



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

KIMBERLY KEFANNY BATISTA MIRANDA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE PARAFENILENODIAMINA EM PRODUTOS
COSMÉTICOS – UMA REVISÃO SISTEMÁTICA.**

Brasília - DF

2025



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

KIMBERLY KEFANNY BATISTA MIRANDA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE PARAFENILENODIAMINA EM PRODUTOS
COSMÉTICOS – UMA REVISÃO SISTEMÁTICA.**

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da
Universidade de Brasília, como
requisito para obtenção do título
de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.**

**Orientadora: Maria de Fátima
Borin**

Brasília - DF

2025

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

KIMBERLY KEFANNY BATISTA MIRANDA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE PARAFENILENODIAMINA EM PRODUTOS
COSMÉTICOS – UMA REVISÃO SISTEMÁTICA.**

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da
Universidade de Brasília, como
requisito para obtenção do título
de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.**

BANCA EXAMINADORA

Brasília, 26 de fevereiro de 2025

Maria de Fátima Borin (UnB)

Patrícia Medeiros de Souza (UnB)

Simone Batista Pires Sinoti (SEE-DF)

Paula Maria Quaglio Bellozi (UnB) – Suplente

Dedico este trabalho a Deus e a Nossa Senhora; aos meus pais, por todo o esforço, motivação, carinho e amor; às minhas irmãs e sobrinhos, por sempre me acolherem com os melhores sorrisos; e ao meu noivo, por ser meu porto seguro nessa jornada e meu apoiador incondicional em todas as horas.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus e a Nossa Senhora de Aparecida, por me permitir viver intensamente cada uma das minhas realizações, com saúde, fé e determinação.

Aos meus pais, Nilson e Irene, minha gratidão é imensurável. Obrigada por acreditarem em cada um dos meus sonhos e por me guiarem com amor, ensinando-me a viver cada momento com intensidade, fé e valores sólidos. Vocês são a base e a inspiração que me motivam a ser a melhor versão de mim mesma. Sem o apoio incondicional, os conselhos e o amor genuíno de vocês, nada disso teria sido possível. Sou eternamente grata por tudo que fizeram e continuam fazendo por mim.

Às minhas irmãs, Kélbya e Scarlett, agradeço pela amizade, pelo carinho e por todo o companheirismo. Vocês estão sempre atentas, me lembrando até de beber água nos dias longos de trabalho. A cada lembrança, sinto o cuidado e o amor genuíno de vocês.

Aos meus sobrinhos, Davi, Arthur e Victor, por encherem meus dias de alegria, paz e risadas, especialmente nos momentos mais desafiadores. A presença de vocês renova minhas forças e ilumina qualquer dia difícil.

À minha família do coração – Ana, André e Sonia –, por todo o incentivo, acolhimento e amizade. Suas palavras e gestos de apoio foram essenciais ao longo desse percurso.

Agradeço à minha segunda autora, Hanna. Sua parceria e apoio foram essenciais para tornar este trabalho ainda mais completo e especial.

Ao meu noivo, Luiz Felipe, minha fonte de força e serenidade ao longo dessa jornada. Obrigada por estar presente em cada passo, enfrentando comigo os momentos de estresse, medo e ansiedade, e por celebrar comigo cada pequena vitória. Seu apoio inabalável e amor constante foram a base que sustentou minhas conquistas. Agradeço profundamente por você ser meu porto seguro e por acreditar em mim até nos dias em que duvidei de mim mesma.

Agradeço especialmente à minha professora e orientadora, Maria de Fátima Borin, meu reconhecimento e apreço sinceros. Desde o início, sua confiança no meu potencial, sua paciência e seus ensinamentos foram fundamentais para a construção deste trabalho. Obrigada por cada orientação cuidadosa, por cada palavra de incentivo e por compartilhar comigo sua experiência e sabedoria. Seu apoio foi imprescindível para a realização desse sonho.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, por meio do Código de Financiamento 001.

**Não desista. Geralmente é a última chave do
chaveiro que abre a porta.**

Paulo Coelho.

RESUMO

O uso crescente de cosméticos decorativos tem gerado preocupações sobre a exposição crescente a compostos presentes em suas formulações. Muitos desses compostos são considerados inertes em baixas concentrações, mas o uso excessivo pode levar à exposição acima dos limites seguros. O objetivo desta revisão sistemática foi avaliar a toxicidade da parafenilenodiamina (PPD), amplamente utilizada em cosméticos, a fim de verificar se a concentração atualmente permitida está associada a casos de toxicidade. O uso da PPD tem sido relacionado a reações alérgicas cutâneas, como dermatite de contato, e a efeitos tóxicos sistêmicos, incluindo distúrbios gastrointestinais, angioedema, convulsões, tremores, dispneia, atrofia hepática, sonolência, insuficiência renal, parada cardíaca, urina escura e, em caso extremos, óbito. A revisão incluiu estudos pré-clínicos (*in vivo* e *in vitro*) e ensaios clínicos não randomizados, recuperados nas bases de dados PubMed, Embase, Scopus, Lilacs e Medline. Além disso, o Google Scholar foi utilizado para busca da literatura cinzenta. A coleta de dados foi realizada em 21 de agosto de 2023 e atualizada em 21 de junho de 2024. O protocolo da revisão sistemáticas para os ensaios clínicos não randomizados foi registrado no PROSPERO (CRD42024583665) e seguiu as diretrizes do PRISMA. A extração dos dados e a avaliação do risco de viés foram conduzidas por duas revisoras, sob supervisão de uma coordenadora. O risco de viés foi avaliado utilizando as ferramentas ROBINS-I (para estudos clínicos não randomizados), SYRCLE'S (para estudos *in vivo*) e QUIN TOOL (para estudos *in vitro*). Dos 2.463 artigos identificados, 1.120 foram mantidos após a remoção das duplicatas. Após a triagem por títulos e resumos, 136 artigos foram selecionados para leitura na íntegra, resultando em 90 estudos incluídos: 4 ensaios clínicos não randomizados, 27 estudos *in vivo*, 46 estudos *in vitro*, 11 estudos combinando *in vivo* e *in vitro* e 2 combinando ensaios clínicos não randomizados e estudos *in vitro*. Os resultados indicaram que a PPD é um sensibilizador cutâneo potente, sendo capaz de induzir dermatite de contato em concentrações de 0,1% e 0,003 mg (porquinhos-da-índia), 0,5% (humanos) e 1% (camundongos BALB/c, humanos) em teste de contato, relacionada a reações positivas e elicitação de dermatite de contato aguda. Além disso, a administração oral de 40 mg/kg causou convulsões em ratos; a concentração de 0,4% levou a degeneração gordurosa hepática em ratos; a administração subcutânea de 200 mmol/kg/dia resultou em necrose muscular em ratos; e doses de 1, 2 e 3 mg/kg por via oral provocaram alterações nos biomarcadores hepáticos e danos hepáticos em ratos Sprague-Dawley. Foram também identificadas reações cruzadas com outros alérgenos e o potencial efeito protetor do uso de antioxidantes, que foram capazes de mitigar algumas das reações adversas. Esses achados reforçam a necessidade de monitoramento contínuo dos limites seguros de PPD em cosméticos e a implementação de estratégias para reduzir seus riscos.

Palavras-chave: Revisão sistemática, parafenilenodiamina, PPD, cosméticos, toxicidade

ABSTRACT

The increasing use of decorative cosmetics has raised concerns about growing exposure to compounds present in their formulations. Many of these compounds are considered inert at low concentrations, but excessive use may lead to exposure beyond safe limits. The aim of this systematic review was to assess the toxicity of para-phenylenediamine (PPD), which is widely used in cosmetics, to determine whether the currently permitted concentration is associated with cases of toxicity. The use of PPD has been linked to allergic skin reactions, such as contact dermatitis, as well as systemic toxic effects, including gastrointestinal disorders, angioedema, seizures, tremors, dyspnea, liver atrophy, drowsiness, kidney failure, cardiac arrest, dark urine, and, in extreme cases, death. The review included preclinical studies (*in vivo* and *in vitro*) and non-randomized clinical trials, retrieved from the PubMed, Embase, Scopus, Lilacs, and Medline databases. Additionally, Google Scholar was used to search for gray literature. Data collection was conducted on August 21, 2023, and updated on June 21, 2024. The systematic review protocol for non-randomized clinical trials was registered in PROSPERO (CRD42024583665) and followed PRISMA guidelines. Data extraction and risk of bias assessment were carried out by two reviewers under the supervision of a coordinator. The risk of bias was evaluated using the ROBINS-I tool (for non-randomized clinical studies), SYRCLE's tool (for *in vivo* studies), and the QUIN TOOL (for *in vitro* studies). Of the 2,463 articles identified, 1,120 were retained after removing duplicates. After screening titles and abstracts, 136 articles were selected for full-text review, resulting in 90 included studies: 4 non-randomized clinical trials, 27 *in vivo* studies, 46 *in vitro* studies, 11 studies combining *in vivo* and *in vitro* approaches, and 2 studies combining non-randomized clinical trials with *in vitro* studies. The results indicated that PPD is a potent skin sensitizer, capable of inducing contact dermatitis at concentrations of 0.1% and 0.003 mg (in guinea pigs), 0.5% (in humans), and 1% (in BALB/c mice and humans) in patch tests, being associated with positive reactions and the elicitation of acute contact dermatitis. Additionally, oral administration of 40 mg/kg caused seizures in rats; a 0.4% concentration led to hepatic fatty degeneration in rats; subcutaneous administration of 200 mmol/kg/day resulted in muscle necrosis in rats; and oral doses of 1, 2, and 3 mg/kg caused alterations in liver biomarkers and liver damage in Sprague-Dawley rats. Cross-reactions with other allergens and the potential protective effect of antioxidants in mitigating adverse reactions were also identified. These findings reinforce the need for continuous monitoring of safe PPD limits in cosmetics and the implementation of strategies to reduce its risks.

Keywords: Systematic review, paraphenylenediamine, PPD, cosmetics, toxicity

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos relatados para a PPD em estudos <i>in vivo</i> (continua).	47
Tabela 2. Efeitos relatados para a PPD em estudos <i>in vitro</i> (continua).	69
Tabela 3. Efeitos relatados para a PPD em ensaios clínicos não randomizados.	87
Tabela 4. Análise do risco de viés dos estudos <i>in vivo</i> (continua).	92
Tabela 5. Avaliação do risco de viés dos estudos <i>in vitro</i> pela ferramenta QUINT TOOL (continua).	103
Tabela 6. Risco de viés devido a fatores de confusão dos ensaios clínicos incluídos na revisão (continua).	119
Tabela A1. Termos de busca usados em cada base de dados e números de artigos encontrados (continua).	142
Tabela A2. Artigos excluídos após a leitura na íntegra e motivos da exclusão.	146
Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para a revisão - Estudos <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> e ensaio clínico não randomizado (continua).....	151
Tabela A4. Perguntas do risco de viés ROBINS-I (continua).	188
Tabela A5. Perguntas do risco de viés SYRCLE'S TOOL (continua).	190
Tabela A6. Perguntas do risco de viés QUIN'S TOOL	192

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma do resumo do processo de triagem dos artigos selecionados para esta revisão.	45
Figura 2. Quantidade de artigos publicados por país no estudo realizado.	46
Figura 3. Resultado do risco de viés dos estudos <i>in vivo</i> incluídos na revisão.	99
Figura 4. Resultado da análise do risco de viés dos estudos <i>in vitro</i> – QUIN TOOL.	115
Figura 5. Avaliação do risco de viés dos artigos classificados como ensaios clínicos não randomizados.	124

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Descrição da busca de artigos.....	142
Anexo 2. Artigos excluídos da revisão e motivo da exclusão.....	146
Anexo 3. Resumo das principais informações de cada estudo incluído nesta revisão.	151
Anexo 4. Ferramenta para análise de risco de viés ROBINS-I – perguntas de cada domínio.	188
Anexo 5. Ferramenta para análise de risco de viés SYRCLE’S TOOL – perguntas de cada domínio.	190
Anexo 6. Ferramenta para análise de risco de viés QUIN’S TOOL – perguntas de cada domínio.	192

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

[14C]BB	base de Bandrowski marcada com carbono 14
[14C]-PAP	para-aminofenol marcado com carbono 14.
[3 H]AA	ácido araquidônico marcado com trítio
μM	Micromolar
2,4- DAT	2,4-diaminatolueno
3H-timidina	Timidina tritiada
3'-Me-DAB	metil-4-dimetilaminobenzeno
4-Cl-OPD	4-cloro-1-2-PD
6-TG	6-tioguanina
8-oxo-Dg	8-Oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina
A.C	Antes de Cristo
AA	ácido araquidônico
ACMS	mecanismos de citotoxicidade acelerada
ACP	fostase ácida
ALN	linfonodos auriculares
ALP	Fosfatase Alcalina.
ALT	alanina aminotransferase sérica
ANN	rede neural artificial
ANVISA	Agência Nacional De Vigilância Sanitária
AP-1	proteína ativadora 1
APC	células apresentadoras de antígenos
ARE	Elemento de Resposta Antioxidante
AREc32	fibroblastos embrionários de camundongos
AST	Aspartato Aminotransferase
B220+	células B que expressam a proteína B220
BALB/c	Linhagem de camundongos albinos Bagg Albino
BB	Base Bandrowski
BBY	Marrom Bismarck Y
BHT	hidroxitolueno butilado
BME	beta-mercaptoetanol
BrdU+	bromodeoxiuridina
BRE	raízes de beterraba
C2C12	Células Mioblastos de Camundongo
Cab	aberrações cromossômicas
CAS	<i>US Chemical Abstracts Service</i>
CAT	catalase
CCL19	ligante 19 de quimiocina C-C

CCSC	Comitê Científico de Segurança do Consumidor
CD 40	Cluster de diferenciação 40
CD 8	Cluster de diferenciação 8
CD 80	Cluster de diferenciação 80
CD 86	Cluster de diferenciação 86
CD18	Cluster de diferenciação 18
CD25+	Clust5er de diferenciação 25
CD3/CD28	Dynabeads conjugados com anticorpos contra CD3 e CD28.
CD59	cluster de diferenciação 59
CD83	Cluster de diferenciação83
CDXCR4	Receptor de Quimiocina tipo 4 do tipo C-X-C.
CE	Células esplênicas
CHCM	concentração de hemoglobina corpuscular média
CHL	células pulmonares de hamster chins
CHO-k1	células de ovário de hamster chinês
CK	creatina quinase
CLDN-1	claudina-1
CLDN-11	claudina-11
CLDN-8	claudina-8
CLMP	proteína similar ao receptor de coxsackievírus e adenovírus
Cmax	Concentração Máxima
COP	4-cloro-o-fenilenodiamina
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
CP	Células pré-tratadas
CPK-Mb	Creatina Quinase-MB
CPT	Contagem de Plaqueta
CV75	Concentração Viável 75%
CXCL1	Quimiocina C-X-C Ligante 1
CXCL2	Quimiocina C-X-C Ligante
CXCL8	Quimiocina (C-X-C motif) ligando 8
CXCR2	Receptor da quimiciona C-X-X tipo 2
CXCR4	Receptor de Quimiocina tipo 4
D.C	Depois de Cristo
d4-PAP	p-aminofenol deuterado
d4-PPD	parafenilenodiamina deuterado
DAC	dermatite de contato alérgica
DAPPD	N,N-diacetil-p-fenilenodiamina
DC	Células dendriticas
DCF	- 2',7'-dicloro-dihidrofluoresceína
DD	DNA eluido

DDM	diaminodifenilmetano
DeCS/MeSH	Descritores em ciências da saúde
DEN	N-nitrosodietilamina
DMEM	Meio Essencial de Eagle Modificado de Dulbecco
DMPPD	N-(1,3-dimetilbutil)-N-fenil-parafenilenodiamina
DMSO	dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPBS	solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco
dpf	dias pós-fertilização
EB/AO	brometo de etídio/acridina laranja
EC	células epidérmicas
EC150	Concentração Efetiva 150%
EC25	concentração efetiva que reduz a viabilidade celular em 25%
EC3	Concentração Efetiva 3%
EE	Equivalente Epidérmico
EE-EC50 (%)	Concentração Eficaz de Equivalente Epidérmico 50 (%)
EE-IL-1a10	Interleucina-1 alfa 10 de Equivalente Epidérmico
EE-IL-1a10	Interleucina-1 alfa 10 de Equivalente Epidérmico
EGCG	epigallocatequina galato
ELISA	ensaio imunoenzimático
EMT	transição epitélio-mesenquimal
EpiDerm™	pele humana reconstruída
ERK5	quinase regulada por sinal extracelular 5
ERK5/AP-1	Proteína quinase regulada por sinal extracelular 5 / Fator de Transcrição Ativador de Proteína 1
ESR	Ressonância de Spin Eletrônico
EST1000™	Pele Epitelial Reconstruída 1000
FACS	citometria de fluxo
FCA	Adjuvante completo de Freund
FCS	Soro fetal de bezerro
FITC	fluoresceína isotiocianato
FLG1	Filagrina 1
FLG2	Filagrina 2
Foxp3+	fator de transcrição P3
FSC	espelhamento direito
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
GARD Skin	Deteção rápida de alergia genômica.
GCs	grânulos corticais
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
GMPT	Teste de Sensibilização Máxima em porquinhos-da-índia

Gr	Grupo
GSSG	glutathiona oxidada
GSH	glutathiona
GST	glutathiona S-transferase
GVBD	degradação da vesícula germinativa
HA	ácido hialurônico
HaCaT	Linhagem celular de queratinócitos humanos imortalizados
Hb	hemoglobina
h-CLAT	Teste de Ativação de Linhagem Celular Humana.
HDFs	fibroblastos dérmicos humanos
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HPCP	Higiene Pessoal Cosméticos e Perfumes
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
Hprt	Hipoanxantina-guanina fosforribosiltransferase
HPs	coloração capilar a base de hena
HQ	Hidroquinona
HRIPT	Teste de irritação repetida em humanos
HRIPT	Teste de Patch de Reação Cutânea Máxima Observada Humana
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC50	concentração inibitória 50
ICAM1	Molécula de adesão intercelular 1
ICRGD	<i>International Contact Dermatitis Research Group.</i>
IFN- γ	interferon γ .
IgE	imunoglobulina E
IgG1	imunoglobulina G1
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-14	interleucina 14
IL-15	Interleucina 15
IL-17A	Interleucina 17A
IL-18	Interleucina 18
IL-1a	Interleucina 1a
IL-1b	Interleucina 1b
IL-2	Interleucina 2
IL-22	Interleucina 22
IL23R+/CD119+	Receptor de Interleucina 23+/Receptor de Interferon-gama+ CD119+
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6

IL-8	Interleucina 8
iNKT	<i>Natural Killer T cells</i>
Ip	injeção intraperitoneal
kBq	kilobecquerel
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa
LCSA-ly	Ensaio de sensibilização baseado em cocultura flexível com ponto final em linfócitos
LD50	dose letal mediana
LDH	Lactato Desidrogenase
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LI	<i>Lwasonia inermis</i>
LLNA	Ensaio do Linfonodo Local
LLNA-EC (%)	Ensaio Local no Linfonodo Efetivo (%)
LN	Células linfonodais
LNT	Células linfonodais com células T de camundongos
LPO	peroxidação lipídica
MAC	Concentração Máxima Aceitável
MAGI1	proteína inibidora de quinase guanilato associada à membrana 1
MAPPD	N-monoacetil-p-fenilenodiamina
MDA	Conteúdo de Malonaldeído
MDCK	Células renais de cães Mardin-Darby
mDPRA	Ensaio de reatividade de peptídeo micro direto
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MHC-II	complexo principal de histocompatibilidade II
MIP-1 α	Proteína Inflamatória de Macrófagos 1 alfa
MIP-1 β	Proteína Inflamatória de Macrófagos 1 beta
MIP-2	<i>Macrophage inflammatory protein 2</i>
miRNA	MicroRNA
mM	Milimolar
MN	micronúcleos Mutagênicos
MN-PCE	Taxa de Micronúcleos em Eritrócitos Policromáticos
MNT	Teste de Micronúcleos
MPCE	eritrócitos policromáticos com micronúcleos
m-PDA	m-parafenilenodiamina
mRNA	RNA mensageiro
MSD ELISA	Ensaio Imunoenzimático por Ligação de Anticorpos
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
MTP	potencial transmembrana mitocondrial
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio.
MUTZ-3	linha celular derivada de células progenitoras hematopoiéticas humanas

NCE	Eritrócitos normocromáticos.
NCTC EC25	Concentração Efetiva 25 (EC25) usando a linha celular NCTC
NEDA	N-(1-naftil)etilenodiamina di-hidrocloreto.
NF-Kb	fator nuclear kappa B
nHHDPCs	células normais da papila dérmica do cabelo humano
NMM	New Maintenance Medium
NOP	4-nitro-o-fenilenodiamina
NPL	Marcação pós-laboratório com nucleotídeo 32P
NR	neutral red
NRU	Ensaio de Captação de Vermelho Neutro
ODC	ornitina descarboxilase hepática
OOA	óleo de oliva
OPD	orto-fenilenodiamina
p53	Proteína 53
PAB	para-aminobenzeno
PAP	para-aminofenol
PARP-poli	Poli (ADP-ribose) Polimerase
PBLS	linfócitos do sangue periférico humano
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	tampão de fosfato
PCE	Valor de eritrócitos policromáticos
PCLS	fatia de pulmão humano de precisão
pCp-Cy3	ondas de ácido nucleico marcadas com corantes fluorescentes a fosforotioato de 3' de fita dupla
PCV	volume globular
PD	fenilenodiaminas
PG	Prostaglandina
PHA	fito-hemaglutinina.
PICO	População, Intervenção, Comparador e <i>Outcome</i> /Desfecho
PLN	linfonodos pancreáticos
PNM	potencial de membrana mitocondrial
Poli-PPD	Poli-parafenilenodiamina
PPD	Parafenilenodiamina
PRISMA	<i>Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses</i>
PROSPERO	<i>International Prospective Register of Systematic Review</i>
PS	Provavelmente sim
PN	Provavelmente não
PSD	dieta padrão com PPD
pSK1002	vetor de DNA plasmídico
PTD	dieta padrão aplicada com tungstato

pTD	para-toluenodiamina
QPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
QS	Questão de sinalização
QUIN TOOL	<i>Quality Assessment Tool For In vitro Studies</i>
RANTES	Regulado na Ativação, Normal T Expressado e Secretado
RAT inhal LD50	Dose Letal Média (LD50) por inalação em ratos
Rat linha deposited dose	Dose administrada de uma substância em ratos durante um estudo
RBC	Contagem de glóbulos vermelhos humanos
RBCCD59-	eritrócitos defeituosos negativos para CD59
RDC	Resolução Da Diretoria Colegiada
RES	Resorcinol
RETCD59-	reticulócitos defeituosos negativos para CD59
RFI	Índice de Fluorescência Relativa
RHE™	Epiderme Reconstruída Humana
RNA	Ácido Ribonucleico
ROBINS-I	<i>Risk of Bias in Non-randomized Studies of Intervention</i>
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RS	Revisão sistemática
RSE	<i>Rhus semilata M</i>
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
SA-β-gal	β-galactosidase associada à senescência.
SCE	Troca de Cromátides Irmãs
SCGE	Ensaio de eletroforese em gel de célula única
SD	Dieta padrão
SI	índice de estimulação
SOD	Superóxido Dismutase
SSC	espalhamento lateral
Subfase G1	Fase de intervalo/ GAP 1
SV-40	células uroteliais humanas imortalizadas
SV-HUC-1	Células epiteliais uroteliais humanas
SYRCLE's	<i>Systematic Review Centre for Laboratory Animal Experimentation</i>
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TC50	concentração tóxica de 50%
TCD3+	células T positivas para cluster de diferenciação 3
TCD4+	Células T citotóxicas CD4+
TCD8+	Células T citotóxicas CD8+
TD	Dieta suplementada com tungstato
TEC	Tempo de Coagulação
TEM	Microscopia Eletrônica de transmissão

