. Retinol. Retinyl propionate. Skin. Transcriptomics.

Sponsor: Grupo Boticário.



99 | TREINAMENTO E IMPLEMENTAÇÃO DE UM MODELO DE EPIDERME HUMANA RECONSTRUÍDA (RHE) PARA AVALIAR IRRITAÇÃO CUTÂNEA NA ARGENTINA

Julieta Roco^{1,2}, Mariela Lenze^{1,2}, Martina Benedetti^{1,2}, Rodrigo De Vecchi^{3,4}, María Laura Gutiérrez^{1,2}

¹ CONICET, Argentina;

² Instituto de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina;

³ EPISKIN Brasil Biotecnología, Río de Janeiro, Brasil

⁴ L'Oréal Brasil Pesquisa & Inovação

A implementação de métodos alternativos ao uso de animais para fins regulatórios na Argentina é incipiente. Embora ainda não existam restrições a nível regulatório, a pressão social e os avanços em questões regulatórias em outros países levaram à necessidade de metodologias não animais para avaliação de produtos cosméticos. Diante da tendência mundial de substituição, foi criado na Argentina o primeiro Laboratório de Métodos Alternativos (LMA-EBAL) com o objetivo de implementar, desenvolver e treinar metodologias *in vitro*. Nesse sentido, organizamos o primeiro workshop prático do SkinEthic™ OECD TG 439 para Teste de Irritação Cutânea no país. A capacitação foi ministrada por Rodrigo De Vecchi e María Laura Gutiérrez; contou com a presença de reguladores e especialistas da Administração Nacional de Medicamentos, Alimentos e Tecnologia Médica (ANMAT), do Instituto ANLIS Malbrán, pesquisadores do CONICET, professores da UBA, da indústria farmacêutica e cosmética, laboratórios de testes e representantes da Argentina Câmara da Indústria de Cosméticos e Perfumaria (CAPA). Na primeira implementação da metodologia no LMAEBAL, o potencial de irritação cutânea produzido por 14 produtos cosméticos AIN VEGAN foi avaliado de acordo com a diretriz OCDE TG439. O sucesso desta experiência é importante para a Argentina, pois o treinamento foi muito popular e a implementação permitiu testar o sistema de importação SkinEthic da Episkin Brasil.

Palavras-chave: Treinamento. Argentina. Implementação. Epiderme Humana Reconstruída.

Órgãos de fomento ou financiadores: L'Oréal Brasil Pesquisa e Inovação. CONICET - Conselho Nacional de Pesquisas Científicas e Técnicas, Argentina.

100 | UMA ABORDAGEM TECNOLÓGICA AVANÇADA PARA A AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE CELULAR: INTRODUZINDO A PLATAFORMA SAEDC

Bernardo ZOEHLER¹, Alessandra Melo de AGUIAR^{2,3}, Guilherme Ferreira SILVEIRA¹

¹Instituto Carlos Chagas – ICC, Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz.

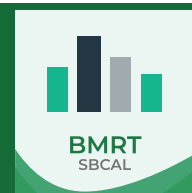
²Plataforma de Bioensaios com métodos alternativos em citotoxicidade, Instituto Carlos Chagas – ICC, Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz.

³Laboratório de Biologia Básica de Células-tronco, Instituto Carlos Chagas – ICC, Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz.