TGF- β 1	fator de crescimento transformador beta 1
TGO	transaminase oxalacética
THP-1	linhagem celular monocítica
THP-1 EC25	Concentração Efetiva 25 (EC25) usando a linha celular THP-1
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TNF β	Fator de necrose tumoral beta
Treg	células T reguladoras
TUNEL	Marcação de Extremidades de Fragmentos de DNA por Terminal Desoxinucleotidil Transferase e dUTP.
TWBC	contagem total de glóbulos vermelhos
U937	Células mieloides humanas
UROtsa	células uroteliais humanas
UV	ultravioleta
UVA	radiação ultravioleta A
UVB	radiação ultravioleta B
V79	células de fibroblastos de pulmão de hamster chinês
VAS	vaselina
VCM	volume corpuscular médio
VCO	Óleo de Coco Virgem
V-FITC	anexina-V-isotiocianato de fluoresceína
XMD8-92	2-[2-etoxi-4-(4-hidroxipiperidin-1-il)anilino]-5,11-dimetilpirimido[4,5-b][1,4]benzodiazepin-6-ona
XO	Xantina oxidase
γ -GT	gama-glutamil transferase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	Revisão da literatura	26
2.1	TINTURAS DE CABELO.....	26
2.2	HENA	28
2.3	PARAFENILENODIAMINA (PPD)	29
2.3.1	BASE DE BANDROWSKI (BB).....	31
2.3.2	ANÁLOGOS DA PPD.....	32
2.4	RESPOSTA IMUNOLÓGICA	33
2.5	Sensibilização cruzada	35
3	OBJETIVOS	36
3.1	Objetivo geral	36
3.2	Objetivos específicos	36
4	METODOLOGIA.....	37
4.1	PROTOCOLO E REGISTRO	37
4.2	CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE.....	37
4.3	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	38
4.4	FONTES DE INFORMAÇÃO E ESTRATÉGIAS DE BUSCA	38
4.5	SELEÇÃO DE ESTUDOS	39
4.6	PROCESSO DE COLETA DE DADOS	39
4.7	RISCO DE VIÉS E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS ESTUDOS	39
4.7.1	Para estudos clínicos.....	40
4.7.2	Para estudos <i>in vivo</i>	40
4.7.3	Para estudos <i>in vitro</i>	43
4.8	MEDIDAS DE RESULTADOS	Erro! Indicador não definido.
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1	Estudos selecionados	44
5.2	Característica dos estudos	45
5.3	Característica dos ensaios pré-clínicos incluídos na revisão.....	46
5.3.1	Estudos <i>in vivo</i>	46
5.3.1.1	Coelhos Albinos	54
5.3.1.2	<i>Zebrafish</i>	54
5.3.1.3	Fígado embrionário de galinha.....	55
5.3.1.4	Porquinhos-da-índia	56
5.3.1.5	Camundongos	57
5.3.1.6	Ratos.....	62

5.3.2	Estudos <i>in vitro</i>.....	68
5.3.2.1	Células uroepiteliais humanas (SV-HUC-1)	76
5.3.2.2	Células normais da papila dérmica do cabelo humano (nHHDPCs).....	78
5.3.2.3	Cocultura de HaCaT e THP-1.....	78
5.3.2.4	Células pulmonares de hamster chinês (CHL)	79
5.3.2.5	Glóbulos vermelhos humanos	79
5.3.2.6	EpideDermTM	79
5.3.2.7	Células dendríticas (CD).....	80
5.3.2.8	Células T	81
5.3.2.9	Oócitos de camundongos fêmeas.....	81
5.3.2.10	Linfócitos humanos	82
5.3.2.11	Cocultura de queratinócitos e células mononucleares de sangue periféricos 83	
5.3.2.12	Células mioblásticas de camundongo (C2C12)	84
5.3.2.13	Células epiteliais humanas (HaCaT)	84
5.3.2.14	Fibroblastos de ratos Wistar	84
5.3.2.15	Células renais de cães Mardin-Darby (MDCK)	85
5.3.3	Característica dos ensaios clínicos não randomizados incluídos na revisão ..	86
5.4	Riscos de Viés.....	91
5.4.1	Estudos <i>in vivo</i>	91
5.4.2	Estudos <i>in vitro</i>.....	102
5.4.3	Ensaio Clínicos Não Randomizados	117
6	Conclusão	125
7	REFERÊNCIAS.....	129

1 INTRODUÇÃO

Por volta de 4.000 anos atrás, as tinturas de cabelo já eram utilizadas¹. Desde então, milhões de consumidores as têm usado para melhorar a aparência, com a frequência de uso variando de indivíduo para indivíduo¹.

Alguns consumidores apresentam reações alérgicas adversas na pele após o uso de tintura de cabelo, muitas das quais estão relacionadas à exposição à parafenilenodiamina (PPD)^{2,3}. Essas reações incluem o edema facial grave, dermatite de contato aguda (DAC) e sintomas gerais de mal-estar^{2,3}. Quando esses indivíduos procuram atendimento hospitalar, a maioria apresenta reação de sensibilização à PPD nos testes de contato^{2,3}.

A PPD é classificada como corante de tonalidade preta⁴. Em seu estado oxidado, ela não gera efeitos adversos; entretanto, não é comum seu uso nessa forma⁵⁻⁸. Geralmente, a PPD é empregada em tinturas (capilares, de sobrancelha e temporárias, como na hena) no seu estado reduzido⁵⁻⁸. A substância é classificada pelo Comitê Científico de Segurança do Consumidor (CCSC) como um dos cinco compostos químicos mais potentes de ação sensibilizantes⁹.

A PPD é encontrada em diversos produtos, incluído em tintas utilizadas para a tatuagem de hena^{2,3}. As tatuagens de hena temporária são uma escolha comum entre crianças e jovens por serem indolores, economicamente acessíveis, apresentarem um efeito durador e, por não se tratar de um processo invasivo, oferecem um menor risco de infecção⁷. A hena é um pó natural proveniente da planta *Lawsonia inermis*, com coloração marrom-avermelhada ou acastanhada, cujo uso para pigmentação de cabelos, unhas e pele é relatado há vários séculos^{4,10}. A substância apresenta baixo potencial sensibilizante, e relatos de dermatite de contato alérgica (DAC) são raros⁴. No entanto, as tatuagens feitas com o corante natural apresentam baixa definição e curta duração na pele⁴. Por isso, aditivos, como a PPD, vinagre, azeite, carvão e cravo são frequentemente adicionados à tintura⁷. Esses aditivos têm como objetivo alterar a coloração do pigmento, reduzir o tempo de aplicação e aumentar a duração da tatuagem na pele⁷.

Quando a PPD é adicionada à hena, ela passa a ser denominada de hena preta⁶. Esse ingrediente cosmético contribui para acelerar o processo de tingimento e escurecimento dos cabelos, além de aumentar a duração da tatuagem na pele⁶. Contudo, esse aditivo pode causar inúmeros efeitos tóxicos, tanto locais quanto sistêmicos, seja por

meio da exposição tópica ou ingestão⁶. A ingestão acidental de hena contendo PPD provoca toxicidade sistêmica grave, sendo associada a ela sintomas como edema intenso na face e garganta, rabdomiólise, angioedema, hemólise e arritmia, cardiotoxicidade, mioglobínúria, insuficiência renal aguda e desconforto respiratório, com necessidade de traqueostomia de urgência, além de altas taxas de mortalidade^{8,10}.

A toxicidade sistêmica decorrente da ingestão da PPD é um cenário comum na Índia e no norte da África, sendo menos frequente em países desenvolvidos⁸. Em países em desenvolvimento, foi relatado o uso de tintura de cabelo contendo PPD, em Kala Pathar, como uma forma de automutilação^{5,11}. Em decorrência dessa intoxicação, foram observados efeitos como angioedema, dificuldade respiratória, rabdomiólise, insuficiência renal aguda e necrose hepática^{5,11}. No Sudão, a PPD é responsável por 35% das mortes por suicídio, uma incidência que pode ser explicada pela facilidade de obtenção da hena preta, já que ela é barata e de fácil acesso, ou devido a experiências anteriores relacionadas a tentativas de suicídio¹¹.

O uso tópico da PPD pode levar a uma reação de hipersensibilidade tardia do tipo IV, sendo relatados casos de DAC, hipertricose, urticária, alteração da pigmentação e reação liquenoide^{6,7}. A DAC é caracterizada pelo surgimento de eritema, vesículas e bolhas na área de aplicação do produto, podendo evoluir para quadros mais graves e, em alguns casos, até fatais⁴.

Não existe um antídoto para tratamento de intoxicações pela PPD; assim, é necessário realizar uma intervenção precocemente para evitar a mortalidade⁵. Alguns estudos indicam que a dose letal de PPD, após a ingestão e absorção enteral, é de 10 gramas⁵. No entanto, há relatos de que doses menores foram suficientes para causar a letalidade⁵. Os tratamentos hospitalares são focados no atendimento de emergência médica, incluindo a garantia da permeabilidade das vias aéreas, intubação endotraqueal e traqueostomia⁵. Quando necessário, pode ser realizada lavagem gástrica, reposição de líquidos e eletrólitos, além da hemodiálise, caso seja diagnosticada insuficiência renal crônica⁵.

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 530, de 4 de agosto de 2021, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), lista a PPD como uma substância que não deve estar presente, exceto sob as restrições estabelecidas, em produtos de Higiene Pessoal Cosméticos e Perfumes (HPCP)^{12,13}. Tal restrição é justificada pela

abundância de evidências que indicam a ação da PPD como alérgeno de contato em humanos^{12,13}.

O seu uso em tintas de sobrancelhas e cílios é proibido pela RDC nº 03, de 20 de janeiro de 2012, da ANVISA¹⁴. A referida RDC estabelece que o limite máximo permitido de PPD em tinturas capilares é de 6%¹⁴. Na União Europeia, o uso da substância em produtos tópicos é proibido, sendo permitido apenas em tinturas de cabelo, também na concentração de 6%¹⁴.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TINTURAS DE CABELO

Antigamente, substâncias vegetais e minerais naturais eram utilizadas para colorir os fios de cabelos¹⁵. Com o avanço da química orgânica e fina, substâncias sintéticas, consideradas “permanentes” devido às suas características oxidativas, começaram a substituir as substâncias naturais¹⁵. Interpretado como um avanço, o uso da oxidação em tinturas capilares intensificou o número de procedimentos nos últimos anos¹⁵. No entanto, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) adverte que alguns dos corantes capilares amplamente utilizados em todo o mundo são mutagênicos e carcinogênicos para os animais¹⁶⁻¹⁹.

A coloração permanente do cabelo envolve uma variedade de reações, e os principais componentes desses produtos incluem um intermediário primário, um revelador e um agente de acoplamento²⁰. Os intermediários primários, como as diaminas aromáticas (por exemplo, a PPD) e aminofenóis (como o para-aminofenol, PAP), são incolores e se transformam em iminas, reagindo rapidamente com os modificadores de cor^{15,20,21}. A oxidação pelo peróxido de hidrogênio leva à alteração da dor dos fios, formando espécies reativas que reagem com os agentes acopladores para gerar a cor final^{15,20,21}.

É importante observar que pequenas quantidades de intermediários primários podem permear a barreira cutânea durante o processo de coloração, o que pode resultar em problemas mais graves, como o câncer de bexiga e tumores de pele^{15,22,23}. Ames e colaboradores (1975) realizaram um estudo utilizando *Salmonella typhimurium* como cepa teste e relataram que 89% das tinturas capilares comerciais da época causaram reações mutagênicas na cepa²⁴.

Os principais reveladores incluem peróxido de hidrogênio, etanolamina e a amônia²⁰. O peróxido de hidrogênio é responsável pela oxidação do intermediário primário e pelo clareamento dos pigmentos naturais, como melanina, feomelanina e eumelanina presentes nos cabelos²⁰. A amônia ou a etanolamina elevam o pH do cabelo, fazendo com que as cutículas entumeçam, permitindo sua abertura e entrada do peróxido de hidrogênio e das moléculas da tinta no córtex do eixo capilar²⁰. Por fim, o revelador contribui para a formação da cor ao reagir com as formas reativas do intermediário primário²⁰.

Dentre os componentes das tinturas, destacam-se substâncias como a para-fenilenodiamina, para-toluenodiamina (pTD), para-aminofenol (PAP) e *Lawson* (ácido henotânico, 2-hidroxi-1,4-naftoquinona). A PPD é considerada o oxidante mais utilizado em várias tinturas capilares^{25,26}. A oxidação dessas substâncias ou a adição de modificadores resulta em modificações na coloração e nas reações dos produtos nos fios de cabelo¹. Algumas dessas modificações incluem a substituição do anel aromático em posição meta, gerando derivados como m-fenilenodiamina (MPD), m-aminofenol e resorcinol¹.

Estudos toxicológicos e epidemiológicos sugerem que as tinturas de cabelo apresentam nenhum ou baixo risco para a saúde humana¹. No entanto, outros estudos apontam as inúmeras consequências associadas ao seu uso¹. Pesquisas indicam que o tempo de exposição a tinturas de cabelo, contendo PPD, está relacionado a riscos de desenvolvimento de leucemias e outras doenças, como o câncer de bexiga, além de fragmentação de DNA e morte celular^{25,27,28}.

Existem quatro tipos de categorias de coloração capilar: os corantes oxidativos, os corantes diretos (temporários ou semipermeantes), os sais metálicos e os corantes naturais^{29,30}. Como regra, a categoria dos corantes permanentes apresenta um agente oxidante e um componente alcalinizante, que pode ser a amônia ou um substituto de amônia^{29,30}. Já os agentes de coloração temporária possuem moléculas de maior tamanho, o que dificulta a permeabilidade na haste do cabelo, permitindo apenas um revestimento superficial, além de se adsorverem no folículo piloso^{29,30}. A categoria intermediária entre essas duas é composta pelas colorações semipermanentes, formuladas para proporcionar uma melhor deposição de cor nas hastes do cabelo devido ao menor tamanho de partículas^{29,30}. Nesse grupo, encontramos a PPD e seus derivados meta-substituídos, orto-fenilenodiamina (OPD), 2,5-diaminotolueno, 2,4-diaminoanisole, e 2-amino-4-nitrofenol^{17,29-31}.

O uso da PPD também causa uma grande preocupação ocupacional, pois inúmeros trabalhadores como cabeleireiros e operários da indústria têxtil e de borracha, são expostos diariamente a esse composto^{16,28,32,33}. Estudos epidemiológicos avaliaram o risco de exposição a esse composto em usuários de tinturas capilares e barbeiros, observando um alto risco de desenvolvimento de linfoma não Hodgkin, mieloma múltiplos, câncer de bexiga e cânceres hematopoiéticos^{16,28,32-34}. Além disso, foi realizado um levantamento sobre mulheres que tingem os cabelos uma vez por mês, o que

aumentaria de 2,1 vezes a probabilidade de incidência de câncer de bexiga^{16,28}. Pesquisas epidemiológicas também associaram a aplicação de corantes capilares a base de PPD ao aumento da incidência de câncer em humanos, como o de mama, bexiga e malignidades linfoides³⁵⁻³⁷.

2.2 HENA

A hena (*Lawsonia inermis*) é utilizada desde a antiguidade para o tingimento de couro, lã, cabelo e unhas³⁸. O uso da hena natural no Sudão remota à Idade do Bronze (800 A.C – 476 D.C), e no Oriente Médio e na Ásia há registros de seu uso há mais de 4.000 anos, o que indica que ela faz parte da cultura popular mediterrânea e da tradição de diversos países, sendo amplamente utilizada em cerimônias religiosas e outras celebrações sociais - apresentando um uso generalizado^{39,40}. Geralmente a hena é aplicada em grandes áreas do corpo para criação de desenhos artísticos, sendo frequentemente usada em recém-nascidos durante cerimônias religiosas^{39,41}.

A hena natural é cultivada comercialmente, e estudos demonstram que os casos de dermatite alérgica de contato associados ao seu uso são raros, o que a torna segura para o uso humano⁴⁰. No entanto, a hena natural apresenta uma duração limitada quando aplicada na pele^{40,42}. Para melhorar essa durabilidade, substâncias adicionais, como a PPD, são frequentemente misturados à hena^{40,42}.

A PPD é misturada à hena, *Lawsonia alba*, para criar tatuagens de pigmentação preta⁴⁰. A PPD é extremamente tóxica e amplamente utilizada em tinturas capilares, sendo considerada o principal ingrediente nessas formulações⁴⁰. Os consumidores optam por seu uso devido ao seu custo, que é de 20 a 30 vezes mais baixo que a das preparações farmacêuticas de tintura capilar⁴⁰.

Países como Sudão e Egito apresentam diversos relatos de suicídio e homicídio devido à ingestão oral de tinturas de cabelo contendo PPD⁴⁰. Quando ingerida, a PPD desencadeia efeitos adversos dose-dependentes, como hipersensibilidade grave (coceira, angioedema, asfixia) e rabdomiólise (paresia das extremidades, urina de cor alterada, oligúria e elevação das taxas de creatina, lactato desidrogenase e fosfoquinase), hipercalcemia, hipofosfatemia, hipocalemia, anemia, leucocitose, hemoglobinemia, hemoglobinúria e necrose hepática^{40,43}. Em modelos animais, a PPD pode induzir

rabdomiólise, vazamento de íons de cálcio endoplasmáticos, contração contínua e irreversível, além de alterações nas estruturas dos músculos^{40,43,44}.

2.3 PARAFENILENODIAMINA (PPD)

A parafenilenodiamina, $C_6H_8N_2$, (CAS 106-50-3), é um sólido cristalino incolor, que, em alguns casos, pode apresentar uma leve coloração cinza, amarela ou rosa³⁹. Quando exposta ao ar, ocorre sua oxidação, modificando sua coloração para um tom vermelho/marrom, que, no final da reação, torna-se preta, formando um corante trinuclear, chamado de base Bandrowski (N, N-bis-(4-aminofenil)-2,5-diamino-1,4-quinona-diimina)³⁹. Estudos indicam que a formação da base é uma etapa crítica para o desenvolvimento da DAC³⁹.

A PPD é utilizada em diversas indústrias químicas, com aplicações variadas, como antioxidante, antiozonante, revelador fotográfico, acelerador de vulcanização de borrachas e intermediador de corantes de tinturas capilares oxidativas, tatuagem temporária, corante de couro e tecidos^{16,21,30,38,45}. Derivados de parafenilenodiamina, como 2,3,5-triaminopiridina e 1,2,4-triaminobenzene, são conhecidos por sua capacidade miotóxica em animais, causando sérios danos musculares, incluindo necrose de músculos esqueléticos e cardíacos⁴⁶⁻⁴⁸. No caso da PPD, estudos indicam que o uso oral, acidental ou não, também pode levar a danos musculares em humanos^{47,49,50}. Munday e colaboradores buscaram formas de entender esse processo, apresentando evidências de que a miotoxicidade ocorre pela oxidação de elétrons do sistema citocromo C, o que leva a formação de espécies reativas de oxigênio, como o radical superóxido e o peróxido de hidrogênio^{47,51,52}.

A parafenilenodiamina, como mencionado, é um ingrediente essencial para as tinturas capilares, e isso ocorre devido a sua fácil oxidação⁵³. Seus metabolitos são altamente tóxicos, alergênicos e mutagênicos⁵³. Vários estudos analisaram as consequências do uso de PPD, indicando que alguns órgãos, como o rim e a bexiga, são mais susceptíveis aos seus efeitos tóxicos⁵³. Além disso, ensaios realizados em diferentes modelos de estudos mostraram efeitos mutagênicos, genotóxicos e carcinogênicos associados ao uso de PPD⁵³.

Quando os consumidores utilizam tinturas capilares contendo PPD acabam sendo expostos ao composto através do couro cabeludo, cabelo, unhas, olhos e mãos⁵⁴. Um

estudo com mulheres que usam tinturas de cabelo com a substância frequentemente mostrou que elas sofrem respostas agudas, como dores de cabeça, tonturas e anafilaxia⁵⁴. Outros estudos conseguiram avaliar mais efeitos da PPD⁵⁴. Um deles investigou a exposição à PPD por meio do teste de contato em humanos, observando que o composto causou queimação na pele, eritema e erupção cutânea⁵⁴. Trabalhadores expostos à PPD desenvolveram câncer de bexiga, e em ratos, foi possível observar a formação de lesões na pele^{54,55}.

A metabolização de PPD em humanos e ratos foi estudada, e dois grupos de pesquisa evidenciaram que a substância é metabolizada, formando adutos N-acetilados por meio da ação da N-acetiltransferase, encontrada em ratos e na pele e fígado humanos, que ocorre no fígado e geralmente envolve a ação do citocromo P450^{54,56,57}. O polimorfismo de MnSOD aumenta a toxicidade da parafenilenodiamina, enquanto a ação de antioxidantes tiol pode reduzi-los^{54,58}. Na literatura, está bem consolidado que os danos teciduais causados por xenobióticos estão relacionados aos metabólitos reativos e à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o radical hidroxila, superóxidos e peróxido de hidrogênio^{54,59-61}.

Os anéis aromáticos com anilinas, chamados fenilenodiaminas (PD), são amplamente aplicados em diversos produtos, tornando a exposição a estes compostos quase inevitável, e afetando cerca de 15 milhões de pessoas, incluindo consumidores e trabalhadores que utilizam produtos de tinturas capilares ou de tecidos, ou indiretamente, através de intermediários químicos ou fluidos de revelação fotográfica^{21,30,57,62}.

Os rearranjos de grupos nas posições “orto, meta e para” das fenilenodiaminas resultam em compostos com diferentes atividades³⁰. Chung e colaboradores conseguiram analisar quais substituições na PPD conseguiam inibir ou reduzir as respostas mutagênicas do composto^{63,64}. A metilação ou substituição de um grupo nitro por um amino reduziam a mutagenicidade, enquanto a sulfonação, carboxilação, desaminação ou substituição de um álcool ou de um grupo amino diminuía dessa atividade^{18,64}.

O contato da PPD com a pele pode causar irritação, ceratoconjuntivite, inchaço das conjuntivas e eczema das pálpebras^{45,65}. Em casos de uso prolongado, pode levar a DAC, fotossensibilização, erupções púrpuras, mutagenicidade e carcinogenicidade⁶⁶⁻⁶⁸. O primeiro caso documentado de sensibilização pela PPD ocorreu em 1924, quando um proprietário de salão de beleza sofreu intoxicação sistêmica após manusear a tintura⁶⁵.

Além dos efeitos locais, existe o risco de toxicidade sistêmica devido à rápida absorção transcutânea da PPD, podendo desencadear angioedema, distúrbios gastrointestinais, tremores, convulsões, dispneia, sonolência, atrofia hepática, insuficiência renal aguda com oligúria, anúria e urina escura (marrom chocolate), parada cardíaca e até mesmo a morte³⁸.

2.3.1 BASE DE BANDROWSKI (BB)

A PPD, ao ser utilizada e entrar em contato com o corpo, pode desencadear respostas imunológicas tardias, como reações de dermatite de contato que resultam em edema e eritema da pele^{69,70}. Essas respostas tardias podem estar relacionadas ao fornecimento de sinais químicos que promovem a conversão de células dendríticas imaturas em células apresentadoras de antígenos maduras e potentes, o que estimula as células T efectoras^{69,71,72}.

Um dos motivos pelos quais a PPD pode gerar tantos efeitos no sistema imunológico é sua instabilidade no organismo^{69,73}. Ela sofre um processo de auto-oxidação que resulta na formação de intermediário quinonedimina eletrofílico, susceptível a sequenciamentos de autoconjugação que formam diversos produtos, incluindo o dímero difenilamina e o trímero conhecido como base de Bandrowski^{69,73}. A BB, N,N-9-bis(4-aminofenil)-2,5-diamino-1,4-quinona-diimina, foi identificada como a principal responsável pelo aparecimento da DAC associada ao uso de tinturas contendo PPD^{74,75}. Esses sequenciamentos de moléculas podem continuar ocorrendo, levando a formação do poli-parafenilenodiamina (poli-PPD)^{73,76}.

Os processos de auto-oxidação da PPD são completamente irreversíveis, e estudos de genotoxicidade *in vitro* indicaram que, assim como outros compostos da família das anilinas, a PPD pode reagir com o DNA e causar quebra das fitas^{69,73,77,78}. Diversos autores investigaram a relação da PPD, seus análogos e as células dendríticas, observando que essa interação resulta no amadurecimento das células, aumento da expressão de receptores de superfície celular, síntese de citocinas e ativação de células T⁷⁹⁻⁸⁴.

Células dendríticas imaturas, localizadas na pele, após entrarem em contato com alérgenos tornam-se maduras, assumindo uma função de potentes apresentadoras de antígenos e sentinelas imunológicas^{69,85}. As células dendríticas imaturas apresentam baixos níveis de CD40, CD80 e CD86 e possuem capacidade limitada de ativar as células T^{69,86,87}. No entanto, quando maduras, conseguem secretar citocinas, que regulam a

expressão de moléculas coestimuladoras, desenvolvendo uma elevada capacidade de ativar as células^{69,86,87}.

Durante uma reação imunológica, a PPD fornece dois sinais independentes^{69,72,88}. O primeiro é um sinal via Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de forma independente da dose, e o segundo é um sinal do tipo adjuvante, dependente de dose, que estimula a ativação de células dendríticas⁶⁹. Quando em concentrações acima de 2,5 mM, associadas à morte celular, a PPD consegue estimular a maturação de célula dendríticas por meio da regulação positiva de CD8^{58,69,89}. Em concentrações maiores que 2,3 mM, ela induz eventos transduccionais, incluindo a fosforilação de tirosina^{58,69,89}. Além disso, em concentrações de 200 µM, a PPD estimula significativamente a produção de CXCL8, que é uma quimiotoxina envolvida no recrutamento de CXCR2 e 1 e amplificação da resposta imune^{69,81}.

2.3.2 ANÁLOGOS DA PPD

Análogos da PPD também apresentam efeitos tóxicos. Alguns deles estão listados a seguir.

A m-parafenilenodiamina (m-PDA) é um componente amplamente utilizado em tinturas de cabelo devido à sua capacidade antioxidante^{24,90}. Estudos indicaram que os metabólitos desse composto são mutagênicos em *Salmonella typhimurium*^{24,90}. Por outro lado, uma análise realizada com m-PDA hidrócloro concluiu que ela não apresenta mutagenicidade em ratos machos e fêmeas da linhagem HaM/ICR^{24,90}. Nesse estudo, o composto foi administrado na ração com doses de 1000, 2000 e 4000 mg/Kg^{24,90}.

A N-(1,3-dimetilbutil)-N-fenil-parafenilenodiamina (DMPPD) é um derivado da fenilenodiamina, comumente utilizado como antioxidante em pneus e para a prevenção da deterioração de borracha⁹¹. Assim como a PPD, a DMPPD pode causar efeitos graves, como a dermatite de contato em humanos, além de efeitos mutagênicos relatados em estudos prévios^{91,92}. O uso de DMPPD na indústria de pneus está associado a uma maior predisposição ao desenvolvimento de câncer em trabalhadores que lidam com a borracha e o aumento de aberrações em cromátides humanas^{91,93}.

2-metoxi-p-fenilenodiamina apresenta efeitos miotóxicos superior ao da PPD, conforme indicado em diversos estudos^{47,52,94}. Além desse efeito, a substância é

conhecida por sua mutagenicidade e por causar quebras na cadeia de DNA em estudos *in vitro*^{47,95-97}.

A 1-2-PD (OPD) apresenta potencial cancerígeno e é um possível sensibilizador^{64,98-100}.

A 1-3-PD (MPD), quando analisada em modelos murínicos (camundongos e ratos), não apresentou efeitos carcinogênicos^{30,101,102}. No entanto, ao avaliar análogos cloro-substituídos na posição para, foi observado o efeito carcinogênico^{30,101,102}.

4-cloro-1-2-PD (4-Cl-OPD), quando testada em camundongos e ratos, demonstrou atividade carcinogênica^{30,90}. Em camundongos, foi observado que o composto causa tumores no pulmão, na bexiga, na glândula mamária e na tireoide^{97,103,104}. Além disso, em bactérias, o composto apresenta mutagenicidade e induz a quebra de fitas de DNA em fibroblastos humanos^{97,103,104}. 4-Cl-OPD é amplamente utilizada na síntese de medicamentos como reagente químico, e, e em tinturas, é utilizado como corante intermediário e base oxidativa¹⁰⁴.

A dicloridrato de OPD, quando testada em camundongos e ratos demonstrou atividades carcinogênica^{30,90}.

Assim como outros análogos de PPD, a 4-nitro-orto-fenilenodiamina é utilizada como corante em tinturas capilares semipermanentes e permanentes¹⁰⁴. Estudos avaliaram a atividade da substância com a PPD, e indicaram que ela apresenta mutagenicidade em *Salmonella typhimurium* (teste de Ames) e no ensaio de linfoma de camundongos L5178YTK^{+/}₋^{67,94,104-106}. Quando testada em drosófila e em ensaios de recombinação mitótica de leveduras, os resultados também indicaram genotoxicidade^{67,94,104-106}. Além disso, a substância é capaz de induzir aberrações cromossômicas em culturas de células de mamíferos^{66,67,104}.

2.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA

A dermatite de contato alérgica é um problema significativo na Alemanha, gerando custos estimados em cerca de 3 bilhões de euros por ano, esses gastos envolvem perda de trabalho, cuidados médicos, avaliação e medidas de reciclagem¹⁰⁷. A prevalência da DAC varia entre 15,9 e 28%, esse valor varia por depender do método utilizado para monitorar os casos clínicos¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. A DAC não é desencadeada por proteínas, mas por

moléculas de baixo peso molecular; assim, a resposta imunológica é mediada por linfócitos T e não por fatores sorológicos¹⁰⁷. Na fase de sensibilidade, o antígeno, de baixo peso molecular, penetra na pele através das células de Langherans¹⁰⁷. Essas células migram para os gânglios linfáticos regionais, onde apresentam o antígeno aos linfócitos T, formando células sensibilizadas¹⁰⁷. Quando expostas novamente ao antígeno, essas células desencadeiam uma reação inflamatória¹⁰⁷.

Após a penetração do antígeno na pele, ocorre a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 β (IL-1 β) e TNF- α , seguida pela ativação de outras moléculas inflamatórias, incluindo interferon- γ (IFN- γ), IP-10, MIP-2, IL-1 α , IL-12, IL-15 e IL-18, que desempenham papéis importantes na amplificação da resposta imune local^{85,107,110,111}. O TNF- β , por sua vez, promove o desprendimento das células de Langerhans da epiderme, reduzindo a expressão de moléculas de adesão¹⁰⁷. Por meio da ação de enzimas como a metaloproteinase IX, essas células atravessam a membrana basal e migram para os gânglios linfáticos, onde apresentam o antígeno aos linfócitos T, com auxílio da IL-12 sintetizada pelas células dendríticas¹⁰⁷. Após a exposição a alergênicos, os queratinócitos e células de Langherans produzem citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1 β e TNF- α , que desencadeiam a fase aguda da resposta inflamatória, recrutando neutrófilos e promovendo a produção de proteínas^{107,112}.

Clones de células T com diferentes funções são ativados, incluindo linfócitos T CD8⁺ TC1 e CD4⁺ TH2¹⁰⁷. Os CD8⁺ sintetizam interferons, enquanto os CD4⁺ produzem principalmente IL-10¹⁰⁷. A IL-10 desempenha um papel regulador na DAC, mediando fatores que permitem a penetração dos linfócitos T na pele e a ativação de moléculas de adesão^{107,111}. Uma vez na pele, os linfócitos T iniciam a reação inflamatória^{107,111}. Nesta cascata, moléculas de adesão, como LFA-1, CD18, ICAM1 e quimiotoxinas, têm papel central na distribuição de proteínas nos órgãos linfáticos e na ativação de células dendríticas, monócitos e eosinófilos^{107,111}.

Os linfócitos T destroem queratinócitos por apoptose, resultando no eczema típico da DAC^{107,113}. Os subtipos de linfócitos T apresentam efeitos fisiopatológicos distintos¹⁰⁷. As células CD4⁺ com padrão TC1 podem induzir apoptose em linfócitos B e queratinócitos, enquanto as TH2 desencadeiam apoptose apenas em linfócitos B, por meio da liberação de fatores IL-4 e perforina¹⁰⁷. Os linfócitos CD8⁺ exercem efeitos citotóxicos sobre queratinócitos e possuem atividade imunomoduladora semelhante aos CD4⁺^{107,113-115}.

Outra observação importante é o papel do aumento da ligação de interferon- β e interleucina 4¹⁰⁷. Níveis elevados de IL-4 estão associados a respostas mais brandas na DAC, enquanto os níveis elevados de interferon intensificam a reação^{107,116}.

Além disso, a DAC pode ser induzida por mecanismo de tolerância específica¹⁰⁷. Estudos em camundongos demonstraram que o sulfato de níquel pode induzir tolerância, levantando questões sobre a possibilidade desse mecanismo ocorrer em humanos¹⁰⁷.

Considerando a PPD, além dos efeitos que a molécula pode causar no organismo, reações cruzadas com medicamentos também podem acontecer, como é caso de sulfonamidas e esterocáinas¹⁰⁷. A PPD é metabolizada na pele por auto-oxidação ou por enzimas mediadoras de oxidação ou acetilação¹⁰⁷. A via de acetilação envolve a N-acetiltransferase 1, presente na pele, e resulta em metabólitos incapazes de ativar linfócitos T, promovendo a desintoxicação da PPD¹⁰⁷.

Em culturas de queratinócitos, a PPD demonstrou estimular a proliferação e a expressão da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) em concentrações relativamente baixas (até 10 $\mu\text{g/mL}$) e exposições curtas, de até oito horas^{117,118}. Esse efeito pode ser atribuído à geração de espécies reativas de oxigênio durante sua auto-oxidação no meio de cultura^{117,118}.

2.5 SENSIBILIZAÇÃO CRUZADA

A sensibilização cruzada ocorre quando uma reação alérgica do mesmo tipo é desencadeada por um composto primário e por um composto secundário¹¹⁹. A avaliação detalhada da sensibilização cruzadas de múltiplos compostos se torna essencial, uma vez que os seres humanos frequentemente utilizam diversos compostos em sua rotina diária, o que dificulta a identificação precisa da substância responsável por uma reação alérgica específica¹¹⁹.

Uma das maneiras de avaliar a sensibilização cruzada é por meio de estudos *in vivo* e clínicos, os quais utilizam diferentes testes adaptados a cada modelo¹¹⁹⁻¹²¹. Para a análise *in vivo*, são empregados dois ensaios principais: o teste de otimização e o teste de maximização em animais¹¹⁹⁻¹²¹. No âmbito clínico, o teste de contato é amplamente utilizado para avaliar a sensibilização cruzada em humanos, permitindo uma abordagem mais específica para cada tipo de exposição¹¹⁹⁻¹²¹.

Estudos indicam que os testes realizados *in vivo* apresentam várias dificuldades que podem comprometer a interpretação dos resultados¹¹⁹. O primeiro problema é a subjetividade na interpretação, que pode levar a resultados inconsistentes¹¹⁹. O segundo é a dificuldade em distinguir uma reação alérgica específica de uma reação inespecífica ou irritante¹¹⁹. O terceiro problema é a limitação de aplicar diversos compostos ou produtos químicos em um único sujeito¹¹⁹. Por fim, o quarto problema é que o teste de contato alérgico pode aumentar a sensibilização cutânea ou agravar a dermatite de contato em casos já existentes^{119,122}.

Diante disso, o objetivo desta revisão sistemática foi avaliar dados publicados sobre as reações adversas associadas ao seu uso de PPD, incluindo as relacionadas a produtos cosméticos, por consumo ou exposição ocupacional, e de experimentos que a utilizam como indutor de sensibilização alérgica e eliciação de DAC. A análise investigou se a concentração de 6% ¹⁴ atualmente permitida pela ANVISA em tinturas capilares está associada a casos de toxicidade, com bases em dados de estudos pré-clínicos (*in vivo* e *in vitro*) e clínicos (ensaios clínicos não randomizados) encontrados na literatura.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo avaliar dados da literatura, de estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaios clínicos, que descrevessem os efeitos tóxicos da parafenilenodiamina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcançar o objetivo principal deste trabalho, os objetivos específicos foram:

- i) reunir e analisar dados sobre os efeitos tóxicos atribuídos a parafenilenodiamina descritos na literatura;
- ii) buscar quais efeitos adversos já relatados foram relacionados ao uso de cosméticos que continham PPD.

4 METODOLOGIA

4.1 PROTOCOLO E REGISTRO

A presente revisão sistemática (RS) foi elaborada, conduzida e relatada por meio dos parâmetros estabelecidos nas diretrizes do PRISMA 2020. O PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses*) consiste em um *checklist* produzido para auxiliar revisores no processo de escrita de forma clara, os objetivos, a metodologia e os resultados encontrados durante as buscas para a construção de revisões sistemáticas e meta-análises¹²³.

O protocolo de revisão referente a avaliação da segurança de uso de PPD em produtos cosméticos de estudos clínicos foi registrado na base de dados PROSPERO (*International Prospective Register of Systematic Review*) com o número de registro CRD42024583665. O protocolo, de mesmo título, referente aos estudos *in vitro* e *in vivo* ainda está sob análise na base de dados com o número de registro 579137. O PROSPERO é uma base de dados internacional de acesso aberto de registros prospectivos de protocolos de revisões sistemáticas nas áreas de saúde, saúde pública, educação, criminalidade, justiça, assistência social, e desenvolvimento internacional, com a condição de que o desfecho da pergunta de pesquisa esteja relacionado à saúde¹²⁴. O registro na base de dados reduz as chances de viés de comunicação, duplicação de revisões sistemáticas, além de permitir a comparação de revisões concluídas por meio do protocolo¹²⁴.

4.2 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

Artigos que avaliavam a toxicidade de uso de parafenilenodiamina (PPD) em produtos cosméticos em ensaios clínicos, estudos *in vivo* e *in vitro*, foram selecionados para essa RS conforme a pergunta de pesquisa: Quais são os efeitos tóxicos descritos para a parafenilenodiamina em células, modelos animais e em ensaios clínicos, considerando parâmetros de toxicidade, inflamação, dermatite atópica e outras potenciais reações adversas? Para otimizar a pesquisa dos dados, foi utilizado o acrônimo PICO (População, Intervenção, Comparador e *Outcome*/Desfecho), a partir do qual foram definidas as palavras-chaves a serem utilizadas na estratégia de busca, como descrito abaixo:

Para estudos *in vitro* e *in vivo*

P (população): Células ou modelos animais;

I (intervenção): Tratamento da célula e animais com a PPD;

C (comparador): Células e animais não tratados ou tratados com substância controle;

O (*outcomes*/desfechos): Desfecho primário - toxicidade da PPD. Desfechos secundários – inflamação (modulação das vias inflamatórias); dermatite atópica; hipertricose; desenvolvimento de câncer por meio de ativação das vias pró-inflamatórias; danos oxidativos ao DNA; dano lipoperoxidativo em células; efeitos mutagênicos; efeitos genotóxicos; indução de morte celular por meio de ativação de interleucinas; redução da viabilidade celular.

Para estudos clínicos

P (população): Humanos de qualquer idade;

I (intervenção): Uso de produtos contendo PPD ou testes com PPD;

C (comparador): Grupos controle (não tratados ou tratados com substância controle);

O (*outcomes*/desfechos): Desfecho primário - toxicidade de uso da PPD. Desfechos secundários –inflamação, dermatite atópica, hipertricose.

Os termos DeCS/MeSH selecionados para a busca foram: PPD, *Paraphenylenediamine*, *cosmetic*, *toxicity*, *tattoo*, *henna*, *in vivo* e *in vitro*. A Tabela 1 do Anexo 1 mostra a combinação desses termos e a quantidade de artigos encontrados em cada base de dados.

4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Os estudos foram excluídos pelos seguintes motivos: (1) estudos publicados em idiomas que utilizavam alfabeto diferente do romano; (2) estudos que não se encaixavam na estratégia PICO; (3) revisões da literatura, cartas, resumos de congressos, capítulos de livros e opiniões pessoais; (4) estudos cuja cópia completa do artigo não estava disponível; (5) relato de caso, série de caso, estudos prospectivos e estudos transversais; (6) estudos que utilizavam a PPD para tratamento de alguma doença, com efeito farmacológico.

4.4 FONTES DE INFORMAÇÃO E ESTRATÉGIAS DE BUSCA

A busca na base de dados foi realizada em 21 de agosto de 2023 e atualizada no dia 21 de junho de 2024, nas bases de dados Pubmed, Embase, Scopus, Lilacs e Medline,

e a literatura cinza foi pesquisada no Google Scholar. Houve a limitação de tipo de estudos, sendo incluso apenas estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* e estudos clínicos que descreviam os efeitos tóxicos da parafenilenodiamina e que evidenciavam os métodos de desintoxicação da PPD. Para a pesquisa não houve limitação de data de estudo, sendo incluídos todos os estudos que apareceram nas buscas, exceto na literatura cinzenta que foi estabelecido a seleção dos estudos até a décima página de busca.

4.5 SELEÇÃO DE ESTUDOS

A seleção dos estudos foi realizada em duas fases. Na primeira fase, duas revisoras (Kimberly Kefanny Batista Miranda e Hanna Santana de Almeida), utilizando o Rayyan, avaliaram de forma independente os títulos e resumos de todos os estudos adicionados ao aplicativo que foram encontrados nos bancos de dados por meio das estratégias de buscas. Ao final da leitura dessa etapa, foram discutidas as divergências, até o acordo mútuo entre as revisoras. Os estudos que não estavam em conformidade com os critérios de elegibilidade foram excluídos no processo de seleção de dados.

Na segunda fase, os artigos aprovados na primeira fase foram lidos na íntegra para realizar a confirmação da sua elegibilidade. As mesmas duas revisoras realizaram a leitura na íntegra dos artigos de forma independente. Ao final da leitura dos artigos, foram discutidas as divergências, até o acordo mútuo entre as revisoras.

4.6 PROCESSO DE COLETA DE DADOS

A extração de dados foi realizada por uma revisora (Kimberly Kefanny Batista Miranda) e os dados coletados foram revisados por uma segunda revisora (Hanna Santana de Almeida). A coleta de dados foi realizada com auxílio de uma planilha elaborada para esta RS. Os dados extraídos dos artigos elegíveis incluíram os nomes dos autores, o ano de publicação, o país, as características da população/grupo estudado, tipo do estudo (ensaio clínico, *in vitro* ou *in vivo*), o que foi analisado, quantidade de PPD e maneira na qual foi usada, métodos usados para a análise, principais achados e a conclusão do artigo.

4.7 RISCO DE VIÉS E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS ESTUDOS

Na etapa de análise do risco de viés, os artigos foram avaliados quanto aos métodos de randomização, alocação, tratamento, intervenção, cegamento, métodos utilizados para testes, descrição dos métodos, identificação do tipo de estudo e aprovação ética para estudo pelos comitês de ética. A avaliação foi feita para todos os estudos selecionados para a revisão sistemática. A ferramenta ROBINS-I (*Risk of Bias in Non-*

randomized Studies of Intervention) da Cochrane foi utilizada para estudos clínicos não randomizados¹²⁵. Os critérios do SYRCLE's (*Systematic Review Centre for Laboratory Animal Experimentation*)¹²⁶ foram aplicados para estudos *in vivo*, e a lista de verificação QUIN TOOL (*Quality Assessment Tool For In vitro Studies*)¹²⁷ foi usada para estudos *in vitro*. Ambas as revisoras conduziram a avaliação do risco de viés e, em caso de empate, a coordenadora (Maria de Fátima Borin) tomou a decisão.

4.7.1 ENSAIOS CLÍNICOS

A ferramenta ROBINS-I é indicada pela Cochrane para a análise do risco de viés de estudos clínicos não randomizados¹²⁵. A ferramenta consiste em sete domínios de avaliação, e cada um deles é guiado por perguntas que podem ser respondidas como sim (Y), provavelmente sim (PY), não (N), provavelmente não (PN), sem informação (NI) ou não se aplica (NA)¹²⁵. A partir da avaliação de cada pergunta no domínio, obtém-se uma visão geral do risco de viés daquele domínio¹²⁵. Cada domínio pode ser pontuado como de baixo risco, risco moderado, risco sério e risco crítico¹²⁵.

O primeiro domínio é utilizado para a análise do risco de viés devido à confusão do efeito da intervenção¹²⁵. No segundo domínio, é avaliado o viés na seleção de participantes para o estudo¹²⁵.

No terceiro domínio é avaliado o viés de classificação das intervenções¹²⁵, no quarto domínio é avaliado o viés devido a desvios das intervenções pretendidas, no quinto domínio é avaliado o viés a dados faltantes, no sexto domínio é avaliado o viés na medição dos desfechos, no sétimo e último domínio é avaliado o viés na seleção dos resultados¹²⁵. Para cada domínio há um grupo de perguntas específicas a serem respondidas, que estão descritas no Anexo 4.

Após a resposta de todos esses itens, foi gerada uma tabela contendo apenas a resposta final de cada domínio. Essa tabela foi adicionada ao site *robvis*, que é uma ferramenta que cria figuras de avaliação de risco de viés¹²⁵.

4.7.2 ESTUDOS IN VIVO

Para os estudos *in vivo*, foi realizada a análise do risco de viés utilizando o *checklist* do SYRCLE¹²⁶. Nessa ferramenta, o risco de viés é avaliado a partir da análise de seis domínios. Cada domínio pode ser respondido como Sim, Não ou Incerto¹²⁶.

No primeiro domínio avalia-se o risco de viés de seleção dos animais, por meio de três questões de sinalização (QS1, QS2 e QS3)¹²⁶. A QS1 busca determinar se a sequência de alocação foi gerada e aplicada adequadamente¹²⁶. Há uma subpergunta que investiga se os pesquisadores descreveram um componente aleatório no processo de geração de sequência¹²⁶. A QS2 questiona se os grupos eram semelhantes na linha de base ou foram ajustados para fatores de confusão na análise¹²⁶. Este questionamento é feito por meio de três subperguntas: a distribuição das características relevantes da linha de base foi balanceada para os grupos de intervenção e controle? Se relevante, os pesquisadores ajustaram adequadamente para distribuição desigual de algumas características relevantes da linha de base na análise? O momento da indução da doença foi adequado?¹²⁶. Por fim, a QS3 avalia se a alocação para os diferentes grupos foi adequadamente ocultada durante o estudo¹²⁶. Isso é investigado por meio de uma subpergunta que verifica se o investigador responsável pela alocação dos animais nos grupos de intervenção ou controle não poderia prever a designação deles, seja por meio de codificação dos grupos, randomização ou uso de envelopes opacos, sequencialmente numerados e lacrados¹²⁶.

No segundo domínio avalia-se o risco de viés de desempenho dos animais, por meio de duas questões de sinalização (QS4 e QS5)¹²⁶. A QS4 busca determinar se os animais foram alojados aleatoriamente durante o experimento¹²⁶. Há uma subpergunta que investiga se os autores colocaram aleatoriamente as gaiolas ou os animais dentro da sala/instalação dos animais¹²⁶. A QS5 questiona se os cuidadores e pesquisadores foram cegados do conhecimento de qual intervenção cada animal recebeu durante o experimento¹²⁶. Este questionamento é feito por meio de uma subpergunta que busca avaliar se o cegamento dos cuidadores e pesquisadores foi garantido, e se era improvável que tivesse sido comprometido¹²⁶.

No terceiro domínio avalia-se o risco de viés de detecção das intervenções, por meio de duas questões de sinalização (QS6 e QS7)¹²⁶. A QS6 busca determinar se os animais foram selecionados aleatoriamente para avaliação de resultado¹²⁶. Há uma subpergunta que investiga se os pesquisadores escolheram aleatoriamente um animal durante a avaliação de resultados ou usaram um componente aleatório na geração de sequência para avaliação de resultados¹²⁶. A QS7 questiona se o avaliador de resultados fez a análise a cego¹²⁶. Este questionamento é feito por meio de uma subpergunta que visa identificar se o cegamento do avaliador foi garantido e se era improvável que o cegamento pudesse ter sido comprometido¹²⁶.

No quarto domínio avalia-se o risco devido a dados ausentes¹²⁶. Isso é abordado por meio de uma única questão de sinalização (QS8), que investiga se os dados de resultados incompletos foram abordados adequadamente¹²⁶. Para isso, são feitas quatro subperguntas norteadoras: Todos os animais foram incluídos na análise? Os motivos para dados de resultados ausentes provavelmente não estavam relacionados ao resultado verdadeiro? Os dados de resultados ausentes são equilibrados em números entre os grupos de intervenção, com motivos semelhantes para dados ausentes entre os grupos? Os dados de resultados ausentes são imputados usando métodos apropriados? ¹²⁶.

No quinto domínio avalia-se o risco devido a relatos seletivos¹²⁶. Isso é abordado por meio de uma única questão de sinalização (QS9), que investiga se os relatórios do estudo estão livres de resultados seletivos¹²⁶. Para isso, são feitas duas perguntas: a primeira pergunta verifica se o protocolo do estudo estava disponível e se todos os desfechos primários e secundários pré-especificados foram relatados no manuscrito atual¹²⁶. A segunda pergunta investiga se, caso o protocolo não estivesse disponível, ficou claro que o relatório publicado incluiu todos os desfechos esperados, comparando as seções de métodos e resultados ¹²⁶.

Por fim, o último domínio, busca avaliar outros possíveis riscos de viés¹²⁶. Isso é abordado por meio de uma única questão de sinalização (QS10), que investiga se o estudo estava aparentemente livre de outros problemas que poderiam resultar em alto risco de viés¹²⁶. Para essa avaliação, são feitas cinco subperguntas: O estudo estava livre de contaminação, como o agrupamento de medicamentos? O estudo estava livre de influência inadequada de financiadores? O estudo estava livre de erros de unidade de análise? Os riscos de viés específicos do projeto estavam ausentes? Novos animais foram adicionados aos grupos controle e experimental para substituir os que desistiram da população original? ¹²⁶.