Introdução: As agências reguladoras Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) e Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) desenvolveram diretrizes de uso de modelos *in vitro* para predição de toxicidade de compostos. Entretanto, algumas limitações técnicas são a presença de etapas manuais e a necessidade de várias ferramentas para a análise de dados. Além de custoso e demorado, isso permite a introdução inadvertida de erros pelos usuários durante o processo. **Objetivos:** Assim, desenvolvemos a plataforma SAEDC (Solução Tecnológica para Análise Exploratória de Dados e Estatísticas em Citotoxicidade), que possibilita a análise de dados de citotoxicidade de ensaios seguindo o Documento Guia No. 129 da OECD. **Material e Métodos:** Para avaliar a eficácia, utilizamos dados experimentais *in vitro* seguindo o protocolo estabelecido e comparamos com a metodologia padrão de análise de dados. Foram analisados 117 conjuntos de dados abrangendo compostos da Categoria I à Categoria não classificada de acordo com a classificação GHS. **Resultados:** Os parâmetros da regressão não linear (4PL) calculados pela plataforma SAEDC não apresentaram diferenças significativas em comparação com a metodologia padrão em nenhum dos conjuntos de dados ($p > 0.05$). O coeficiente de determinação (R-quadrado) também demonstrou não apenas um bom ajuste dos parâmetros ao modelo 4PL, mas também uma similaridade significativa com os valores obtidos pela metodologia convencional. Por fim, a plataforma SAEDC previu valores de DL50 para os compostos, convertendo EC50 em IC50, utilizando os modelos de regressão RC (Registro de Citotoxicidade) exclusivos para ratos. **Conclusão:** A comparação com a metodologia padrão de análise de dados revelou que a plataforma SAEDC atende aos requisitos para a análise de dados de citotoxicidade, gerando resultados confiáveis e precisos com menos etapas desempenhadas pelos pesquisadores. O uso da plataforma SAEDC para obter valores de toxicidade pode reduzir o tempo de análise em 10 a 30 vezes em comparação com a metodologia padrão proposta pelas agências reguladoras. Assim, a automação do processo de análise usando a plataforma SAEDC tem o potencial de economizar tempo e recursos para pesquisadores e laboratórios de citotoxicidade, ao mesmo tempo que gera resultados confiáveis

Palavras-chave: Análise de dados. Citotoxicidade. Toxicidade oral aguda.

Órgãos de fomento ou financiadores: CAPES (Financing Code 001)



101 | USING *Caenorhabditis elegans* TO INVESTIGATE ANTI-HYPERPLASIA EFFECTS OF LIPOSOMES LOADED WITH *B. glabra* Choisy EXTRACT

Flávia Suelen DE OLIVEIRA PEREIRA¹, Maria Eduarda Oliveira DE SOUZA¹, Gabriel Pedroso VIÇOZZI², Aline CAURIO¹, Elton Luis Gasparotto DENARDIN¹, Daiana Silva ÁVILA^{1,2}

¹ Federal University of Pampa (UNIPAMPA), Uruguaiana, Brasil-RS;
² Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Brasil-RS;

Introduction: Cancer is a disease that affects millions of people annually worldwide. The treatment available for this disease presents high side effects and inefficacy in the metastasis process. For this reason, it is necessary to investigate new potential drugs with lower toxicity and efficacy in cancer models. The use of transgenic mammals to study cancer pathways is onerous, being the use of alternative animals, as *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) a suitable option. **Objectives:** To investigate the safety and efficacy of liposomes loaded *Bougainvillea glabra* Choisy (BGC) extract to attenuate the hyperplasia phenotype in *C.elegans* strain with a *let-60* gain-of-function (*gf*) as a cancer model. **Material and Methods:** The strain MT4244 [*unc-24(e138) let-60(n1046) IV*] was submitted to a chronic treatment with BGC extract and liposomes at first larval stage (L1). After 48 hours of treatment, we performed the survival rate to evaluate the safe concentrations and then elaborated the liposomes formulation to increase the concentration range (without toxicity) to be tested. The efficacy of liposomes loaded with BGC to reduce the multi-vulva (*muv*) phenotype, reproductive parameters and extend the longevity was evaluated. Using strains MD701 (*bcls39 [lim-7p::ced-1::GFP + lin-15(+)]*) and CL2166 (*dvl19 [(pAF15)gst-4p::GFP::NLS] III*) we evaluated apoptotic activation and antioxidant effects, respectively. The data were analyzed using GraphPad Prism 8.0.2 with the statistical test adequate to each assay and was considered a significant difference when p values were <0.05. **Results:** The liposomes formulation was able to decrease the toxicity of extract. In addition, a decrease in hyperplasia phenotype, through apoptotic activation, was observed. The worms showed an extension of their longevity probably due to the reduced phenotype and increase in stress response (GST-4). **Conclusion:** These results indicate the potential anti-tumoral effects of liposomes loaded BGC extract, with low toxicity, in an in vivo cancer model related to the RAS pathway, which is involved in several human cancers.