O artigo que descrevia a presente ferramenta não apresentava um cálculo para realizar a separação de baixo, médio e alto risco de viés. Dessa maneira, após a avaliação de cada domínio, foi feita uma adaptação do método e foi criada uma fórmula para poder quantificar os resultados do risco de viés. Caso o resultado fosse maior que 70% o estudo foi classificado como baixo risco de viés. Resultados entre 50 e 70% foram considerados como estudos de médio risco e viés, e aqueles com pontuação inferior a 50% foram classificados como de alto risco de viés. A fórmula utilizada para o cálculo foi a seguinte:

$$Pontuação\ final = \frac{(Total\ da\ pontuação\ x\ 100)}{(número\ de\ critérios\ aplicados)}$$

Após a análise desses domínios, foi criada uma tabela contendo apenas as respostas das perguntas principais de cada domínio. Com base nessa tabela, foi gerado um gráfico para comparação das respostas de cada artigo em seus respectivos domínios.

4.7.3 ESTUDOS *IN VITRO*

Para os estudos *in vitro*, foi realizada a análise do risco de viés utilizando o checklist QUIN TOOL¹²⁷. Nesta ferramenta, o risco de viés é avaliado a partir de doze domínios¹²⁷. Cada um pode ser pontuado como “adequadamente especificado” (2 pontos), “inadequadamente especificado” (1 ponto), “não especificado” (0 ponto) ou “não se aplica” (-)¹²⁷. Cada pergunta apresenta pontos norteadores para auxiliar nas resposta ¹²⁷.

Os domínios avaliam se os artigos relatam objetivos claramente declarados, explicação detalhada do cálculo do tamanho da amostra, explicação detalhada da técnica de amostragem, detalhes do grupo de comparação, explicação detalhada da metodologia, detalhes do operador, randomização, método de medição dos desfechos, detalhes do avaliador de desfechos, cegamento, análise estatística, e apresentação dos resultados, em que todos os dados devem ser adequadamente tabulados, com os dados de linha de base claramente especificados¹²⁷.

Após a avaliação de cada domínio, feita de acordo com as especificações descritas no artigo, foi realizado o cálculo para estabelecer qual é a pontuação final do risco de viés¹²⁷. Caso o resultado seja maior que 70% o estudo é classificado como baixo risco de viés. Resultados entre 50 e 70% apresentam estudos de médio risco e viés. Aqueles com pontuação inferior a 50% são classificados como alto risco de viés. A fórmula utilizada para o cálculo é a seguinte:

$$Nota\ Final = \frac{(Total\ da\ pontuação\ x\ 100)}{(2x\ número\ de\ critérios\ aplicados)}$$

Após a análise desses domínios, foi criada uma tabela contendo apenas as respostas das perguntas principais de cada domínio¹²⁷. Com base nessa tabela, foi gerado um gráfico que permitiu a comparação das respostas de cada artigo em seus respectivos domínios.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDOS SELECIONADOS

Nessa etapa, o diagrama de fluxo PRISMA 2020 foi utilizado para demonstrar o processo sistemático da busca e elegibilidade dos artigos (Figura 1)¹²³. Foram identificados 2.463 resumos nas bases de dados eletrônicas (PUBMED, Embase, Scopus, Lilacs, Medline) somados com a literatura cinzenta (Google Scholar). Para a pesquisa não foi utilizado o filtro de limite de tempo, apenas se os estudos apresentavam efeitos tóxicos da PPD. Após a remoção das duplicatas restaram 1.120 artigos, e com esse número foi realizada a Fase 1 da seleção, leitura de títulos e resumos. Nesta fase, 978 artigos foram excluídos e 142 seguiram para a Fase 2, de leitura na íntegra dos artigos. Seis artigos não foram encontrados para leitura na íntegra, apesar das buscas no ResearchGate, através do serviço COMUT da Biblioteca Central da Universidade de Brasília e tentativas de contato direto com os pesquisadores por e-mail. Após a análise de cada artigo, 90 artigos foram eleitos para esta síntese descritiva e 52 foram excluídos, como descrito no fluxograma abaixo.

Os 90 artigos incluídos nesta síntese descritiva 4 estudos eram ensaios clínicos não randomizados¹²⁸⁻¹³¹, 27 eram estudos *in vivo*^{1,21,25,26,38-40,45,47,54,65,68,74,100,104,112,119,132-141}, 46 eram estudos *in vitro*^{16,18,30,34,36,53,56,64,69,73,75,79,117,118,142-171}, 11 eram *in vivo* e *in vitro*^{37,172-181}, 2 eram ensaios clínicos não randomizados e *in vitro*^{182,183}.

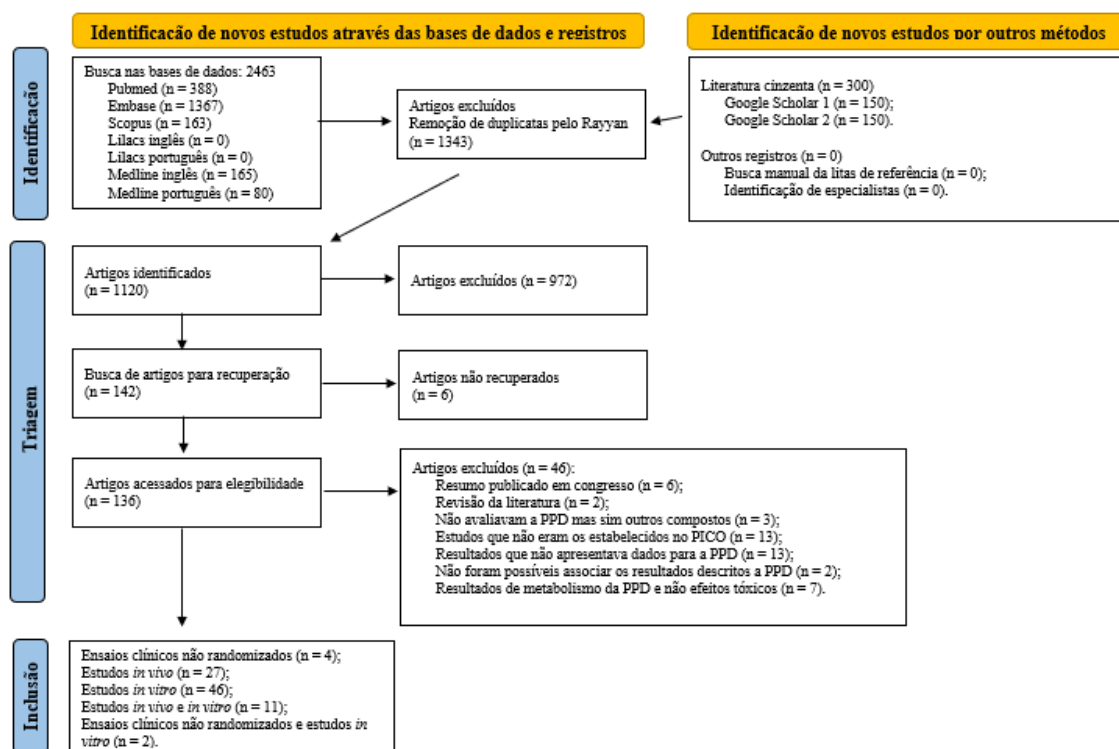


Figura 1. Fluxograma do resumo do processo de triagem dos artigos selecionados para esta revisão. Adaptado do PRISMA 2020¹²³.

5.2 CARACTERÍSTICA DOS ESTUDOS

Os estudos incluídos na revisão foram publicados em inglês, e os países dos estudos incluídos na pesquisa foram Emirados árabes (1)¹⁴¹, Espanha (1)¹⁷⁴, Irã (2)^{168,170}, Malásia (1)¹⁶², Suíça (1)¹⁶¹, Suécia (1)¹⁵⁷, Brasil (2)^{156,169}, Nigéria (1)¹³³, Portugal (1)¹⁵⁴, Países Baixos (1)¹⁴⁸, Alemanha (7)^{131,145,150,155,160,171,183}, França (5)^{56,80,146,151,176}, Egito (1)³⁸, Marrocos (1)⁷³, Bélgica (1)¹⁷², Itália (4)^{117,118,129,149}, Japão (9)^{100,119,132,139,140,153,167,171,178}, Dinamarca (4)^{65,112,173,182}, Tailândia (2)^{37,130}, Coreia do Sul (5)^{54,164,166,179,184}, Estados Unidos (12)^{21,30,104,134,136–138,144,152,165,177}, Nova Zelândia (2)^{51,52}, Índia (9)^{25,26,39,45,53,68,74,142,159}, Arábia Saudita (2)^{1,40}, Inglaterra (6)^{69,79,128,135,158,175}, Taiwan (5)^{16,34,64,143,163} e China (3)^{36,180,181}. (Figura 2).

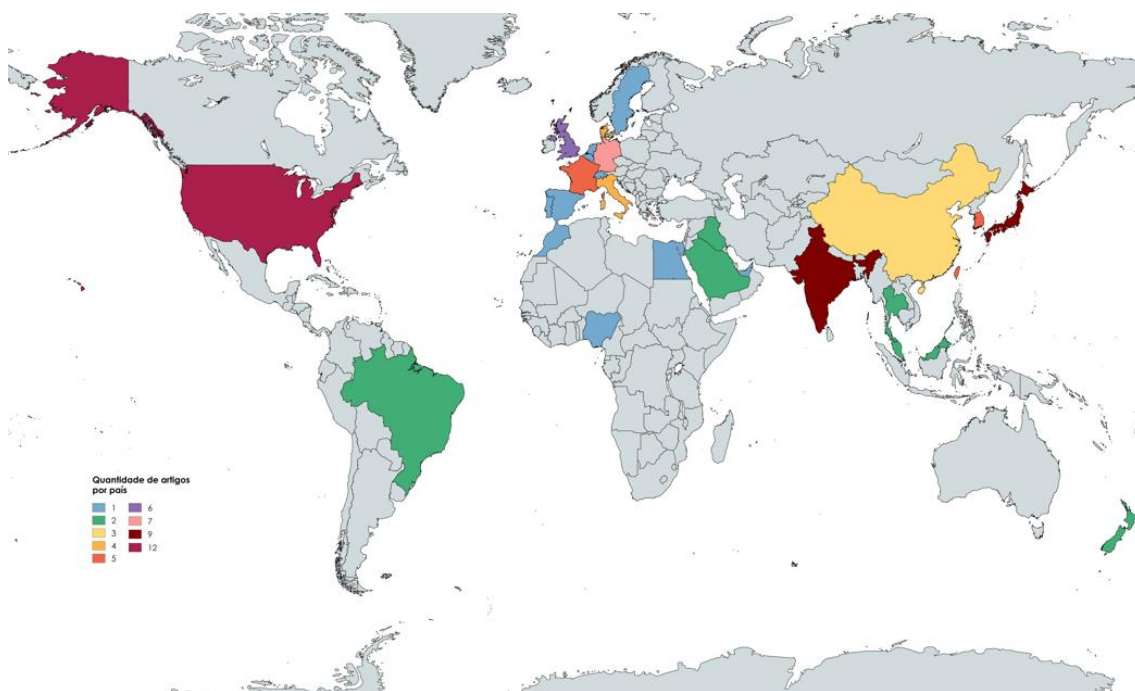


Figura 2. Quantidade de artigos publicados por país no estudo realizado.

5.3 CARACTERÍSTICA DOS ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS INCLUÍDOS NA REVISÃO

5.3.1 ESTUDOS *IN VIVO*

Os efeitos tóxicos da PPD descritos nos estudos *in vivo* estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Efeitos relatados para a PPD em estudos *in vivo* (continua).

Estudos <i>in vivo</i>		
Modelo Animal	EFEITOS DESCRITOS	REFERÊNCIA
Coelhos albinos da Nova Zelândia	Levemente irritante	Lloyo et al., 1977 ¹³⁵
	Aparecimento de eritema	
	Pelo dos animais adquiriu coloração preta após a primeira aplicação	Wadaan et al., 2005 ¹
	Na semana 8 o pelo se mostrou seco e podia ser facilmente separado do couro cabeludo	
	Presença de alopecia nas costas e cabeça (a partir da semana 16)	
	Sensibilidade da pele com hiperemia irregular e surgimento excessivo de crosta (semana 20)	
	Sinais de desconforto, comportamento irritado e perda de peso (redução na ingestão da dieta)	
Ratos linhagem CFY	Letargia	Lloyo et al., 1977 ¹³⁵
	Pieloereção	
	Aumento da salivação	
	Ataxia	
	Tremores corporais finos	
	Alteração na frequência respiratória	
	Alteração na diurese	
	Diarréia	
	Escurecimento do fígado	
	Escurecimento dos rins	
	Escurecimento ou palidez do baço	
	Hemorragia nos pulmões	
	Hemorragia no intestino	
Ratos Charles River	Aumento de peso	El-Amin et al., 2014 ⁴⁰
	Dose letal mediana (LD50) de 28 mg/kg	Burnett et al., 1977 ²¹
	Redução da fertilidade	
	Mortes na dose de 5 g/kg	
Ratos F344	Retardamento no ganho de peso	Hagiwara et al., 1990 ¹³² Katsumi et al., 1982 ¹⁰⁰
	Presença de degeneração gordurosa do fígado	Katsumi et al., 1982 ¹⁰⁰
	Maior incidência de feocromocitomas da glândula adrenal	
	Aumento do peso do fígado	Hagiwara et al., 1990 ¹³² Katsumi et al., 1982 ¹⁰⁰
	Aumento do peso do rim	Katsumi et al., 1982 ¹⁰⁰
	Redução do peso médio do baço	

Legenda: LD50 – dose letal mediana.

Tabela 1 – Efeitos relatados para a PPD em estudos *in vivo* (continuação).

Modelo Animal	Estudos <i>in vivo</i>	
	EFEITOS DESCRITOS	REFERÊNCIA
Ratos Sprague-Dawley	Necrose coagulativa centrolobular	Bharali et al., 2009 ²⁶
	Necrose tubular	Bharali et al., 2012 ⁷⁴
	Necrose periportal grave na dose de 1mg/kg	Bharali et al., 2009 ²⁶
	Deposição fibrinosa no parênquima hepático	Bharali et al., 2009 ²⁶
	Deposição fibrinosa na região basal dos túbulos seminíferos	Bharali et al., 2012 ²⁵
	Degeneração hidrópica de hepatócitos	Bharali et al., 2009 ²⁶
	Inflamação tubular intersticial	Bharali et al., 2012 ⁷⁴
	Inflamação periportal na dose de 1mg/kg	Bharali et al., 2009 ²⁶
	Infiltração de leucócitos	Bharali et al., 2012 ⁷⁴ Bharali et al., 2009 ²⁶
	Presença de linfocitose	Bharali et al., 2012 ³⁹
	Presença de leucocitose	
	Presença de características morfológicas apoptótica no epitélio seminífero quando tratados com 2 e 3mg/kg	Bharali et al., 2012 ²⁵
	Presença de descamação de células germinativas no lúmen dos túbulos seminíferos	
	Hemorragia extensa no tecido hepático	Bharali et al., 2009 ²⁶
	Edema dos tecidos intersticiais	Bharali et al., 2012 ²⁵
	Aumento do peso do fígado	Bharali et al., 2009 ²⁶
	Aumento da proliferação de células B	Bharali et al., 2012 ³⁹
	Aumento do acúmulo de neutrófilos no parênquima hepático	Bharali et al., 2009 ²⁶
	Aumento da lipoperoxidação	Lee et al., 2008 ⁵⁴
	Aumento da taxa de peroxidação lipídica no tecido testicular	Bharali et al., 2012 ²⁵
	Aumento de reticulócitos nas doses de 2 e 3 mg/kg	Bharali et al., 2012 ⁷⁴
	Aumento da creatinina sérica	
	Aumento da creatinina fosfoquinase	Bharali et al., 2009 ²⁶
	Aumento dos níveis de alanina aminotransferase	
	Aumento dos níveis de aspartato aminotransferase	
	Aumento dos níveis de fosfatase alcalina	
	Aumento de hemoglobina nas doses de 3 mg/kg	
	Aumento da porcentagem de morfologia anormal dos espermatozoides nas doses de 2 e 3mg/kg	Bharali et al., 2012 ²⁵
	Aumento de células apoptóticas nos túbulos seminíferos	
	Retenção de espermátides	Bharali et al., 2012 ⁷⁴
	Redução do volume corpuscular médio na dose de 3 mg/kg	
	Redução do tamanho da hemoglobina	

Tabela 1 – Efeitos relatados para a PPD em estudos *in vivo* (continuação).

Estudos <i>in vivo</i>		
Modelo Animal	EFEITOS DESCRITOS	REFERÊNCIA
Ratos Sprague-Dawley	Redução dos glóbulos vermelhos na dose de 3 mg/kg	Bharali et al., 2012 ³⁹
	Redução dose-dependente na concentração de espermatozoides nas caudas dos epidídimos	Bharali et al., 2011 ²⁵
	Redução da população de células germinativas no epitélio seminífero quando tratados com 2 e 3 mg/Kg	
Ratas Sprague-Dawley	Necrose do gastrocnêmio a 200 mmol/kg/dia	Munday et al., 1999 ⁴⁷ Kitchin et al., 1993 ¹³⁴
	Necrose do diafragma a 200 mmol/kg/dia	
	Necrose da língua 200 mmol/kg/dia	
	Fração de DD foi de 0,099 ± 0,02	
	ODC foi de 7,86 ± 3,3	
	ALT (IU/L) foi de 14,1 ± 1,9	
	P450 (nmoles/g) foi de 2,16 ± 0,21	
Ratos Wistar	Edema na cabeça com uso de 20 mg/kg	El-Amin et al., 2014 ⁴⁰
	Edema no pescoço com uso de 20 mg/kg	
	Edema na faringe com uso de 20 mg/kg	
	Fraqueza com uso de 10 e 30 mg/kg	
	Alopecia com uso de 30 mg/kg	
	Dificuldade respiratória com uso de 30 mg/kg	
	Convulsão com uso de 30 mg/kg	
	Sinais de anemia	Rojanapo et al., 1986 ³⁷
	Tumores da glândula mamária (fêmeas)	
	Tumores de tecido mole (fêmeas)	
	Tumores no útero (fêmeas)	
	Fibromatose de tecidos moles	Jen et al., 2023 ¹³³
	Afinamento do epitélio da pele	
	Distorção no arranjo das células epiteliais tubulares renais	
	Distorção no arranjo dos hepatócitos no fígado	Arafa et al., 2020 ¹⁴¹
	Danos das células alveolares	
	Danos nos rins	
	Danos nos hepatócitos	Jen et al., 2023 ³³
	Infiltração de células inflamatórias no tecido hepático	
	Concentração de IC50 de 100 µM	Seydi et al., 2018 ¹⁶⁸
	Presença de atividade deprimida nas concentrações de 10 e 20 mg/kg	de Mas et al., 2017 ¹⁷⁴
	Presença de mioglobínúria nas concentrações de 10 e 20 mg/kg	
	Presença de danos na traqueia (dose-dependente)	Arafa et al., 2020 ¹⁴¹

Legenda: IC50 – concentração inibitória 50. ODC - ornitina descarboxilase hepática. ALT - alanina aminotransferase sérica. DD - DNA eluído

Tabela 1 – Efeitos relatados para a PPD em estudos *in vivo* (continuação).

Modelo Animal	Estudos <i>in vivo</i>	
	EFEITOS DESCRITOS	REFERÊNCIA
Ratos Wistar	Aumento de transaminase oxalacética	El-Amin et al., 2014 ⁴⁰
	Aumento de alanina aminotransferase	El-Amin et al., 2014 ⁴⁰ de Mas et al., 2017 ¹⁷⁴ Arafa et al., 2020 ¹⁴¹
	Aumento de asparato aminotransferase	de Mas et al., 2017 ¹⁷⁴ Arafa et al., 2020 ¹⁴¹
	Aumento de lactate desidrogenase	de Mas et al., 2017 ¹⁷⁴
	Aumento de fosfatase alcalina	El-Amin et al., 2014 ⁴⁰
	Aumento da glicose sanguínea (dose-dependente)	
	Aumento de plaquetas	
	Aumento de linfócitos	
	Aumento da creatina quinase	de Mas et al., 2017 ¹⁷⁴ Arafa et al., 2020 ¹⁴¹
	Aumento da atividade de creatina	Arafa et al., 2020 ¹⁴¹
	Aumento da atividade de creatinofosfoquinase Fração MB	
	Aumento da bilirrubina	
	Aumento da ureia no soro	
	Aumento do tamanho do pulmão e fígado	
	Aumento da taxa de mortalidade	El-Amin et al., 2014 ⁴⁰
	Diminuição proteínas plasmáticas totais	
	Diminuição de albumina	
	Diminuição de colesterol	
	Diminuição de hemoglobina	
	Diminuição de contagem de glóbulos vermelhos	
	Diminuição do volume globular	
	Diminuição de contagem total de glóbulos vermelhos	
	Diminuição de hemoglobina corpuscular média	
	Diminuição de volume corpuscular médio	
	Redução da quantidade de fibras de colágeno na derme	Jen et al., 2023 ³³
	Redução da viabilidade celular (exceto em 5 µM)	Seydi et al., 2018 ¹⁶⁸
	Redução dos glóbulos vermelhos na dose de 3mg/kg	El-Amin et al., 2014 ⁴⁰

Tabela 1 – Efeitos relatados para a PPD em estudos *in vivo* (continuação).

Estudos <i>in vivo</i>		
Modelo Animal	EFEITOS DESCRITOS	REFERÊNCIA
Ratos albinos	Aumento de alterações patológicas no pâncreas	Abd-ElZaher et al., 2012 ³⁸
	Presença de inflamação crônica dose-dependente no fígado	
	Presença de inflamação crônica intersticial no rim	
	Presença de inflamação crônica no coração	
	Aumento de alanina aminotransferase	
	Aumento de aspartato aminotransferase	
	Aumento de fosfatase alcalina	
	Aumento dos níveis de creatinina nos rins	
	Aumento dos níveis de ureia nos rins	
Porquinhos-da-índia	Hiperqueratose após 24 horas de exposição	Viswanathan et al., 1985 ⁶⁸
	Aumento da fosfatase ácida	Mathur et al., 1995 ⁴⁵
	Aumento da tirosinase	
	Aumento da peroxidação lipídica	
	Aumento da histamina	Mathur et al., 1995 ⁵
	Aumento da blastogênese de forma dose-dependente	Viswanathan et al., 1985 ⁶⁸
	Diminuição da histamina (após 72 horas)	Li et al., 1995 ¹¹⁹
	Potencial de sensibilização na concentração de 0,1%	Viswanathan et al., 1985 ⁶⁸
	Potencial de sensibilização da PPD, mesmo na concentração de desafio mais baixa de 0,01% (0,003 mg)	Xie et al., 2000 ¹⁴⁰ To-o et al., 2010 ¹³⁹ Kashima et al., 1996 ¹⁷⁸
Fígado embrionário de galinha	Redução da viabilidade dos ovos de maneira dose dependente	To-o et al., 2010 ¹³⁹
	Ausência da formação de adutos ou quebra de fitas de DNA	Kobets et al., 2019 ¹⁵⁵
	Aparecimento de linfomas	
Camundongos CBA/Ca	Efeito indutor de inflamação cutânea	Stenbäck et al., 1976 ¹³⁷
	Aumento de IL-6	
	Infiltração de células B	
	Proliferação de células TCD8+	
	Proliferação de células TCD4+	
Camundongos CD-1	Redução da razão de PCE/NCE	Soler-Niedziela et al., 1991 ¹⁰⁴

Legenda: DNA – ácido desoxirribonucléico, IL-6 - Interleucina 6, TCD8+ - Células T CD8+, TCD4+ - Células T CD4+, PCE - Valor de eritrócitos policromáticos, NCE - Eritrócitos normocromáticos.

Tabela 1 – Efeitos relatados para a PPD em estudos *in vivo* (continuação).

Estudos <i>in vivo</i>		
Modelo Animal	EFEITOS DESCRITOS	REFERÊNCIA
Camundongos C57BL/6	Inflamação significativa na pele	Funch et al., 2023 ¹⁷³ Rubin et al., 2010 ⁶⁵
	Indução do influxo local de células T residentes na epiderme CD8+ de memória (TRM)	Funch et al., 2023 ¹⁷³
	Indução do influxo de neutrófilos	
	Aumento do inchaço das orelhas	Funch et al., 2023 ¹⁷³ Rubin et al., 2010 ⁶⁵
	Aumento da infiltração celular	Rubin et al., 2010 ⁶⁵
	Aumento da proliferação de células T	
	Aumento de proliferação nas células TCD4+ e TCD8+ (determinadas pela célula BrdU+).	
	Aumento gradual do número de T regulador (CD4+, CD8+ e Foxp3+) e células Tr1 CD4+BrdU+IL-10+ (quarta exposição)	
	Aumento dos níveis de CXCL1	Funch et al., 2023 ¹⁷³
	Aumento dos níveis de CXCL2	
	Aumento da resposta de células T	
	Aumento do acúmulo de células TCD8+ nas orelhas	
Camundongos BALB/c	Presença de inchaço nas orelhas	Garrigue et al., 1993 ¹⁷⁶ Rothe et al., 2011 ¹³⁶ Svalgaard et al., 2014 ¹³⁸
	Aumento da proliferação de células linfocitárias	Kalish et al., 1995 ¹⁷⁷
	Aumento da proliferação de células do baço	
	Aumento do inchaço das orelhas	Garrigue et al., 1993 ¹⁷⁶ Rothe et al., 2011 ¹³⁶ Svalgaard et al., 2014 ¹³⁸
	Aumento da frequência de células TCD8+ positivas para IL-17A nos linfonodos auriculares	Svalgaard et al., 2014 ¹³⁸
	Aumento da frequência de células TCD8+ positivas para IL-17A nos linfonodos pancreáticos	
	Aumento da frequência de células TCD8+ positivas para IL-17A no baço	
	Aumento da frequência de células TCD8+ positivas para IL-10 nos linfonodos pancreáticos	
	Aumento dos níveis de linfócitos B220+ nos linfonodos	Rothe et al., 2011 ¹³⁶

Legenda: CXCL1 - Quimiocina C-X-C Ligante 1. CXCL2 - Quimiocina C-X-C Ligante 2. IL-17A - Interleucina 17A. IL-10 - Interleucina 10. B220+ - Células B220+.

Tabela 1 – Efeitos relatados para a PPD em estudos *in vivo* (continuação).

Estudos <i>in vivo</i>		
Modelo Animal	EFEITOS DESCRITOS	REFERÊNCIA
Camundongos BALB/c	Aumento dos níveis de mRNA de IL-4 hepático	Svalgaard et al., 2014 ¹³⁸
	Aumento dos níveis de mRNA de IL-4 pancreático	
	Aumento dos níveis de mRNA de IL-17A hepático	
	Aumento dos níveis de mRNA de IL-17A pancreático	
	Aumento dos níveis de mRNA de IL-10 nas orelhas	Rothe et al., 2011 ¹³⁶
	Aumento dos níveis de mRNA de IFN γ nos linfonodos	
	Aumento dos níveis de mRNA de IL-4 nos linfonodos	
	Aumento dos níveis de mRNA de Foxp3+ pancreáticos	Svalgaard et al., 2014 ¹³⁸
	Aumento dos níveis de mRNA de IL-17A pancreático	
	Aumento da frequência de células iNKT hepáticas positivas para IFN γ	
	Aumento da proporção de células iNKT positivas para IL-4	
	Diminuição dos níveis de mRNA de IL-17A nas orelhas tratadas	
	Diminuição dos níveis de IL-1b	
	Diminuição dos níveis de IL-4	
	Diminuição dos níveis de IL-5	
	Diminuição dos níveis de IL-10	
	Diminuição dos níveis de IL-12 no soro	
	Redução de células T CD3+ nos linfonodos	Rothe et al., 2011 ¹³⁶
Camundongos CBA/J	Aumento da proliferação de células linfocitárias	Kalish et al., 1995 ¹⁷⁷
	Aumento da proliferação de células dos baço	
Zebrafish	Indução de anormalidades no tamanho do edema do saco vitelínico	Oh et al., 2018 ¹⁷⁹
	Aumento da frequência cardíaca	
	Aumento significativo do estresse oxidativo medido pelo aumento da fluorescência do DCF no 3df (PPD a 250 μ g/mL)	
	Aumento de ROS	
	Aumento do nível de óxido nítrico	
	Redução da sobrevivência em 30% no 1 dpf	
	Redução da sobrevivência em 50% no 7 dpf	

Legenda: mRNA - RNA mensageiro. IFN γ - Interferon-gama. IL-4 - Interleucina 4. Foxp3+ - fator de transcrição P3. IL-17A - Interleucina 17A. iNKT - *Natural Killer T cells*. IL-1b - Interleucina 1 beta. IL-5 - Interleucina 5. IL-10 - Interleucina 10. IL-12 - Interleucina 12. T CD3+ - Células T CD3+. Dpf - dias pós-fertilização. DCF - 2',7'-dicloro-dihidrofluoresceína. ROS – espécies reativas de oxigênio.

Diversos animais foram usados para avaliar os efeitos da PPD no organismo, entre eles coelhos (2 estudos)^{1,135}, ratos (18 estudos)^{21,25,26,37-40,51,54,74,100,132-135,141,168,174}, camundongos (9 estudos)^{21,65,75,112,136-138,173,176,177}, porquinhos-da-índia (6 estudos)^{45,68,119,139,140,178}, *zebrafish* (1 estudo)¹⁷⁹ e galinha (1 estudo)¹⁵⁵.

5.3.1.1 Coelhos Albinos

Coelhos albinos da raça Nova Zelândia foram usados para avaliar o potencial irritativo da PPD na pele dos animais, conforme descrito por Lloyo et al. (1977)¹³⁵. No estudo, uma solução de PPD a 1% foi aplicada, sendo suficiente para provocar um edema leve em dois dos três animais tratados¹³⁵. Essa reação diminuiu apenas após 72 horas de observação¹³⁵. Os autores relataram que a LD₅₀ de PPD neste estudo foi de 98 mg/kg, indicando uma alta toxicidade¹³⁵.

Um segundo grupo avaliou os efeitos da PPD por meio da aplicação de tinturas capilares nos coelhos, nas regiões das orelhas, cabeça e pelos da região dorsal¹. A aplicação ocorreu uma vez por semana durante seis meses, com a tintura sendo deixada nos pelos dos animais por quinze minutos¹. Todas as áreas tratadas ficaram pretas logo após a primeira aplicação¹. A partir da oitava semana, o pelo começou a apresentar-se seco e facilmente destacado da pele¹. Na décima sexta semana, observou-se alopecia irregular em algumas regiões das costas e cabeça¹. Na vigésima semana, a pele dos animais estava sensibilizada, o que foi evidenciado pelo excesso de crostas e hiperemia irregular¹. Os animais tratados com a tintura capilar apresentaram uma resposta mais lenta aos estímulos, comportamento irritado, sinais de desconforto, redução na ingestão de ração e perda de peso corporal¹. A alergia de contato a tinturas capilares oxidativas é amplamente atribuída a intermediários primários, como a PPD, que possui potencial para induzir essas manifestações^{1,185}.

5.3.1.2 Zebrafish

Oh et al. (2018) utilizaram *zebrafish* para avaliar os efeitos protetores do extrato de *Ecklonia cava* após a exposição à PPD¹⁷⁹. *E. cava* é uma alga marinha que foi amplamente estudada por suas propriedades de sequestrar radicais livres e reduzir o estresse oxidativo em fibroblastos dérmicos e queratinócitos humanos, especialmente aqueles induzidos por radiação UV-B^{179,186-189}. As tinturas de cabelo utilizadas continham 3,5% de PPD, e foram diluídas para atingir concentrações finais de PPD em 250, 500 e 1000 µg/mL¹⁷⁹. Essas tinturas foram misturadas com o extrato de *Ecklonia cava* para se obter as concentrações finais de 5%, 7%, 9% e 11% do extrato na solução¹⁷⁹.

No estudos, foram avaliados os efeitos da exposição aos compostos na taxa de sobrevivência e taxa de eclosão dos peixes¹⁷⁹. Esses índices são utilizados para avaliar compostos tóxicos para o desenvolvimento dos animais¹⁷⁹. Os índices podem ser afetados pelo tamanho do edema do saco vitelino e por alterações na taxa de batimento cardíaco dos animais^{188,190}.

A tintura de cabelo sem *E.cava* causou a diminuição de 30% na sobrevivência dos animais no primeiro dia pós-fecundação (dpf) e cerca de 50% no sétimo dpf¹⁷⁹. Quando a tintura, 250 µg/mL, foi combinada com *E. cava* (5 e 7%) não ocorreram mortes embrionárias significativas até o sétimo dpf¹⁷⁹. A tintura sem *E.cava* causou morte embrionária no primeiro dpf e atraso da eclosão dos embriões no segundo dpf¹⁷⁹. Quando a tintura foi utilizada a 500 µg/mL, sem *E. cava*, a mortalidade embrionária foi de 100%, valor que foi reduzido para 80% quando a tintura foi misturada a *E. cava*¹⁷⁹.

Além desses pontos, os níveis de ROS e óxido nítrico (NO) foram avaliados durante as exposições, pois ambos são biomarcadores usados para avaliar o estresse oxidativo e desequilíbrio do estado redox de tecidos e células^{179,191,192}. Quando expostos a 250 µg/mL de tintura sem o extrato por 3 dpf, ocorreu um aumento significativo na geração de ROS¹⁷⁹. Esse aumento foi reduzido após a adição de 7% do extrato¹⁷⁹. Também foi observado um aumento dos níveis de NO no ensaio que utilizou tintura sem o extrato, sendo essa elevação também reduzida na presença do extrato a 7%¹⁷⁹.

5.3.1.3 Embriões de galinha

Fígado embriofetal de galinha foi exposto a diversos alérgenos monocíclicos, como a PPD, e policíclicos para avaliar sua capacidade de N-hidroxilação, acetilação, nitro-redução e conjugação com sulfato, etapas cruciais na conversão das aminas aromáticas para suas formas genotóxicas finais¹⁵⁵. A PPD foi utilizada em três concentrações diferentes, que afetaram de maneira distinta a viabilidade dos ovos de galinha: 1,2 mg/ovo (viabilidade 100%), 2,5 mg/ovo (viabilidade 89%) e 5 mg/ovo (viabilidade 67%)¹⁵⁵. Durante o experimento, não foi observada a formação de adutos ou quebra de fitas de DNA em nenhuma das concentrações mencionadas¹⁵⁵. Por fim, a PPD foi considerada não genotóxica pelo estudo, devido aos seus resultados, sendo pontuado o potencial dos embriões de galinha para a eliminação e desintoxicação do produto¹⁵⁵.

5.3.1.4 Porquinhos-da-índia

Porquinhos-da-índia foram avaliados quanto à exposição a PPD, sendo observadas inúmeras respostas, como hiperqueratose⁶⁸, aumento da fosfatase ácida⁴⁵, aumento da glutathione-S-transferase⁴⁵, aumento da tirosinase⁴⁵, aumento da peroxidação lipídica⁴⁵, aumento da blastogênese¹¹⁹ e aumento de histamina seguido por sua redução⁶⁸. Xie et al. (2000), To-o et al. (2010) e Kashima et al. (1996) calcularam o potencial de sensibilização da PPD, que foi determinado como sendo 0,1%^{139,140,178}. Além disso, To-o e colaboradores observaram que mesmo na concentração mais baixa de PPD (0,003 mg) foi possível identificar o potencial de sensibilização¹³⁹.

Viswanathan et al. (1985) aplicaram topicamente um adesivo contendo 0,1 mL de PPD (0,9% em 25% de etanol) em porquinhos-da-índia, sendo observado uma hiperqueratose, sem alterações na derme, e após 48 h foi observado grau moderado de edema e descontinuidade de algumas áreas do estrato germinativo⁶⁸. Além desses resultados, foi observado que o conteúdo de histamina na pele dos animais tratados aumentou (56,87%) em até 48 h, seguido de uma redução até 72h⁶⁸. Esse aumento de histamina, na pele, também foi observado por Mathur et al. (1995), que aplicaram a PPD por meio de uma solução de 4% (p/v) em 25% de etanol, na dose de 0,1 mL por via dérmica por 15 e 30 dias⁴⁵. O aumento da liberação de histamina é um dos indicativos de hipersensibilidade, e envolvimento de células inflamatórias, como mastócitos em consequência do aumento da descarboxilase de histidina, da mesma forma que ocorre em alergias, sendo um reflexo de uma possível indução de dermatite alérgica de contato⁶⁸. Esse cenário foi evidenciado como sendo um dos responsáveis pela vasodilatação que ocorre, facilitando o acúmulo de células inflamatórias no local de exposição, pelo aumento da permeabilidade dos capilares¹⁹³.

Mathur et al. (1995) também mostraram que a atividade de fosfatase ácida (ACP) foi aumentada nos animais tratados por 15 (35,30 nmol/min/mg de proteína) e 30 dias (34,12 nmol/min/mg de proteína), quando em comparação ao controle (25,60 nmol/min/mg de proteína)⁴⁵. Esse resultado pode estar relacionado à presença de danos celulares internos generalizados, envolvendo os lisossomos, devido ao potencial inflamatório da PPD⁴⁵. Devido ao acúmulo de tintura na pele, os níveis de glutathione (GSH) e tirosina também apresentaram-se elevados no dia 30 do tratamento⁴⁵. GSH aumentou para 250 nmol/min/mg de proteína, em relação ao controle de 180 nmol/min/mg de proteína; e tirosina aumentou para 5,26 nmol/min/mg de proteína, em

relação ao controle de 2,14 nmol/min/mg de proteína), sendo isso vinculado a alterações dermatopatológicas na pele tratada⁴⁵. Por fim, o estudo apresentou a ocorrência do aumento de peroxidação lipídica (LPO) nos dias 15 (20,19 (nmol/MDA/h/g) e 30 (23,42 nmol/MDA/h/g), em comparação ao controle (16,00 nmol/MDA/h/g) após o tratamento com a PPD, sendo isso possivelmente devido a formação de espécies reativas e danos aos tecidos⁴⁵.

5.3.1.5 Camundongos

Diversos estudos selecionaram camundongos como modelos para avaliação do efeito da PPD, e, ao todo, foram usadas 6 linhagens, entre elas Swiss Webster^{21,137}, CBA/Ca¹¹², CD-1¹⁰⁴, C57BL/6^{65,173}, BALB/c^{136,138,176,177} e CBA/J¹⁷⁷.

Stenbäck et al. (1976) utilizaram 5% e 10% de PPD, dissolvidos em acetona, que foram aplicados duas vezes por semana na pele de camundongos fêmeas da linhagem Swiss Webster¹³⁷. Foi observado que quando expostos a 5% de PPD, dos 44 animais tratados, 27 apresentaram tumores, 16 apresentaram linfoma, 6 apresentaram adenoma pulmonar, 4 apresentaram hemangioma hepático e 4 apresentaram neoplasia ovariana e 1 apresentou fibroma subcutâneo¹³⁷. E quando tratados com 10% de PPD, dos 49 animais tratados, 24 apresentaram tumores, sendo que 19 apresentaram linfoma, 6 apresentaram adenoma pulmonar, 1 apresentou hemangioma hepático, 6 apresentaram neoplasia ovariana e 1 apresentou fibroma subcutâneo¹³⁷. Os autores observaram que a presença de diversos tumores nos estudos era difícil de ser explicada, devido à possibilidade de surgimento de tumores espontâneos, tempo de vida curto dos animais, número limitado de animais utilizados, solubilidade limitada do composto e dificuldade de aplicação de doses muito grandes por via percutânea¹³⁷.

Kalish et al. (1995) apresentaram como objetivo o desenvolvimento de protocolos eficazes de sensibilização de camundongos a alérgenos de contato, com foco na PPD, com o intuito de diminuir o uso de animais em estudos de reatividade cruzada a antígeno¹⁷⁷. As respostas foram testadas em camundongos CBA/J e Balb/C, sendo realizadas duas abordagens de sensibilização, a injeção intraperitoneal contendo células do baço já sensibilizadas e a aplicação tópica¹⁷⁷. Os animais foram separados em grupos que receberam ou não a suplementação com a vitamina A para avaliar se isto causaria alguma alteração na resposta inflamatória à PPD¹⁷⁷. A sensibilização foi alcançada para os animais submetidos às duas vias de exposição, e foi possível observar que a administração tópica nas costas levou a sensibilizações maiores do que as que foram feitas

no abdômen por injeção intraperitoneal¹⁷⁷. A suplementação da vitamina A contribuiu para uma resposta aumentada à PPD¹⁷⁷. A vitamina A é conhecida por aumentar a resposta imune a diversos alérgenos de contato, incluindo fragrâncias e a PPD, além de apresentar múltiplos efeitos no sistema imunológico¹⁷⁷. Os efeitos da vitamina A no sistema imunológico incluem a reconstituição de IgG em camundongos deficientes de vitamina A e o aumento da ativação de macrófagos¹⁷⁷. Camundongos alimentados com vitamina A apresentaram aumento no número e na função de células linfáticas apresentadoras de antígenos¹⁷⁷.

Bonefeld et al. (2009) investigaram o potencial sensibilizante cutâneo de tinturas capilares permanentes em camundongos¹¹². O estudo envolveu camundongos fêmeas, nos quais foram analisadas oito condições diferentes¹¹². A aplicação foi realizada na região dorsal das orelhas dos animais¹¹². Os diferentes grupos de tratamentos incluíram: controle, 25µL de 0,1% de PPD, 0,25% de PPD ou 1% de PPD em acetona/óleo de oliva (4:1), 25µL mistura de tintura de cabelo com gel corante e 25µL mistura de tintura de cabelo com 25 oxidante (1:1), 12,5µL de gel colorante e oxidante sem a tintura (mistura)¹¹².

Os resultados revelaram respostas distintas para cada grupo¹¹². A análise da espessura das orelhas indicou que a PPD foi um potente indutor de inflamação cutânea¹¹². O oxidante isolado causou um leve inchaço, enquanto o gel corante provocou um inchaço significativo, acompanhado de infiltração de células TCD3+¹¹². Após a lavagem da mistura, observou-se uma redução no inchaço da pele¹¹².

A análise histológica das orelhas mostrou que os animais tratados com o oxidante apresentaram poucas células inflamatórias em comparação com os do grupo controle¹¹². O gel corante e a mistura (sem lavagem) causaram inflamação profunda com infiltração neutrofílica e necrose em algumas áreas¹¹². Além disso, o corante e a mistura (sem lavagem) induziram a presença de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6¹¹². Na região onde foi aplicado o corante, não houve presença dessas citocinas; no entanto, onde foi aplicada a mistura, as citocinas estavam presentes em concentrações 15 a 30 vezes maiores que a dos animais controle¹¹².

Por fim, a análise da infiltração de células B nos linfonodos drenantes revelou que a resposta foi observada no grupo que recebeu 1% de PPD, no tratado com o gel e com a mistura (sem lavagem)¹¹². A resposta no grupo tratado com o gel foi aproximadamente

duas vezes maior do que no grupo tratado com 1% de PPD¹¹². Tanto o gel quanto a mistura induziram a proliferação de células TCD4+ e TCD8+¹¹². A infiltração no grupo tratado com gel foi 30% maior do que no grupo tratado com oxidante¹¹². A lavagem da mistura resultou em uma redução de cerca de 25% no infiltrado, sem afetar a infiltração de células TCD4+ e TCD8+¹¹².

Esses achados demonstram que as tinturas capilares possuem um forte potencial sensibilizante cutâneo, induzindo inflamações profundas, produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α), liberação sistêmica de IL-6, infiltração de células B e T, e proliferação de células T nos linfonodos drenantes¹¹². Além disso, o estudo evidenciou que o potencial alergênico das tinturas de cabelo é maior sob condições de uso em comparação com o gel corante e os componentes oxidantes isolados¹¹².

Após a exposição a alergênicos, os queratinócitos e as células de Langerhans iniciam a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-1 β e TNF- α , que atuam como mediadores na fase aguda da resposta imune, promovendo o recrutamento de neutrófilos e a produção de proteínas inflamatórias¹¹².

Os efeitos das respostas imunológicas pró e anti-inflamatórias da PPD e a determinação dos mecanismos imunopatogênicos eliciados por alérgenos de contato clinicamente relevantes em camundongos C57BL/6 foram estudados por Rubin et al. (2010)⁶⁵ e Funch et al. (2023)¹⁷³, sendo evidenciado uma inflamação significativa na pele^{65,173}, indução do influxo local de células T CD8+ de memória persistentes na epiderme¹⁷³, indução de influxo de neutrófilos^{65,173}, aumento do inchaço das orelhas^{65,173}, aumento da infiltração celular⁶⁵, aumento da proliferação de células T⁶⁵, aumento gradual do número de T regulador (CD4+, CD8+ e Foxp3+) e células Tr1 CD4+BrdU+IL-10+ (quarta exposição)⁶⁵, aumento dos níveis de CXCL1¹⁷³, CXCL2¹⁷³, aumento da resposta de células T e aumento do acúmulo de células T CD8+ nas orelhas¹⁷³.

A resposta imunológica a alérgenos de contato é regulada por vários mecanismos⁶⁵, e em boa parte acabam levando a indução de células T reguladoras (Tregs)^{65,194,195}. Diferentes tipos de Treg foram descritos, como células T CD4+ CD25+ Foxp3+ naturalmente presentes, células T CD4+ CD25+ Foxp3+ induzidas e células Tr1 e Th3, definidas pela liberação proeminente de IL-10 e TGF- β , respectivamente^{65,196}. As células mencionadas, são capazes de realizar o controle da resposta imunológica a alérgenos de contato, evitando o desenvolvimento e a função de células T efectoras

específicas para alérgenos^{65,114,194–196}. Essas ações ocorrem por meio da liberação de citocinas anti-inflamatórias, como TGF- β e IL-10, ou pela interação célula-a-célula⁶⁵.

Rubin et al. (2010) indicaram que, após a segunda exposição à tintura de cabelo, foi observada uma leve inflamação na pele dos animais, que gradualmente aumentou, atingindo o pico na quarta exposição⁶⁵. Essa cinética de alteração se repetiu quando os autores monitoraram a proliferação das células T CD4⁺ (anti-inflamatória) e CD8⁺ (pró-inflamatória)⁶⁵. Isso sugere que o intervalo entre as exposições às tinturas de cabelo afeta a resposta imunológica⁶⁵.

A exposição à tintura de cabelo também induziu a ativação de células Th1, Tc1 e Th17, todas sendo células T efetoras envolvidas nas respostas alérgicas a alérgenos de contato^{65,114}. Enquanto a resposta Th1 foi diretamente correlacionada ao número de exposições, as respostas Tc1 e Th17 atingiram seu pico após a quarta exposição, seguidas de uma redução subsequente⁶⁵. Considerando que as células Tc1 são uma das principais efetoras na mediação da hipersensibilidade de contato, era esperado que seu aumento continuasse proporcionalmente ao número de exposições⁶⁵. No entanto, a redução observada, juntamente com a de Th17, sugere que exposições repetidas podem levar à exaustão das células T, possivelmente devido à indução de mecanismos imunorregulatórios ou à apoptose⁶⁵.

Os autores sugerem que esse equilíbrio entre os mecanismos inflamatórios pode explicar por que apenas 5,3% dos indivíduos expostos a tinturas de cabelo apresentam reações alérgicas⁶⁵. Além disso, apenas 15,6% desses indivíduos buscaram atendimento médico após a reação^{3,65}. Portanto, é provável que mais indivíduos experimentem reações cutâneas leves após as primeiras exposições à tintura de cabelo, antes que esse equilíbrio imunológico seja induzido⁶⁵.

Funch et al., 2023 mostraram que quando a pele é exposta a alérgenos de contato, na epiderme ocorre o desenvolvimento de células CD8⁺TRM, sendo elas mediadoras rápidas de exacerbação observada na reexposição a alérgenos, ocorrendo a liberação de quimiocinas (CXCL1 e 2) e a infiltração maciça de neutrófilos na epiderme^{173,197}. A parafenilenodiamina causou uma forte indução de respostas anti-inflamatórias mediadas por células T CD4⁺, o que prejudicou a formação de células epidérmicas patogênicas CD8⁺ TRM¹⁷³. A reexposição à PPD eliciou uma geração reduzida de células CD8⁺TRM e uma resposta inflamatória mais fraca¹⁷³. A inibição mediada por células T CD4⁺

provavelmente ocorre devido à função supressora das células T reguladoras^{173,198–200}. Essas células podem modular a resposta das células T CD8+ efectoras específicas para o alérgeno, impedindo sua ativação^{173,198–200}. Esse efeito ocorre por meio do bloqueio da interação entre as células T CD8+ e as células dendríticas apresentadoras de antígenos (APC) nos linfonodos, restringindo sua saída dos linfonodos e seu recrutamento da circulação para a pele exposta ao alérgeno^{173,198–200}.