Key words: alternative model. *daf-16*. *ced-7*. *gst-4*. *let-60*.

Funding: CAPES and CNPq.

102 | USO DE NEW APPROACH METHODOLOGIES PARA AVALIAÇÃO DE RISCO DE (FOTO)MUTAGENICIDADE E FOTOTOXICIDADE DE AGROQUÍMICOS

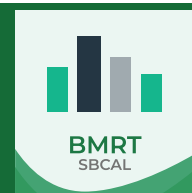
Raiane Rosales Diniz^{1,2}, Thaisa Francielle Souza Domingos³, Gabriel Reis Pinto⁴, Lucio Mendes Cabral⁴, Marcelo de Pádula² e Alessandra Mendonça Teles de Souza¹.

¹Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Laboratório de Modelagem Molecular & QSAR, RJ, Brasil; ²Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Laboratório de Microbiologia e Avaliação Genotóxica, RJ, Brazil; ³GrowingHub Desenvolvimento e Gestão de Projetos, SP, Brazil; ⁴Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Laboratório de Tecnologia Industrial Farmacêutica, RJ, Brazil

Introdução: A extensão do uso de agroquímicos aumenta o alerta sobre a sua toxicologia ambiental, animal e principalmente humana. Nesse contexto, o desenvolvimento de *New Approach Methodologies (NAMs)* na avaliação de risco incluindo novos testes *in vitro* e *in silico* é encorajado. Uma abordagem alternativa complementar aos testes de mutagenicidade já bem estabelecidos poderia contribuir para aumentar a confiabilidade e reduzir os resultados falso-positivos que levam ao uso desnecessário de animais em testes in vivo confirmatórios. Adicionalmente, a implementação de métodos de toxicologia *in silico* contribuiria para uma avaliação preliminar sustentável, de baixo custo, mais robusta e confiável. Com relação à fototoxicidade, não é razoável subestimar os efeitos fototóxicos de uma exposição dérmica acidental a agroquímicos durante a aplicação agrícola ou doméstica sem equipamento de proteção individual adequado, especialmente em termos de fotomutagenicidade. **Objetivos:** Neste cenário, foi proposta a integração de técnicas *in vitro* e *in silico* como NAMs para avaliar o potencial mutagênico e fototóxico de agroquímicos. **Material e Métodos:** O método *in vitro* proposto utilizou *Saccharomyces cerevisiae* como biomodelo. Inicialmente, o método foi desenvolvido, otimizado e desafiado com controles positivos e negativos. Após confirmada a sensibilidade de resposta do biomodelo, o método *in vitro* foi utilizado para a avaliação da (foto) mutagenicidade de 5 agroquímicos, na ausência e na presença de Luz Solar Simulada. Paralelamente, foram conduzidas análises *in silico* combinando modelos estatísticos e baseados em alertas estruturais para a predição de mutações gênicas e fototoxicidade. **Resultados e discussão:** Nenhum dos agroquímicos testados apresentou potencial mutagênico nas duas abordagens propostas. Entretanto, os herbicidas glifosato e ácido 2,4 diclorofenoxiacético foram fotomutagênicos para o teste *in vitro* com *S. cerevisiae*, apesar da predição *in silico* negativa para fototoxicidade. O modelo *in silico* disponível é baseado no ensaio de fotocitotoxicidade *in vitro* 3T3 NRU, que apresenta limitação para detecção de fotomutagenicidade. Tais resultados sugerem a complementariedade das abordagens *in vitro* e *in silico* propostas mostrando-se alternativas promissoras na avaliação preliminar da mutagenicidade e fototoxicidade de agroquímicos. **Conclusão:** O conjunto de resultados destacam a importância de investigar e reconsiderar a avaliação da fotosegurança desses produtos, não apenas por ensaios de fotocitotoxicidade, mas de fotomutagenicidade, fornecendo NAMs para a investigação desses desfechos.