Camundongos BALB/c foram utilizados para avaliar os efeitos da PPD, sendo observados a presença e aumento de inchaço nas orelhas dos animais^{136,138,176}, aumento da frequência de células T CD8+ positivas para IL-17A nos linfonodos (auriculares, pancreáticos e baço)¹³⁸, aumento da frequência de células T CD8+ positivas para IL-10 nos linfonodos (pancreáticos)¹³⁸, aumento dos níveis de linfócitos B220+ nos linfonodos¹³⁶, aumento dos níveis de mRNA de IL-4, IL-17A (hepático e pancreático)¹³⁸, aumento dos níveis de mRNA de IL-10 (orelhas)¹³⁸, aumento dos níveis de mRNA de IFN γ e IL-4 (hepáticos)¹³⁶, aumento dos níveis de mRNA de Foxp3+ pancreáticos e IL-17A¹³⁸, diminuição dos níveis de mRNA de IL-17A nas orelhas tratadas¹³⁸, diminuição dos níveis de IL-1b, IL-4, IL-5 e IL10¹³⁸, diminuição dos níveis de IL-12 no soro¹³⁸ e redução de células T CD3+ nos linfonodos¹³⁶.

Svalgaard et al. (2014) investigaram os efeitos sistêmicos da PPD em camundongos BALB/c e observaram que a aplicação repetida de haptenos, como a PPD, causa sensibilização e elicitação de hipersensibilidade de contato, resultando em edema epidérmico e desequilíbrio imunológico sistêmico¹³⁸. Esse efeito ocorre pela interação entre endotélio, queratinócitos e células do sistema imunológico inato e adaptativo, o que aumenta a produção de citocinas, quimiocinas e a expressão de moléculas de adesão^{138,201}. A PPD aumentou a frequência de células B e sua ativação nos linfonodos auriculares, mas não foi eficaz em aumentar a infiltração de células T efectoras, o que é apoiado pelo aumento menor na expressão de ICAM-1, moléculas necessárias para a infiltração¹³⁸. Além disso, o aumento da espessura da orelha dos animais tratados com PPD a 1% pode ser causado pela inflamação induzida por leucócitos não-T CD8+¹³⁸. Foi observado um aumento na expressão de Foxp3+ no tecido da orelha, o que pode indicar a infiltração de células Treg para o controle da resposta imunológica. No entanto, a PPD falha em induzir o mesmo grau de migração intra-tecidual de Tregs¹³⁸.

O aumento dos níveis de IL-17A no pâncreas pode indicar inflamação pancreática decorrente da aplicação epidérmica de PPD¹³⁸. A PPD também promoveu o aumento da

frequência de células T CD8⁺ produtoras de citocinas no baço¹³⁸. Além disso, a diminuição das células T CD4⁺ Treg nos linfonodos pancreáticos sugere que as células T CD4⁺ Foxp3⁺ migraram do linfonodo pancreático (PL-N) para o tecido pancreático¹³⁸.

5.3.1.6 Ratos

Diversos estudos selecionaram ratos como modelos para avaliação do tratamento com a PPD, ao todo foram usadas 6 linhagens, entre elas albinos³⁸, Wistar^{37,40,133,141,168,174}, Sprague-Dawley^{25,26,39,40,74,134}, F344/DuCrj^{100,132}, Charles River^{21,40} e CFY¹³⁵.

El-Amin et al. (2014) observaram que a aplicação de PPD levou ao aumento de peso em ratos da linhagem Charles River, após a aplicação oral e subcutânea de tintura capilar, nas doses de 10, 20 e 30 mg/kg por 3 e 6 dias⁴⁰. Os efeitos da injeção subcutânea resultaram em uma absorção mais rápida do que a oral⁴⁰. Quando utilizada, por via oral, na dose de 10 mg/kg os animais apresentaram uma leve fraqueza, já na concentração de 20 mg/kg ocorreu edema na cabeça, pescoço e faringe, e na concentração de 40 mg/kg ocorreram fraquezas severas nos membros anteriores, alopecia, tremores em todo o corpo, dificuldade respiratória, convulsão e dificuldade respiratória perto da morte⁴⁰.

Parâmetros bioquímicos indicaram um aumento significativo das enzimas hepáticas (dose-dependente), diminuição dos níveis de proteína plasmáticas total, albumina e colesterol nos grupos que utilizaram PPD⁴⁰. Os parâmetros hematológicos mostraram uma alteração do hemograma completo, com redução significativa de neutrófilos, hemoglobina, valores de PCV, hemácias, CHCM, MCV, TWBC e aumento de linfócitos, novamente de forma dose-dependente. Houve um aumento significativo da atividade de enzimas hepáticas como o glutamato oxalotransferase (AST), glutamato piruvato transferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP), e a diminuição de níveis totais de proteína plasmática, glicose, albumina e colesterol. A redução dos níveis de colesterol no estudo é associada a lipidose hepática e obstrução⁴⁰.

Os parâmetros encontrados na administração subcutânea da tintura mostraram um aumento ligeiro de AST, ALT e proteína total⁴⁰. A glicemia apresentou um aumento significativo em diferentes doses da tintura (oral e subcutânea)⁴⁰. Esses resultados indicam uma possível toxicidade hepática, anemia (redução de MCG e MCV está associada a anemia macrocítica, e o CHCM a anemia ferropriva), alterações na medula óssea (produção inadequada de glóbulos vermelhos), efeitos no sistema imunológico (apoptose massiva de neutrófilos e produção de células imunocompetentes)⁴⁰.

Burnett et al. (1977) avaliaram a mutagenicidade letal dominante e toxicidade oral em ratos Charles River por compostos químicos usados para tingir o cabelo²¹. Foi observado que os machos tratados ganharam 15% de peso quando comparados ao grupo controle²¹. A LD₅₀ da PPD é de 28 mg/kg, e foi utilizada a dose de 20 mg/kg, o que pode ter acarretado na redução da fertilidade e aumento de perdas pré-implantacionais (de 40 ratas apenas 33 engravidaram)²¹. Na análise de toxicidade cutânea, a PPD causou a morte dos animais na dose de 5 g/kg, mostrando-se potencialmente mutagênica²¹.

Hagiwara et al. (1990) utilizaram ratos da linhagem F344/DuCrj tratados inicialmente com N-nitrosodietilamina (DEN) para avaliar os efeitos modificadores da PPD na carcinogenicidade hepática¹³². Após duas semanas de uma única dose de DEN (200 mg/kg, administrada por via intraperitoneal), os ratos foram tratados com PPD em níveis dietéticos de 1000, 330 e 110 ppm¹³². Ocorreu o aumento significativo do peso relativo dos fígados em animais tratados com 1000 ppm e redução do peso corporal em animais tratados com todas as doses. Os autores concluíram que a PPD não atuou como promotora da carcinogênese hepática no bioensaio de médio prazo, corroborando os resultados negativos de carcinogenicidade¹³².

Katsumi et al. (1982) avaliaram a toxicidade subaguda e crônica e a carcinogenicidade da PPD em ratos da linhagem F344¹⁰⁰. A toxicidade subaguda foi avaliada por meio da administração oral de PPD nas concentrações de 0,4%, 0,2%, 0,1% e 0,05%¹⁰⁰. A toxicidade crônica e carcinogenicidade foram avaliadas por meio da administração oral de PPD nas concentrações de 0,1% e 0,05%¹⁰⁰. Foi observada uma redução no crescimento dependente da dose em ambos os sexos de animais, especialmente quando tratados com 0,4% de PPD¹⁰⁰. O grupo que recebeu 0,4% de PPD apresentou uma maior porcentagem do peso do fígado e dos rins em relação ao grupo controle¹⁰⁰. Além disso, o mesmo grupo apresentou degeneração gordurosa no fígado, tanto em machos quanto em fêmeas¹⁰⁰. A exposição crônica a PPD levou a uma redução do peso corporal e do baço, comparado ao controle, nas fêmeas quando tratadas com 0,1% de PPD, e, em fêmeas tratadas com 0,05% de PPD, o peso médio do baço foi menor do que o controle¹⁰⁰.

A incidência de carcinogenicidade foi observada nos ratos machos, com a maior frequência de lesões neoplásicas sendo feocromocitomas da glândula adrenal¹⁰⁰. Esses tumores foram observados em 10 (27,8%) dos 36 ratos machos tratados com 0,1% de PPD, 8 (22,9%) dos 35 ratos machos tratados com 0,05% de PPD e 6 (31,6%) dos 19

machos no grupo controle, sem diferenças significativas entre os grupos quanto à incidência¹⁰⁰. Outras lesões neoplásicas observadas, após o tratamento com a PPD, foram hiperplasia do estômago anterior em machos, um fibroadenoma na glândula mamária em uma fêmea, um fibroma na pele em um macho, linfomas em fêmeas e hiperplasia ductal do pâncreas em uma fêmea¹⁰⁰. Estudos sobre a toxicidade oral aguda indicaram que a LD₅₀ da PPD é de 98 mg/kg de peso corporal em ratos, o que mostra que a substância pode representar riscos em determinadas concentrações, reforçando a necessidade de avaliar sua segurança em diferentes contextos¹⁰⁰.

Abd-ElZaher et al. (2012) investigaram os efeitos tóxicos da exposição dérmica repetida a PPD em ratos machos albinos, avaliados em parâmetros bioquímicos e histológicos³⁸. A exposição foi realizada na região das costas e ombros dos animais, usando três doses diferentes de PPD, 1, 2 e 3 mg/kg, correspondendo a 0,2, 0,4 e 0,6 mg respectivamente, por 30 dias³⁸. Os níveis séricos de AST, ALT e ALP apresentaram um aumento altamente significativo entre os três grupos tratados com PPD³⁸. Os níveis de AST para os grupos foram: $38,6 \pm 0,96$ (controle), $39,7 \pm 0,94$ (0,2 mg), $40,4 \pm 1,34$ (0,4 mg) e $48,8 \pm 1,31$ (0,6 mg)³⁸. ALT para os grupos foram: $36,8 \pm 1,13$ (controle), $43,7 \pm 1,13$ (0,2 mg), $48,0 \pm 1,69$ (0,4 mg) e $56,7 \pm 2,21$ (0,6 mg)³⁸. ALP para os grupos foram: $122,5 \pm 1,58$ (controle), $219,6 \pm 5,6$ (0,2 mg), $237,0 \pm 4,74$ (0,4 mg) e $249,9 \pm 3,14$ (0,6 mg)³⁸.

Também foram observados aumentos altamente significativos nos níveis séricos de ureia e creatinina nos três grupos tratados com PPD em comparação com o grupo controle³⁸. Os níveis séricos de ureia foram: $26,4 \pm 3,23$ (controle), $32,6 \pm 1,50$ (0,2 mg), $36,0 \pm 1,69$ (0,4 mg) e $41,8 \pm 2,65$ (0,6 mg), e os níveis séricos de creatinina foram: $0,77 \pm 0,77$ (controle), $0,93 \pm 0,06$ (0,2 mg), $0,96 \pm 0,04$ (0,4 mg) e $0,98 \pm 0,04$ (0,6 mg)³⁸.

Os níveis séricos de glicose e CPK-Mb aumentaram nos três grupos tratados com PPD em comparação com o grupo controle³⁸. No entanto, esse aumento foi altamente significativo apenas nos grupos tratados com 0,4 e 0,6 mg de PPD³⁸. Os níveis séricos de LDH apresentaram um aumento altamente significativo nos três grupos expostos ao PPD em comparação com o grupo controle³⁸. Os níveis séricos de glicose foram: $74,20 \pm 8,16$ (controle), $81,6 \pm 1,05$ (0,2 mg), $118,7 \pm 3,56$ (0,4 mg) e $153,7 \pm 6,34$ (0,6 mg) e os níveis séricos de CPK-Mb foram: $154,0 \pm 1,41$ (controle), $157,1 \pm 4,84$ (0,2 mg), $450,0 \pm 10,40$ (0,4 mg) e $575,5 \pm 8,43$ (0,6 mg)³⁸. Os níveis sérios de LDH foram: $233,3 \pm 1,88$ (controle), $256,8 \pm 1,75$ (0,2 mg), $553,0 \pm 14,68$ (0,4 mg) e $1375,2 \pm 136,50$ (0,6 mg)³⁸.

No coração, foram detectadas inflamações crônicas leves (3 de 10 animais, dose de 0,2 mg), moderadas (7 de 10 animais, dose de 0,4 mg) e severas (7 de 10 animais, dose de 0,6 mg)³⁸. No fígado foram detectadas inflamações crônicas leves (1 de 10 animais, dose de 0,2 mg), moderadas com três focos necroinflamatórios (7 de 10 animais, dose de 0,4 mg) e severas com 5 ou mais focos necroinflamatórios (8 de 10 animais, dose de 0,6 mg)³⁸. No pâncreas foram encontradas inflamações crônicas moderadas e células inflamatórias crônicas intersticiais (4 de animais, dose 0,2 mg), glomérulos severamente crônicos e fibrosados e células inflamatórias crônicas e vasos sanguíneos com paredes espessadas (4 de 10 animais, dose de 0,4 mg) e fibrose glomerular e cilindros tubulares (8 de 10 animais, 0,6 mg)³⁸. As alterações patológicas no pâncreas também aumentaram com a dose, sendo observadas inflamações crônicas leves (5 de 10 de animais, dose de 0,4 mg) e inflamação crônicas severas, vasos sanguíneos com paredes espessadas e fibrose (em todos os animais, dose de 0,6 mg)³⁸.

A PPD se mostrou hepatotóxica nos ratos machos albinos, e uma explicação para isso é que a molécula absorvida pela pele permanece no organismo por um longo período, cerca de 43,5 horas (meia vida plasmática), causando assim toxicidade nas células endoteliais do seio e da veia central e no parênquima hepático³⁸. Em resultado a isso, ocorre o aumento de hemoglobina no fígado, resultando em hemorragias extensas e deposição de fibrina que podem resultar no comprometimento do fluxo sanguíneo sinusoidal, gerando lesões isquêmicas/hipóxicas das células do parênquima hepático nas regiões afetadas^{38,202}.

Os resultados encontrados nos rins dos animais tratados com a PPD são comparáveis a estudos realizados em cabeleireiros com exposição regular a PPD^{38,203}. Em 41,1% dos profissionais foi observado o comprometimento renal, proteinúria e hematúria com elevação de creatinina e ureia sérica³⁸. Esses achados destacam a relevância de associar tais efeitos à duração da exposição à PPD^{38,203}. Por fim, os metabólitos da PPD apresentaram uma alta taxa de secreção urinária, e a ocorrência de oxidação gerando a quinina-diamina, conhecida por ser uma substância altamente tóxica³⁸.

Munday et al. (1999) investigaram a miotoxicidade provocada pela PPD em ratas Sprague-Dawley por meio do uso de 100 e 200 mmol/kg/dia por via subcutânea⁴⁷. A PPD, em uma dose de 200 mmol/kg/dia, foi suficiente para gerar necrose nos músculos esqueléticos, no diafragma e na língua⁴⁷. Inicialmente, os músculos esqueléticos apresentaram aumento na acidofilia das células, associado a uma maior opacidade,

seguido de perda de estriações, infiltração por histiócitos, degeneração e dissolução das fibras musculares⁴⁷.

As áreas necróticas apresentaram uma distribuição uniforme no diafragma, desigual no gastrocnêmio e na língua foram mais pronunciadas em direção à raiz⁴⁷. Essas lesões necróticas foram consideradas leves pelos autores⁴⁷. No entanto, foi observado que, em humanos, as consequências da intoxicação por PPD podem ser mais graves, devido à liberação de mioglobina das fibras musculares, o que pode causar insuficiência renal aguda e levar ao óbito^{47,49,50,204,205}. Óbitos dessa natureza foram observados em camundongos quando expostos as doses de 3 a 5 g^{47,50}.

Bharali et al. (2009) investigaram se a exposição tópica repetida a PPD poderia gerar hepatotoxicidade em ratos machos Sprague-Dawley²⁶. A administração foi tópica, na área dorsal dos animais, utilizando doses de 1, 2 e 3 mg/kg durante 30 dias consecutivos²⁶. Os pesos absoluto e relativo do fígado aumentaram de forma dose-dependente, sendo os valores respectivos: $4,675 \pm 0,211$ (controle), $6,249 \pm 0,306$ (1 mg/kg), $5,447 \pm 0,262$ (2 mg/kg) e $7,639 \pm 0,362$ (3 mg/kg); e $2,78 \pm 0,033$ (controle), $3,78 \pm 0,037$ (1 mg/kg), $3,42 \pm 0,114$ (2 mg/kg) e $4,55 \pm 0,17$ (3 mg/kg)²⁶. Biomarcadores séricos de lesões hepáticas foram avaliados, e evidenciou-se um aumento dos níveis de forma dose-dependente²⁶. ALP: aumentos de 2,3, 2,6 e 3,0 vezes nos grupos tratados com 1, 2 e 3 mg/kg de PPD, respectivamente, AST: aumentos de 2,7, 3,0 e 3,6 vezes, e ALT: aumentos de 1,6, 1,8 e 2,26 vezes nos grupos tratados com 1, 2 e 3 mg/kg de PPD, respectivamente²⁶.

Quando a PPD foi utilizada na dose de 1 mg/kg ocorreu a infiltração leucocitária, necrose periportal grave e inflamação caracterizada por uma maior aderência ao trato portal, e quando utilizada a dose de 3 mg/kg ocorreu uma necrose centrolobular severa, dilatação da veia central, e exsudatos fibrinosos marcantes circundando a veia central e aderindo às estruturas circundantes²⁶. Todos os animais tratados com PPD apresentaram um acúmulo de leucócitos na veia central, necrose maciça de hepatócitos centrolobulares e periportais, hemorragia extensa do tecido hepático, degeneração hidrópica dos hepatócitos, características de isquemia e necrose coagulativa²⁶. A concentração de hemoglobina foi alterada de forma dose dependente, tendo seu maior aumento com o tratamento de 3 mg/kg²⁶. Além desses resultados, foi relatado o alargamento dos sinusoides, acompanhado por um acúmulo significativo e extravasamento de neutrófilos

no fígado dos animais tratados²⁶. Já nas seções de fígado dos animais do grupo controle, a quantidade de neutrófilos nos sinusoides foi consideravelmente baixa²⁶.

Conforme mencionado anteriormente, a PPD leva a distúrbios hepáticos em ratos, sendo relatado esses efeitos em albinos e Sprague-Dawley^{26,38}. Assim como mencionado por Abd-ElZaher et al. (2012)³⁸, a hepatotoxicidade foi associada a uma pequena fração de PPD que alcança a circulação sistêmica e que permanece por um período prolongado devido à meia-vida plasmática bifásica (24 minutos e 43,5 horas, respectivamente^{26,38}. E da mesma forma, foi sugerido que a ocorrência do aumento de hemoglobina hepática se dá pelos danos em células endoteliais sinusoidais e células da veia central, ocasionando em hemorragias extensas, deposição de fibrina nas sinusoides e na veia central^{26,38}. A destruição de células endoteliais sinusoidais leva ao extravasamento de neutrófilos para o parênquima hepático, e isso é associado a sinais quimiotáticos, incluindo TNF- α , quimiocinas CXC (IL-8, KC, MIP-2) e PAF, originados do parênquima lesionado^{26,38,206–208}. E por fim, os neutrófilos ativados levam a geração de espécies reativas de oxigênios o que potencializa a exacerbação da lesão hepática^{26,38,206–208}.

Bharali et al. (2012) investigaram a toxicidade da PPD no sistema reprodutor masculino de ratos Sprague-Dawley tratados topicamente com concentrações de 1, 2 e 3 mg/kg/dia por 30 dias²⁵. Os resultados mostraram uma redução significativa no peso absoluto dos testículos nas doses de 2 e 3 mg/kg/dia, além de uma diminuição dose-dependente na concentração de espermatozoides na cauda dos epidídimos²⁵. Também foi observado um aumento no percentual de espermatozoides com morfologia anormal nos grupos tratados com 2 e 3 mg/kg/dia, bem como um aumento significativo na taxa de peroxidação lipídica no tecido testicular²⁵. O epitélio seminífero apresentou perda de células germinativas e características de apoptose nessas mesmas doses²⁵. Nos animais tratados com 3 mg/kg/dia, foram identificadas alterações mais graves, como descamação de células germinativas, edema nos tecidos intersticiais, deposição fibrinosa na região basal dos túbulos seminíferos e retenção de espermátides²⁵.

Devido à ausência de um sistema antioxidante eficiente, os espermatozoides são particularmente vulneráveis a danos oxidativos em suas membranas, resultando em anormalidades morfológicas quando expostos à PPD²⁵. Além disso, a PPD afeta diretamente os espermatozoides, causando danos às enzimas mitocondriais e aos filamentos de microtúbulos²⁵. Esses efeitos já foram relatados em estudos anteriores^{25,209}. Um dos pontos fundamentais a ser avaliado é o teor de PPD presente nas tinturas^{25,209}.

Uma pesquisa preliminar revelou que, nessas formulações, o teor de PPD, após a diluição, não ultrapassa 3% (p/v)²⁵. Essa concentração foi suficiente para provocar alterações significativas nas estruturas histológicas dos testículos de ratos Sprague-Dawley e reduzir os parâmetros funcionais essenciais dos espermatozoides necessários para o processo de fertilização²⁵.

Bharali et al. (2012) avaliaram o potencial de mudanças hematológicas da PPD por meio da aplicação tópica subcrônica nas doses de 1, 2 e 3 mg/kg por 90 dias³⁹. A PPD, quando utilizada na dose de 3 mg/kg, levou ao retardamento do crescimento dos animais³⁹. A aplicação repetitiva de PPD causou perturbações severas na fisiologia dos animais, evidenciando anemia hemolítica, alterações na morfologia dos eritrócitos, redução na contagem de eritrócitos, baixa concentração de hemoglobina e porcentagens mais altas de reticulócitos no sangue periférico³⁹.

Os autores destacam que, embora os eritrócitos sejam capazes de prevenir danos oxidativos, a exposição repetida à PPD fez com que o estresse oxidativo superasse a capacidade antioxidante celular, resultando em lesão celular e morte hemolítica das hemácias³⁹. Devido à morte das hemácias, houve uma queda na contagem total de eritrócitos, no volume globular e na concentração de hemoglobina³⁹.

5.3.2 ESTUDOS *IN VITRO*

Os efeitos tóxicos da PPD relatados nos estudos *in vivo* estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Efeitos relatados para a PPD em estudos *in vitro* (continua).

Estudos <i>in vitro</i>		
Células	EFEITOS DESCRITOS	REFERÊNCIA
SV-HUC-1 (uroepitélio humano)	Indução da transição epitélio-mesenquimal	Liu et al., 2022 ³⁶
	Ativação da sinalização ERK5 / AP-1	
	Danos ao DNA	
	Aumento da expressão de p53	Huang et al., 2007 ¹⁴³
	Aumento da expressão de Cox-2	Huang et al., 2011 ¹⁶³
	Aumento da quantidade de autofagossomos	Huang et al., 2007 ¹⁴³
	Aumento da concentração de Beclin-1	
	Aumento da concentração de proteína 3B da cadeia leve de proteínas associadas a microtúbulos (LC3B)	
	Aumento da ativação de p-ERK1/2 de maneira dependente da concentração	
	Alteração morfológica	
Cepa da bactéria <i>Salmonella typhimurium</i>	Redução da viabilidade celular de forma dose-dependente	Huang et al., 2007 ¹⁴³
	Capacidade mutagênica	Qin et al., 2018 ¹⁸⁰
	Efeito genotóxico	Garrigue et al., 2006 ⁵⁶
	Presença de efeito inibitório de crescimento nas doses 0,156; 0,312 e 0,625 mg/placa	Yasunaga et al., 2006 ¹⁵³
	Aumento da mutagenicidade na presença de peróxido de hidrogênio e hidróxido de amônia	Qin et al., 2018 ¹⁸⁰
	Aumento na formação de colônias revertentes da cepa TA98 com a mistura de S9	Rojanapo et al., 1986 ³⁷
nHHDPCs (células normais da papila dérmica do cabelo humano)	Diminuição nas contagens de colônias revertidas	Qin et al., 2018 ¹⁸⁰
	Presença de efeito citotóxico	Zeller et al., 2013 ¹⁶¹
	Indução de morte celular	Lee et al., 2015 ¹⁸⁴
	Indução de senescência celular	
	Alterações no perfil de expressão de miRNA	
PBLs (linfócitos do sangue periférico humano)	Arresto do ciclo celular na fase G2	
	Efeitos genotóxicos	Kumar et al., 2020 ^{53,142}
	Indução de micronúcleos mutagênicos	Garrigue et al., 2006 ⁵⁶
	Aumento do valor do momento da cauda	Kumar et al., 2020 ^{53,142}
Cocultura de HaCaT e THP-1	Aumento da frequência de troca de cromátides	
	Indução de IL-1 β , TNF- α e IL-6	Karri et al., 2021 ¹⁵⁷
	Liberação de IL-8	

Legenda: ERK5/AP-1 - Proteína quinase regulada por sinal extracelular 5 / Fator de Transcrição Ativador de Proteína 1. DNA - Ácido Desoxirribonucleico. p53 - Proteína 53. COX-2 - Ciclo-oxigenase 2. Beclin1 - Beclin 1. SCE - Troca de Cromátides Irmãs. miRNA - MicroRNA. CD40 - CD40. CXCR4 - Receptor de Quimiocina tipo 4. IFN- γ - interferon γ . IL 13 – interleucina 13. IL -22 – interleucina 22. IL-1 β - interleucina 1 β . TNF- α - fator de necrose tumoral α . IL-6 – interleucina 6. IL-8 – interleucina 8.