Palavras-chave: Agroquímicos. (Foto)mutagenicidade. *In vitro*. *In silico*. *New Approach Methodologies (NAMs)*.

Órgãos de fomento ou financiadores: FAPERJ (E-26/202.742/2019 e E-26/203.162/2019) e CNPq (312878/2022-2).



103 | ZEBRAFISH AS A MODEL TO DETECT CHANNEL INHIBITION CARDIOTOXICITY

Hirla FUKUSHIMA¹, Carine DREWES², Izabel Vianna VILLELA³, Miriana da Silva MACHADO³, Gabriela BARREIRO², Ricardo Carneiro BORRA¹

¹Federal University of São Carlos – UFSCAR - Applied Immunology Laboratory (São Carlos, SP, Brazil). carine.drewes@eurofarma.com
²Eurofarma Laboratórios S.A. (São Paulo, SP, Brazil); ³InnVitro Pesquisa & Desenvolvimento - Support and Management in Toxicology (Porto Alegre, RS, Brazil);

Introduction: Unexpected cardiotoxicity is one of the most significant adverse effects responsible for drug failure in the clinical stage and post-marketed withdrawals. Industries have used *in vitro* and *in vivo* methods to identify potential cardiotoxic molecules in the early stage of development to get safer drug candidates into clinical trials. Zebrafish model is a good predictor of drug safety, with a high correlation with murine models and humans. Interestingly, cardiovascular physiology is highly conserved between humans and zebrafish at anatomical, cellular, and membrane biology levels. Like humans, zebrafish have the same length of the QT interval, heart rate, and clear P, QRS, and T waves. In addition, zebrafish have similar current systems (INa, ICaL, and IK) present in atrial and ventricular human cardiomyocytes, allowing the prediction of drug effects on several ion channels. **Aim:** The present work aimed to evaluate the cardiotoxic effects of human Nav1.5, hERG, Cav1.2, or β -adrenergic channels inhibitors in zebrafish larvae model. **Material and Methods:** Zebrafish 96 hpf larvae (n=12) were exposed for 4 hours to various concentrations of 14 recognized cardiotoxic drugs that inhibit human Nav1.5, hERG, Cav1.2 channels or β -adrenergic receptors. After drug exposure, 12 variables related to time series analysis for characterization of cardiac motion dynamics, such as heart rate (HR) or heart rhythm parameters (SDHR, RR, SD1, SD2, SD1SD2, S, SampEn, BubbleEn, SVDEn, ApEn and SpcEnt), were measured in duplicate at different periods. **Results:** The 14 human cardiotoxic drugs were able to induce alterations in at least one heart rate or heart rhythm parameters in zebrafish larvae. In addition, stronger zebrafish cardiac alterations were detected when larvae were exposed to hERG inhibitors when compared to Cav1.2 or Nav1.5 inhibitors. **Conclusion:** Results demonstrated that the analysis of the 12 heart rate or heart rhythm cardiac parameters in zebrafish larvae model was able to detect cardiotoxicity induced by recognized human cardiotoxic drugs. Furthermore, the zebrafish larval model showed different sensitivities to specific channel inhibition, demonstrating higher sensitivity to hERG, followed by Cav1.2 and β -adrenergic, and Nav1.5 blockers. Thus, zebrafish larvae model has a good potential to detect cardiotoxicity induced by ion channel inhibitors.

Key words: Cardiotoxicity. Ion channels. NAM, Zebrafish.

Funding: Eurofarma Laboratórios S.A (São Paulo, SP, Brazil).