Tabela 2 – Efeitos relatados para a PPD em estudos *in vitro* (continuação).

Estudos <i>in vitro</i>		
Células	EFEITOS DESCRITOS	REFERÊNCIA
HaCaT (células epiteliais humanas)	Dano lipoperoxidativo	Picardo et al., 1995 ¹¹⁷
	Dano oxidativo ao DNA	Goyal et al., 2015 ¹⁵⁹ Zanoni et al., 2015 ¹⁶⁹
	Efeito citotóxico	Picardo et al., 1992 ¹¹⁸ Lee et al., 2013 ¹⁶⁴ Woo et al., 2021 ¹⁶⁶ Oh et al., 2018 ¹⁷⁹
	Fraco efeito genotóxico em concentrações de 900 a 1200 µg/mL	Zeller et al., 2013 ¹⁶¹
	Desestabilização lisossômica	Goyal et al., 2015 ¹⁵⁹
	Perda do potencial de membrana mitocondrial	Goyal et al., 2015 ¹⁵⁹ Woo et al., 2021 ¹⁶⁶
	Liberação de IL-1β	Karri et al., 2021 ¹⁵⁷
	Liberação de IL-8	
	Aumento no pico da fase sub-G1 de células	Goyal et al., 2015 ¹⁵⁹ Woo et al., 2021 ¹⁶⁶
	Aumento das atividades de superóxido dismutase após 1 hora de tratamento	Picardo et al., 1995 ¹¹⁷
	Aumento das atividades de catalase após 1 hora de tratamento	
	Aumento da ativação de caspases	Woo et al., 2021 ¹⁶⁶
	Aumento da incorporação de 3H-timidina	Picardo et al., 1992 ¹¹⁸
	Aumento da expressão de ICAM-1	
	Aumento da degradação da PARP-poli	Woo et al., 2021 ¹⁶⁶
	Aumento dos níveis de ROS após 1 hora de tratamento combinado com peróxido de hidrogênio	Zanoni et al., 2015 ¹⁶⁹
	Redução da viabilidade celular	Mosley-Foreman et al., 2008 ³⁰ Picardo et al., 1992 ¹¹⁸ Goyal et al., 2015 ¹⁵⁹ Lee et al., 2013 ¹⁶⁴
	Redução de glutatona reduzida	Picardo et al., 1995 ¹¹⁷
	Diminuição de células na fase S	Goyal et al., 2015 ¹⁵⁹
	PPD classificada como sensibilizador forte	de Ávila et al., 2019 ¹⁵⁶
CHO-k1 (ovário de hamster chinês)	Citotoxicidade na presença de grupo nitro	Chung et al., 1996 ¹⁴⁴
	Aumento de aberrações cromossômicas	Chung et al., 1995 ¹⁸
	Indução de aberrações cromossômicas	Chung et al., 1995 ¹⁸ Chung et al., 1996 ¹⁴⁴

Legenda: DNA - Ácido Desoxirribonucleico. IL-1β - Interleucina 1 beta. IL-8 - Interleucina 8. 3H-timidina - Timidina tritiada. ICAM-1 - Molécula de Adesão Intercelular 1. PARP-poli - Poli (ADP-ribose) Polimerase. ROS - Espécies Reativas de Oxigênio.

Tabela 2 – Efeitos relatados para a PPD em estudos *in vitro* (continuação).

Estudos <i>in vitro</i>		
Células	EFEITOS DESCRITOS	REFERÊNCIA
Células mieloides humanas (U937)	Sensibilizador forte	Del Bufalo et al., 2011 ¹⁵¹ de Ávila et al., 2019 ¹⁵⁶
	Aumento da expressão de CD86	Ade et al., 2006 ¹⁴⁶
MDCK - Células renais de cães Mardin-Darby	Dano ao DNA por meio da produção de ROS	Chen et al., 2010 ¹⁶
	Indução da apoptose	Chen et al., 2006 ³⁴
	Aumento da condensação da cromatina	Chen et al., 2010 ¹⁶ Chen et al., 2006 ³⁴
	Aumento da fragmentação nuclear	Chen et al., 2010 ¹⁶ Chen et al., 2006 ³⁴
	Aumento celular	Chen et al., 2006 ³⁴
	Aumento da vacuolização do citoplasma	
	Aumento da do encolhimento celular	
	Aumento da atividade de Caspase (8, 9 e 3/7)	Chen et al., 2010 ¹⁶
	Aumento de células na subfase G1	Chen et al., 2006 ³⁴
	Aumento da p53	
	Redução da viabilidade celular	Chen et al., 2010 ¹⁶ Chen et al., 2006 ³⁴
	Inibição do crescimento celular com IC50 de 37,5 µg/mL em 12 horas	Chen et al., 2010 ¹⁶
	Redução do potencial de membrana mitocondrial	Chen et al., 2006 ³⁴
THP-1 (linhagem celular monocítica)	Viabilidade celular de pelo menos 75% com 31 µg/mL	Buzzella et al., 2019 ¹⁴⁹
	Liberação de IL-1β	Karri et al., 2021 ¹⁵⁷
	Liberação de IL-8	
CHL (células pulmonares de hamster chins)	Aumento de aberrações cromossômicas (quebras de cromátides e cromossomos, fragmentos acêntricos, microcorpos, falhas e cromossomos dicêntricos) nas concentrações de 78, 156 e 312 µg/mL	Qin et al., 2018 ¹⁸⁰
V79 (células de fibroblastos de pulmão de hamster chinês)	Forte efeito genotóxico em concentrações de 100 µg/mL por 3 horas	Zeller et al., 2013 ¹⁶¹
Células pulmonares humanas	Desenvolvimento de respostas inflamatórias	Lauenstein et al., 2014 ¹⁵⁰
	Aumento da produção de IL-1 α	
	Aumento da produção de TNF-α	

Legenda: CD86 – Cluster de diferenciação 86. ROS - Espécies Reativas de Oxigênio. p53 - Proteína 53. IL-1β - Interleucina 1 beta. IL-8 - Interleucina 8. IL-1α - Interleucina 1 alfa. TNF-α - Fator de Necrose Tumoral Alfa.

Tabela 2 – Efeitos relatados para a PPD em estudos *in vitro* (continuação).

Estudos <i>in vitro</i>		
Células	EFEITOS DESCRITOS	REFERÊNCIA
UROtsa – células uroteliais humanas	Geração de Espécies Reativas de Oxigênio	Reena et al., 2015 ¹⁶²
	Disfunção mitocondrial por perda do potencial de membrana mitocondrial	
	Aumento do número de células haploides na fase sub-G1	
	Aumento do nível de caspase-3	
	Redução da viabilidade celular	
Eritrócitos de camundongos	Efeitos genotóxicos	Qin et al., 2018 ¹⁸⁰
	Aumento de MN-PCE após o uso de 50 e 100 mg/Kg	
Fibroblastos de camundongos BALB/c 3T3	Presença de dano muscular	Babich et al., 1992 ⁵²
	Citotoxicidade	
Fibroblasto de ratos Wistar	Dano a membrana lisossomal	Seydi et al., 2018 ¹⁶⁸
	Aumento da liberação da enzima lactato desidrogenase	
	Aumento dos níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (50, 100 e 150 µM) e em todos os tempos (6, 12 e 18 horas)	
	Aumento dos níveis de MDA	
	Aumento da liberação de citocromo C das mitocôndrias nas concentrações de 50, 100 e 150 µM	
	Redução da concentração de fibroblastos nas concentrações de 50, 100 e 150 µM	
Fibroblasto humanos	Redução da viabilidade celular (1000 µg/mL de PPD reduziu em 0,29 vezes)	Oh et al., 2018 ¹⁷⁹
AREc32 (fibroblastos embrionários de camundongos)	Sensibilizador forte	Tsujita-Inoue et al., 2014 ¹⁶⁷
Células do baço de camundongos BALB/c	Secreção de altos níveis de IFN	Farrell et al., 2008 ¹⁷⁵
	Secreção de altos níveis de GM-CSF	
	Secreção de altos níveis de IL-2	
C2C12 (Células Mioblastos de Camundongo)	Indução da parada do ciclo celular na fase S	de Mas et al., 2017 ¹⁷⁴
	Indução de apoptose	
	Inibição da glicólise	
	Inibição da via não oxidativa da pentose fosfato	
	Inibição da renovação de glicogênio	
	Inibição da reação da ATPase	
	Redução da síntese de ATP	

Legenda: MN-PCE - Taxa de Micronúcleos em Eritrócitos Policromáticos. MDA - Conteúdo de Malonaldeído. IFN - Interferon. GM-CSF - Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos. IL-2 - Interleucina 2. ATPase - ATPase.

Tabela 2 – Efeitos relatados para a PPD em estudos *in vitro* (continuação).

Estudo <i>in vitro</i>		
Células	EFEITOS DESCRITOS	REFERÊNCIA
MUTZ-3 (linha celular derivada de células progenitoras hematopoiéticas humanas)	Estimulação de CD86 na concentração de 185 µM	Lee et al., 2014 ¹⁶⁵
	Estimulação de CD54 na concentração de 185 µM	
	Aumento dos níveis de secreção de IL-8 (na cocultura com RealSkin)	
	PPD classificado como sensibilizador forte	de Ávila et al., 2019 ¹⁵⁶
Cocultura de HaCaT e DCrc (células relacionadas a células dendríticas)	Forte sensibilizante com EC50 de 42 µmol/L	Sonnenburg et al., 2012 ¹⁴⁵
	Efeito irritativo	Sonnenburg et al., 2012 ¹⁴⁵
Células estomacais de ratos Sprague-Dawley	PPD não levou a aumentos significativos de dano ao DNA	De Boeck et al., 2015 ¹⁷²
Células hepáticas de ratos Sprague-Dawley	PPD não levou a aumentos significativos de dano ao DNA	De Boeck et al., 2015 ¹⁷²
Células TK6 de linfoblastoides humanos	Redução na sobrevivência celular, dependendo da concentração do reagente (na faixa de 100–1000 µg/mL)	Sassa et al., 2021 ¹⁷¹
Células XRCC1-/-/XPA-/-	Redução na sobrevivência celular, dependendo da concentração do reagente (na faixa de 100–1000 µg/mL)	Sassa et al., 2021 ¹⁷¹
Cocultura de queratinócitos e Células Mononucleares de Sangue Periférico (CMSPs)	Aumento de CD124+ em linfócitos	Frombach et al., 2018 ¹⁶⁰
	Aumento da expressão de CD44 em linfócitos	
	Aumento da concentração de IL-4	
	Aumenta da secreção de citocinas, incluindo IFN-γ, IL-13 e IL-22	Gibson et al., 2015 ¹⁵⁸
	PPD não conseguiu induzir uma proliferação significativa de células T em 9 pacientes.	Krasteva et al., 1993 ⁷⁵
	Diminuição das concentrações de IFN-γ	Frombach et al., 2018 ¹⁶⁰
	Presença de uma forte reatividade	Skazik et al., 2008 ¹⁸³

Legenda: CD 44, 56 e 86 – Cluster de diferenciação 44, 56 e 86. DNA - Ácido Desoxirribonucleico. IL 4, 8, 13 e 22 - Interleucina 4, 8, 13 e 22. EC50 - Concentração Efetiva 50. IFN-γ – interferon-γ.

Tabela 2 – Efeitos relatados para a PPD em estudos *in vitro* (continuação).

Estudos <i>in vitro</i>		
Células	EFEITO	REFERÊNCIA
Cocultura de queratinócitos e monócitos	Efeitos citotóxicos na concentração de 125µM	Schreiner et al., 2007 ¹⁴⁷
	Regulação positiva de CD86 na concentração de 31,25 µM	
Linfócitos humanos	Genotoxicidade na dose de 100 a 500 µM	Chye et al., 2008 ⁶⁴
	Presença de apoptose e necrose celular	Salami et al., 2023 ¹⁷⁰
	Concentrações entre 0,1 e 50mM levam a respostas proliferativas	Coulter et al., 2007 ⁶⁹
	Concentrações acima de 100mM levam a respostas inibitórias	
	Colapso da glutathione reduzida	Salami et al., 2023 ¹⁷⁰
	Aumento dos níveis de glutathione oxidada	
	Aumento da secreção de IL-4	Coulter et al., 2007 ⁶⁹
	Aumento da secreção de IL-5	
	Aumento da secreção de IL-13	
	Aumento da secreção de TNF-α	
	Aumento da secreção de MIP-1 α	
	Aumento da secreção de MIP-1β	
	Aumento da secreção de RANTES	
	Aumento dos níveis de IFN-γ	Salami et al., 2023 ¹⁷⁰
	Aumento dos níveis de TBARS	
	Aumento da formação de Espécies Reativas a Oxigênio	
	Aumento dos níveis de Ca ⁺² intracelular	
	Redução da viabilidade celular	
	Redução do potencial de membrana mitocondrial	
Células linfocitárias sensibilizadas	Proliferação significativa das células dos linfonodos	Kashima et al., 1996 ¹⁷⁸
	SI encontrado para a PPD foi de 2,8. Indicando uma proliferação significativa das células dos linfonodos	

Legenda: CD86 - CD86. IL-4, 5 e 13 - Interleucina 4. IFN-γ - Interferon-gama. TNF-α - Fator de Necrose Tumoral Alfa. MIP-1 α - Proteína Inflamatória de Macrófagos 1 alfa. MIP-1β - Proteína Inflamatória de Macrófagos 1 beta. RANTES - Regulado na Ativação, Normal T Expressado e Secretado. TBARS - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico. SI – índice de estimulação

Tabela 2 – Efeitos relatados para a PPD em estudos *in vitro* (continuação).

Estudos <i>in vitro</i>		
Células	EFEITOS DESCRITOS	REFERÊNCIA
EpideDermTM	Citotoxicidade leve em exposição no meio de cultura por 24 horas	Hu et al., 2009 ¹⁵²
Pele 3D	<i>Up-regulation</i> de FLG1 e <i>down-regulation</i> de FLG2	Meisser et al., 2019 ¹⁸²
Equivalente Epidérmico	EC50 do equivalente epidérmico foi de 0,16, sendo classificada como sensibilizador cutâneo forte	dos Santos et al., 2019 ¹⁴⁸
	HRIPT de 6,9	
Glóbulos vermelhos humanos	Resistência temporária a hemólise	Srhayri et al., 2016 ⁷³
	Aumento da hemólise (após 2 horas de tratamento)	
Células dendríticas	Aumento da expressão de CD40	Coulter et al., 2006 ⁷⁹
	Aumento de MHC classe II	
	Aumento da proliferação de linfócitos	
	Morte celular com concentrações acima de 250 µM	
	Concentração letal em 100 µM	
Oócitos de camundongos fêmeas da linhagem ICR 3	Aumento da quantidade de mitocôndrias	Wang et al., 2022 ¹⁸¹
	Aumento do estresse oxidativo	
	Aumento das taxas de apoptose precoce	
	Aumento dos folículos atrésicos	
	Redução significativa de GVBD (PPD a 50 mg/Kg)	
	Redução dos níveis de ovastacina	
	Redução dos níveis de ATP	
	Redução dos folículos antrais	
	Ausência de corpos polares (após 12 horas de exposição a PPD)	
	Alterações significativas na formação do fuso (destruídos) e agregação cromossômica	
	Alterações na distribuição de GCs	
	Alterações na distribuição da proteína JUNO (irregular ou ausente)	
	Alterações nas mitocôndrias (estavam agrupadas ou agregadas)	
	Menor probabilidade de fertilização	

Legenda: FLG 1 e 2 - filagrina-1 e 2. EC50 - redução da viabilidade celular em 50% do valor máximo. HRIPT - Teste de irritação repetida em humanos. EE-IL-1a10 - Interleucina-1 alfa 10 de Equivalente Epidérmico. CD40 – cluster de diferenciação 40. MHC II - Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe II. GVBD – degradação da vesícula germinativa. GCs - grânulos corticais.

Nos estudos *in vitro* incluídos nesta revisão, a PPD foi estudada nas seguintes células: SV-HUC-1 (4 estudos)^{36,143,161,163}, cepas de bactérias *Salmonella typhimurium* (4 estudos)^{37,56,153,180}, nHHDPCs (1 estudo)¹⁸⁴, PBLs (2 estudos)^{56,142}, Cocultura de HaCaT e THP-1 (1 estudo)¹⁵⁷, HaCaT (11 estudos)^{30,117,118,156,157,159,161,164,166,169,179}, CHO-k1 (2 estudos)^{18,144}, U937 (3 estudos)^{146,151,156}, MDCK (2 estudos)^{16,34}, THP-1 (2 estudos)^{149,157}, CHL (1 estudo)¹⁸⁰, V79 (1 estudo)¹⁶¹, células pulmonares humanas (1 estudo)¹⁵⁰, UROtsa (1 estudo)¹⁶², eritrócitos de camundongos (1 estudo)¹⁸⁰, fibroblastos de camundongos BALB/C3T3 (1 estudo)⁵², fibroblasto de ratos Wistar (1 estudo)¹⁶⁸, fibroblasto humanos (1 estudo)¹⁷⁹, AREc32 (1 estudo)¹⁶⁷, células do baço de camundongos BALB/c (1 estudo)¹⁷⁵, C2C12 (1 estudo)¹⁷⁴, MUTZ-3 (2 estudos)^{156,165}, cocultura de HaCaT e DCrc (1 estudo)¹⁴⁵, células estomacais de ratos Sprague-Dawley (1 estudo)¹⁷², células hepáticas de ratos Sprague-Dawley (1 estudo)¹⁷², células TK6 de linfoblastoides humanos (1 estudo)¹⁷¹, células XRCC1^{-/-}/XPA^{-/-} (1 estudo)¹⁷¹, cocultura de queratinócitos e células mononucleares de sangue periférico (5 estudos)^{80,154,158,160,183}, cocultura de queratinócitos e monócitos (1 estudo)¹⁴⁷, linfócitos humanos (3 estudos)^{64,79,170}, células linfocitárias sensibilizadas (1 estudo)²⁰⁴, EpideDermTM (1 estudo)¹⁵², pele 3D (1 estudo)¹⁸², equivalentes epidérmicos (1 estudo)¹⁴⁸, glóbulos vermelhos humanos (1 estudo)(Naimi Y, 2016), células dendríticas (1 estudo)⁷⁹ e oócitos de camundongos fêmeas da linhagem ICR 3 (1 estudo)¹⁸¹.

5.3.2.1 Modelos de células usadas nos estudos *in vitro* e resultados encontrados

5.3.2.1.1 Células uroepiteliais humanas (SV-HUC-1)

Huang et al. (2007) investigaram os efeitos da PPD em células uroepiteliais humanas (SV-HUC-1) e descobriram resultados significativos¹⁴³. Eles observaram uma redução dose-dependente na viabilidade celular quando as células foram tratadas com concentrações de 2, 5, 10, 20 e 40 g/mL de PPD, com reduções respectivas de 86,59, 72,75, 64,69, 54,66 e 37,28%¹⁴³. Além disso, danos ao DNA foram detectados pelo ensaio Cometa, que revelou um aumento progressivo no comprimento médio de migração do DNA em resposta às doses crescentes de PPD¹⁴³. O estudo também identificou um aumento de p53 mutante nos núcleos das células tratadas (2 a 40 g/mL por 24 h) e de Cox-2 no citoplasma e membrana nuclear (2, 5, 10, 20 e 40 g/mL)¹⁴³. Os autores sugeriram que a PPD pode ser auto-oxidada dentro das células, gerando espécies reativas de oxigênio e outros radicais livres de curta duração¹⁴³. Essa dinâmica pode ser associada

à carcinogenicidade observada para a PPD, devido aos danos oxidativos ao DNA, conforme relatado anteriormente^{210,211}.

Os danos ao DNA foram paralelos ao aumento e acúmulo de p53, correlacionando-se com a incidência de quebras de fita de DNA¹⁴³. O estudo destacou o aumento de COX-2 como um fator relevante, considerando seu papel potencial na promoção de características pró-carcinogênicas¹⁴³. Este aumento foi previamente associado a proliferação de células malignas da bexiga e progressão do carcinoma urotelial da bexiga^{143,212,213}. Normalmente, a COX-2 apresenta baixa expressão em tecidos saudáveis, mas sua ativação está associada a processos inflamatórios e irritativos¹⁴³. Com base nos achados, os autores sugerem que a PPD pode atuar como agente carcinogênico em células SV-HUC-1, potencialmente através da via da ciclooxigenase¹⁴³.

Huang et al. (2011) avaliariam os efeitos da PPD, principalmente a indução da capacidade autofágica, em SV-HUC-1¹⁶³. Concentrações diferentes de PPD influenciaram alterações morfológicas nas células: 0,018 mM iniciou a perda morfológica típica e aumento do tamanho celular; 0,046 mM (por 24 h) modificou o formato celular, tornando-o arredado, com presença da vacuolização citoplasmáticas e condensação nuclear; e 0,37 mM (por 24 h) causou vacuolização citoplasmáticas e o encolhimento celular¹⁶³. O tratamento das células com PPD também causou um aumento significativo, de forma dose-dependente, na formação de autofagossomos com dupla membrana¹⁶³. Além disso, a substância aumentou a ativação de p-ERK1/2 de forma dose-dependente, sendo sua expressão máxima observada nas células tratadas com a concentração de 0,37 mM¹⁶³.

O aumento da p53 também foi observado por Huang e colaboradores, apresentando uma resposta dose-dependente (0,018, 0,046 e 0,37 mM), com a expressão máxima encontrada para o tratamento com a concentração de 0,37 mM¹⁶³. Por fim, a PPD conseguiu aumentar os níveis de reguladores de autofagossomos, as proteínas Beclin-1 e LC3B (0,018, 0,046 e 0,37 mM por 24h) de maneira dependente da dose¹⁶³. O estudo correlaciona a autofagia nas células SV-HUC-1 com a expressão aumentada da proteína p53 e ativação de ERK1/2, assim como a formação de autofagossomos e acúmulo de Beclin-1 e LC3B, sugerindo que a PPD induz a autofagia celular por meio da sinalização medida por p53 mutante e ERK1/2¹⁶³.

Liu et al. (2022) demonstraram que a PPD induz a transição epitélio-mesenquimal (EMT) e ativa a via ERK5/AP-1 nas células SV-HUC-1³⁶. A EMT é um processo crucial na formação de malignidades e de processos na metástase, pois confere às células a capacidade de migrar e invadir outros tecidos³⁶. A ativação da via ERK5 também está associada à regulação da expressão gênica em tecidos específicos, à progressão do ciclo celular e à metástase, por meio da atividade da NF-kappa B (câncer de colón) e à supressão do receptor de estrogênio, promovendo a tumorigênese (câncer de mama)^{214,215}. O estudo de Liu e colaboradores sugeriu que a ativação da sinalização ERK5/AP-1 pela PPD regula positivamente a EMT, o que, por sua vez, aumenta a migração e a invasão celular³⁶. Assim, os autores propõem que esse mecanismo possa ser responsável pelo efeito carcinogênico da PPD no câncer de bexiga³⁶.

5.3.2.1.2 Células normais da papila dérmica do cabelo humano (nHHDPCs)

Lee et al. (2015) avaliaram o efeito de PPD nas células normais da papila dérmica do cabelo humano (nHHDPCs), o que levou a diversos efeitos, entre eles a senescência celular na fase G2, morte celular, aumento de produção de ROS e efeito apoptótico nas células da papila dérmica¹⁸⁴. PPD (400 µM) reduziu a proporção celular nas fases G1/G2, e, na mesma concentração, aumentou a produção de ROS (50,61%)¹⁸⁴.

5.3.2.1.3 Cocultura de HaCaT e THP-1

A avaliação realizada por Karri et al. (2021) do efeito de PPD a cocultura de HaCaT e THP-1 indicou que a substância consegue induzir IL-1β, TNF- α e IL-6 e a liberação de IL-8¹⁵⁷. A IL-1β é regulada positivamente pela epiderme após a ação de sensibilizadores em modelo murino, sendo considerada um marcador útil para avaliação da potência de sensibilização da pele¹⁵⁷. Além disso, os dados indicam que a PPD atua como um pro-/pré-hapteno, cuja ativação pode influenciar as respostas inflamatórias em modelos celulares^{157,216}. Esse processo envolve auto-oxidação e acilação enzimática para formar monoacetil-PPD (MAPPD) e N,N'-diacetil-PPD (DAPPD) na pele e nos queratinócitos^{131,157}. A avaliação do efeito da PPD apenas na cultura de THP-1 foi realizada também no estudo de Karri e colaboradores, sendo evidenciado o aumento da liberação de IL-1β e IL-8, como ocorrido na cocultura com HaCaT¹⁵⁷. Buzzella et al. (2019) avaliaram os efeitos da PPD em THP-1 e em doses de 31 µg/mL ocorreu a redução de viabilidade celular de pelo menos 75%¹⁴⁹.

5.3.2.1.4 Células pulmonares de hamster chinês (CHL)

Qin et al. (2018) realizaram a análise dos efeitos da PPD em células pulmonares de hamster chinês (CHL)¹⁸⁰. A PPD, nas concentrações finais de 78, 156 e 312 µg/mL, aumentou o percentual de aberrações cromossômicas para 23%, 25% e 22%, respectivamente¹⁸⁰. Entre essas alterações, foram observadas quebras de cromátides e cromossomos, fragmentos acêntricos, microcorpos, falhas e cromossomos dicêntricos. Esses resultados indicam que, mesmo nas menores doses, a PPD pode levar a danos ao DNA de forma não linear à dose¹⁸⁰. Os autores sugerem que a PPD pode induzir mutações gênicas por meio da indução de aberrações cromossômicas e danos ao núcleo do DNA¹⁸⁰.

5.3.2.1.5 Glóbulos vermelhos humanos

Srhayri et al. (2016) avaliaram os efeitos da PPD e poli-PPD na hemólise de glóbulos vermelhos humanos⁷³. A hemólise pode ocorrer devido a entrada de água no ambiente extracelular hipotônico, e este excesso de água enfraquece a membrana plasmática, ocasionando o seu rompimento e liberado de um conteúdo rico em hemoglobina⁷³. O estudo confirmou que a PPD apresenta um efeito temporário de estabilização da membrana (aumento da resistência em presença de 5 mg/mL), sem alterar a condutividade ou o pH do ambiente⁷³. No entanto, a hemólise foi completa após 2 horas de incubação, independentemente da concentração de PPD ou NaCl⁷³.

Os pesquisadores atribuíram esses efeitos à alta reatividade química da PPD, que leva à formação do polímero poli-PPD até o esgotamento dos monômeros⁷³. Em baixas doses, a reação da PPD com os componentes da membrana é limitada, minimizando alterações estruturais, já em concentrações mais altas, moléculas monoméricas de PPD permanecem livres em solução e reagem com a membrana causando maior enfraquecimento⁷³. O estudo sugere que o polímero poli-PPD contribui para impedir a penetração de água nas hemácias em meio hipotônico, protegendo-as temporariamente da hemólise⁷³. Essa proteção foi eliminada quando a polimerização foi bloqueada por antioxidantes (GSH e BHE) ou o polímero foi fixado, impedindo sua interação com o ambiente⁷³.

5.3.2.1.6 EpideDermTM

Hu et al. (2009) avaliaram os efeitos da PPD (20–1000 µM por 24 h) no tecido EpideDermTM exposto através do meio de cultura¹⁵². O estudo indicou uma leve citotoxicidade depende da dose. Foi observado que, à medida que a concentração da PPD aumentava, a proporção de PPD inalterada recuperada no meio de cultura também

aumentava¹⁵². No entanto, a análise dos metabólitos revelou que a concentração de DAPPD diminuiu, devido à saturação na conversão, enquanto a concentração de MAPPD permanecia constante, indicando que este último é metabólito intermediário, e a DAPPD é o metabólito final¹⁵². Esses achados são consistentes com os resultados relatados por Nohynek et al. (2005)⁷⁸.

Os autores sugeriram que um possível mecanismo seria a N-acetilação da PPD por N-acetiltransferase (NAT)¹⁵². Em seres humanos, a isoenzima NAT apresenta duas formas, NAT 1 e 2, ambas apresentam a capacidade de atuar em aminas aromáticas, que é o caso da PPD, porém na pele humana apenas a NAT1 mostra atividade catalítica, sendo descartado o papel de NAT2 nesse mecanismo¹⁵².

5.3.2.1.7 Células dendríticas

O efeito da PPD em células dendríticas (CD) foi avaliado por Coulter et al. (2006), e foi observado a ativação das CD (em concentrações muito baixas, 5–50 µM), um aumento da expressão de CD40, aumento de MHC-II, aumento da proliferação de linfócitos, morte celular (em concentrações acima de 250 µM) e concentração letal (100 µM)⁷⁹. Tendo em vista esses resultados, os autores buscaram avaliar a maneira pela qual a PPD consegue desencadear esses efeitos⁷⁹. As CD residentes na pele são sentinelas imunológicas e potentes apresentadoras de antígenos (APC), o que torna possível que essas células consigam responder de maneira rápida após a exposição a alérgenos e realizar a maturação funcional e migração em direção a linfonodos drenantes^{79,85}. Quando as CD estão imaturas apresentam baixos níveis de moléculas coestimuladoras como a CD40, 80 e 86, evidenciando uma modesta capacidade de ativação de células T, e esse cenário é alterado na presença de um antígeno que possibilita que as CDs secretem citocinas e faça a regulação positiva das moléculas coestimuladas, aumentando assim a sua capacidade de ativação de células T⁷⁹.

Coulter e colaboradores sugeriram que a reação imunológica induzida pela PPD fornece dois sinais diferentes e independentes⁷⁹. O primeiro ocorre por meio da sinalização independente da dose por via MHC-II, e o segundo depende da dose e a ativação tem foco nas células dendríticas⁷⁹. Dessa forma, em concentrações altas de PPD ocorrem a ativação transcricional e aumento de CD86 e a indução da morte celular. Já em concentrações baixas e não tóxicas da PPD ocorre o aumento de CD40 e MHC-II, gerando a proliferação de linfócitos⁷⁹. Um segundo estudo, avaliou a resposta de CD86 na cocultura de queratinócitos e monócitos após a exposição a diversas concentrações de

PPD¹⁴⁷. Na avaliação ocorreu uma regulação positiva de CD86 na concentração de 31,25 µM, e para concentrações acima de 125 µM não foi possível o cálculo de CD86 devido ao efeito citotóxico nas células, reduzindo a viabilidade celular¹⁴⁷.

5.3.2.1.8 Células T

Skazik et al. avaliaram a reatividade cruzada de células T a composto para-amino, entres eles a PPD¹⁸³. O mecanismo de sensibilização e elicitação cutânea da PPD com um pró ou pré-hapteno não foi esclarecido, porém algumas hipóteses da maneira como ocorre a sensibilização do organismo a produtos químicos compostos por pequenas moléculas foram elaboradas^{56,142,183,217}. Como conceito tem-se que os haptenos, compostos quimicamente reativos de molécula pequena, não são imunogênicos por si, porém elas se ligam a proteínas ou peptídeos que as modificam²¹⁸. As proteínas modificadas são processadas e apresentadas como peptídeos modificados por haptenos em associação com moléculas de antígeno leucocitário humano para as células T, que são capazes de ativá-las²¹⁹. Além disso, os haptenos são frequentemente derivados de produtos químicos (pro-haptenos) que não são quimicamente reativos e precisam ser metabolizados em um hapteno eletrolítico com propriedades antigênicas¹²⁰. Outro ponto apresentado é que substâncias quimicamente inertes podem se ligar diretamente ao MHC de maneira independente de processamento, interagirem com os receptores de células T e estimular células T²²⁰. Dados indicam que a PPD pode ativar as células T de memória por meio do uso de células apresentadoras de antígenos, fixadas com glutaraldeído tornando-a incapaz de processar²²¹.

5.3.2.1.9 Oócitos de camundongos fêmeas

Wang et al. (2022) realizaram o tratamento de camundongos fêmeas, da linhagem ICR3, de 3 semanas de idade com PPD, e após 10 dias encontraram resultados que evidenciaram alterações sobre oócitos dos mamíferos¹⁸¹. Foram encontrados diversos efeitos adversos, como aumento do número de folículos atrésicos, parada da meiose nos oócitos sem extrusão do corpo polar, efeitos tóxicos na maturação dos oócitos, cromossomos e os fusos desorganizados (levando a destruição do citoesqueleto), alteração do padrão de distribuição e da expressão de ovastacina nos oócitos maduros (levando ao comprometimento da maturação citoplasmática), alteração da capacidade de ligação dos espermatozoides e o status de clivagem da ZP2 (enfraquecimento da capacidade e probabilidade de fertilização) e presença de características irregulares no receptor folato 4 (Juno)¹⁸¹. As alterações também ocorreram em mitocôndrias dos oócito,

que se apresentaram agrupadas ou agregadas, reduzindo a produção e distribuição de ATP de maneira adequada¹⁸¹. E por fim, a PPD aumentou os níveis de ROS, o que foi relacionado a apoptose precoce dos oócitos¹⁸¹.

5.3.2.1.10 Linfócitos humanos

O efeito de PPD em linfócitos humanos foi descrito por três trabalhos realizados por Chye e colaboradores, 2008⁶⁴, Coulter e colaboradores, 2007⁷⁹, e Salami, Pourahmad e Zarei, 2023¹⁷⁰. Os efeitos relatados foram a presença de genotoxicidade nas doses de 100 a 500 μM ⁶⁴, presença de apoptose (27% com 0,8 mM) e necrose celular (10% com 0,8 mM)¹⁷⁰, respostas proliferativas entre 0,1 e 50 mM⁶⁴, repostas inibitórias em concentrações acima de 100 mM⁶⁴, colapso dos níveis de glutathione reduzida (0,8 e 1,6 mM após 4 h)¹⁷⁰, aumento dos níveis de glutathione oxidada (0,4, 0,8 e 1,6 mM, após 2,4 e 6 h)¹⁷⁰, aumento da caspase-3 (0,8 mM após 12 h)¹⁷⁰, aumento da secreção de interleucinas (4, 5 e 13)⁷⁹, aumento da secreção de TNF- α , MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, IFN- γ (0,4 mM em 24 h) e TBARS (0,8 e 1,6 mM, após 6 h)^{64,170}, aumento dos níveis de ROS (0,8 e 1,6 mM, respectivamente após 4 e 6 h)¹⁷⁰ e redução da viabilidade celular (IC50 de 0,8 mM após 12 h)¹⁷⁰ e redução significativa no potencial de membrana (1,6 mM) após 2 h de tratamento¹⁷⁰.

Coulter et al. (2007) analisaram linfócitos de pacientes sensibilizados por PPD e voluntários não sensibilizados, expondo-os a PPD e BB⁶⁹. Os autores sugeriram que a PPD pode se ligar diretamente ao complexo principal de histocompatibilidade ou ao receptor de células T, contribuindo para a resposta imunológica associada à dermatite de contato⁶⁹.

Salerno et al. (1995) sugeriram que células T produtoras de IL-4 podem desempenhar um papel importante na patologia tecidual²²². Complementando essa observação, Asherson et al. (1996) e Neis et al. (2006) detectaram altos níveis de IL-4 e IL-13 em biópsias de pele de pacientes alérgicos^{223,224}. Da mesma forma, Sieben et al. (2002) relataram um aumento na secreção de IL-4 e IL-5 por células T reativas a PPD e BB em pacientes alérgicos a tinturas de cabelo, resultados corroborados pelo estudo de Coulter e colaboradores^{69,221}. Além disso, clones de células T estimularam um aumento na produção de TNF- α , citocina associada a processos inflamatórios, como a dermatite de contato⁶⁹. Os níveis elevados de TNF- α e IL-13 também têm sido observados em doenças imunológicas, incluindo lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide^{69,225,226}.

Salami et al. (2023) buscaram justificar a presença da necrose celular e apoptose após a exposição a PPD¹⁷⁰. Um dos mecanismos propostos para justificar essa situação é por meio da formação de espécies reativas de oxigênio^{16,170}, isso ocorreu no estudo de Salami e colaboradores, sendo também evidenciado que este aumento ocorre dependente do tempo¹⁷⁰. Outros estudos indicam que ROS consegue gerar o colapso da membrana mitocondrial e causar a liberação do citocromo C, que possibilita a clivagem da caspase-3, ocasionando a apoptose celular¹⁷⁰. Além disso, diversos estudos indicaram que o principal local em que ocorre a oxidação da PPD é na mitocôndria, mais precisamente no sistema citocromo C/citocromo oxidase^{227,228}. Dessa maneira, a PPD consegue reduzir o transporte de elétrons da cadeia respiratória e afeta na entrega de ATP^{170,229}.

5.3.2.1.11 Cocultura de queratinócitos e células mononucleares de sangue periféricos

A cocultura de queratinócitos e células mononucleares de sangue periféricos (CMSPs) quando exposta a PPD evidenciou uma forte reatividade¹⁸³ e o aumento de CD124+ em linfócitos¹⁶⁰, aumento da expressão de CD44 em linfócitos¹⁶⁰ e aumento da concentração de interleucinas (IL-4, IL-13 e IL-22)^{158,160}. Ocorreu uma divergência de resultados relacionados ao IFN- γ , Gibson e colaboradores (2015)¹⁵⁸ descreveram um aumento de IFN- γ e Frombach e colaboradores (2018) descreveram uma redução de IFN- γ . A ocorrência do aumento da expressão de CD124, receptor de IL-4, se correlaciona com o aumento da presença de IL-4 durante a exposição a PPD que ocorreu de maneira dose dependente, sugerindo um papel funcional desse sistema para a sensibilização *in vitro*¹⁶⁰. O aumento de CD44 ocorreu devido à mudança de linfócitos de uma população de CD44dim para CD44bright, o que é consistente com a ativação e sensibilização de células T imaturas¹⁶⁰. Frombach et al. (2018) relataram que o IFN- γ diminui de forma dose dependente, porém os autores concluíram que novos estudos deveriam ser realizados para avaliar a correlação dessa redução com o aumento de IL-4¹⁶⁰.

O aumento da secreção de IL-22, encontrado por Gibson et al. (2015), está amplamente associado a reações imunológicas na pele, ao aumento da inflamação cutânea e à proliferação de queratinócitos^{158,230–233}. Em pacientes com psoríase e dermatite de contato alérgica, foi observado um aumento de IL-22^{158,230–233}. O aumento de biomarcadores, como IL-22, IL-13 e IFN- γ , está vinculado à sensibilização de células T específicas de antígeno em pacientes com dermatite de contato alérgica¹⁵⁸.

5.3.2.1.12 Células mioblásticas de camundongo (C2C12)

As células mioblásticas de camundongo (C2C12) quando expostas à PPD apresentaram uma redução na produção de ATP, um metabolismo energético menos ativo, redução da viabilidade celular e indução de apoptose, o que é sugerido por de Mas et al. (2017) como associação com a rabdomiólise observada nas células¹⁷⁴. A ocorrência de rabdomiólise também foi justificada pelos achados da presença da interrupção da glicólise provada por PPD pode ter levado a depleção de ATP, acúmulo de íons de cálcio, baixa atividade dos canais de cálcio depende de ATP, sendo mais um sinal da ocorrência de rabdomiólise¹⁷⁴.

5.3.2.1.13 Células epiteliais humanas (HaCaT)

As células epiteliais humanas (HaCaT) têm sido amplamente estudadas por diversos autores com o objetivo de compreender os efeitos da PPD nessas células^{30,117,118,156,157,159,161,164,166,169,179}. Os efeitos encontrados foram diversos, como dano lipoperoxidativo¹¹⁷, dano oxidativo ao DNA^{159,169}, efeito citotóxico^{54,118,166,179}, desestabilização lisossômica¹⁵⁹, perda do potencial de membrana mitocondrial^{159,166}, liberação de IL-1 β e IL-8¹⁵⁷, aumento da ativação de caspases¹⁶⁶, aumento dos níveis de ROS após 1 hora de tratamento combinado com peróxido de hidrogênio¹⁶⁹, redução da viabilidade celular^{30,118,159,164}, entre outros.

5.3.2.1.14 Fibroblastos de ratos Wistar

Seydi et al. (2018) avaliaram os parâmetros de toxicidade da PPD, incluindo estresse oxidativo, dano mitocondrial e lisossômico, e apoptose nos fibroblasto de ratos Wistar¹⁶⁸. Foi observado que a PPD causou danos à membrana lisossomal, aumento da liberação da enzima lactato desidrogenase, e um aumento de ROS (nas concentrações de 50, 100 e 150 μ M e nos tempos de 6, 12 e 18 h) ¹⁶⁸. Além disso, foi observada a elevação do potencial de membrana mitocondrial, lipoperoxidação e a liberação do citocromo C das mitocôndrias (100 μ M), além da presença de citotoxicidade, evidenciada pela redução da viabilidade dos fibroblastos tratados com PPD nas concentrações de 50, 100 e 150 μ M¹⁶⁸.

Assim como apresentado acima, em células uroteliais humanas (UROtsa) a PPD levou a geração de ROS, disfunção mitocondrial por perda do potencial de membrana mitocondrial, aumento do número de células haploides na fase sub-G1, aumento do nível de caspase-3 e redução da viabilidade celular¹⁶².

As ROS são bem conhecidas por causarem danos celulares, induzirem apoptose e aumentarem a lipoperoxidação¹⁶⁸. Seydi e colaboradores também relataram que a via mitocondrial é particularmente suscetível aos ataques das ROS nos fosfolipídios, o que resulta na redução do potencial de membrana mitocondrial^{159,168}. Esse processo leva à ativação de fatores apoptóticos e à sinalização da apoptose^{159,168}.

Além disso, a PPD foi capaz de aumentar a liberação de citocromo C, sugerindo que ela afeta a permeabilidade mitocondrial. O estresse oxidativo provoca a formação de poros nessa membrana, permitindo a saída do citocromo C e a indução da apoptose celular^{168,234}.

5.3.2.1.15 Células renais de cães Mardin-Darby (MDCK)

Células renais de cães Mardin-Darby (MDCK) foram cultivadas em meio com doses crescentes de PPD para avaliar sua citotoxicidade e mutagenicidade em estudo realizado por Chen et al. (2006 e 2010)^{16,34}. Observou-se que a PPD reduziu a viabilidade celular de maneira depende do tempo, efeito que foi revertido com a adição de antioxidantes, como a vitamina C e E, e com inibidores de caspase-8 e caspase-9^{16,34}. A indução de danos ao DNA foi detectada na concentração de 37,5 µg/mL de PPD, de forma também dependente do tempo^{16,34}. Esses danos foram inibidos pela presença dos antioxidantes (vitamina C e E), e potencializados quando a PPD foi oxidada com peróxido de hidrogênio^{16,34}.

Vale destacar que, na concentração de 37,5 µg/mL, a PPD provocou um leve aumento de ROS após 1 hora de tratamento nas células MDCK¹⁶. Após 2 horas, os níveis de ROS duplicaram em comparação às células não tratadas, mas reduziram após 3 horas de tratamento¹⁶. Esses achados indicam que a PPD induz danos ao DNA, aumento da condensação da cromatina e fragmentação nuclear por meio da produção de ROS, como observado em outros modelos celulares mencionados anteriormente¹⁶. O percentual de integridade da membrana também foi avaliado usando a PPD em diversas concentrações, sendo que na concentração de 12,5 µg/mL reduziu 66,395%, em 25 µg/mL reduziu 58,72%, em 37,5 µg/mL reduziu 59,36% e em 50 µg/mL reduziu 45,59%³⁴. Os autores também relataram que o aumento nos níveis de ROS resultou na perda do potencial de membrana mitocondrial, na liberação do citocromo C, na ativação de caspases e indução da apoptose, corroborando com estudos anteriores¹⁶.

Além da via de apoptose por ROS, os autores observaram que a PPD pode atuar por meio da via de sinalização que ocasiona na ativação de caspases¹⁶. Isso ocorreu a partir da observação de que 37,5 µg/mL de PPD aumentam os níveis de caspases 8 e 9 após 6 horas de tratamento¹⁶. Dessa maneira, ocorre a mediação de receptores pró-apoptóticos (caspase-8) e iniciadoras (caspase-9) pela via mitocondrial ou intrínseca, e ambas realizam a ativação da caspase 3/7 levando à apoptose¹⁶. Além disso, os autores demonstraram que esses efeitos ocorrem em concentrações inferiores a aquelas encontradas em tinturas de cabelo¹⁶.

A análise morfológica das MDCK tratadas com PPD revelou alterações significativas³⁴. Após a incubação com 12,5 µg/mL, observou-se perda da morfologia típica e aumento no tamanho das células³⁴. Quando as células foram tratadas com 25 µg/mL por 24 horas, ocorreu o arredondamento das células, acompanhado de condensação nuclear³⁴. Na concentração de 37,5 µg/mL por 24 horas, foi notada vacuolização citoplasmática, e, com 50 µg/mL por 24 horas, houve encolhimento celular e vacuolização citoplasmática³⁴.

5.3.3 CARACTERÍSTICAS DOS ENSAIOS CLÍNICOS NÃO RANDOMIZADOS INCLUÍDOS NA REVISÃO

Os efeitos tóxicos da PPD descritos nos ensaios clínicos não randomizados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Efeitos relatados para a PPD em ensaios clínicos não randomizados.

ESTUDO CLÍNICO NÃO RANDOMIZADO		
ESTUDO	EFEITO	REFERÊNCIA
Humanos	Reações positivas no teste de alergia em 30 minutos, 1 e 24 horas em pacientes previamente sensibilizados a PPD com teste de contato de (+++)	Jowsey et al., 2006 ¹²⁸
	Reações positivas no teste de alergia após 24 horas em pacientes previamente sensibilizados a PPD com teste de contato de (++)	Jowsey et al., 2006 ¹²⁸
	Reação positivas em teste de contato	Lis et al., 1998 Skazik et al., 2008 ¹⁸³ Blömeke et al., 2008 ¹³¹
	Elicitação da dermatite de contato alérgica	Lis et al., 1998 ¹²⁹ Skazik et al., 2008 ¹⁸³ Blömeke et al., 2008 ¹³¹ Basketter et al., 2016 ¹³⁰
	Presença de reação cruzada com benzoquinona, para-aminodifenilamina, para-aminofenol, para-toluenodiamina, mentol e benzocaína	Lis et al., 1998 ¹²⁹
	RNA-seq demonstrou a <i>down-regulation</i> de proteínas de junção apertada e da camada córnea na pele de pacientes com DCA grave	Meisser et al., 2019 ¹⁸²
	Expressão de CLDN1, CLDN8, CLDN11, CLMP, ocludina, MAGI1 e MAGI2 foi down-regulada em pacientes com DAC grave	
	Expressão de CLDN1 e CLMP foi <i>down-regulation</i> em cabeleireiros não responsivos e pacientes com DAC leve	
	Expressão de FLG1, FLG2 e loricrina foi <i>down-regulation</i> em indivíduos com DAC	
	<i>Down-regulation</i> de CLDN1 e FLG1 e 2	
	Pacientes com DAC apresentaram reações que variaram de leve inchaço e vermelhidão a formação de bolhas severas (+++) seguida por necrose	
	Presença de sinais inflamatórios (eritema, espessamento da pele, pápulas inflamatórias) foram visíveis no D2 e aumentando no D4	

Legenda: DAC – dermatite de contato aguda. CLDN1, 8 e 11 - claudina-1, 8 e 11. CLMP – proteína similar ao receptor de coxsackievírus e adenovírus . MAGI1 – proteína inibidora de quinase guanilato associada à membrana 1. FLG 1 e 2 - filagrina-1 e 2.

Jowsey e colaboradores investigaram as características da resposta de elicitação à PPD após a exposição de pacientes a tinturas permanente completas, composta por PPD como intermediário primário e componentes oxidantes¹²⁸. A PPD, amplamente reconhecida como um forte sensibilizador, foram predominantemente responsáveis pela DAC^{128,139,145,149,178}. Essa alergia é facilmente identificada por meio de teste de contato com 1% de PPD, concentração suficiente para provocar reações bolhosas ou erosivas^{128,235}. No entanto, recomenda-se precaução ao realizar o teste em pacientes previamente sensibilizados por tatuagens de hena preta^{128,235}. Nesses casos, a exposição deve começar com 0,1% de PPD, aumentando gradualmente a concentração, caso nenhuma reação seja observada durante a leitura^{128,235}.

No estudo, os participantes foram divididos conforme a sensibilidade observada em testes prévios e expostos a duas tinturas diferentes, tintura A com 0,5% de PPD e tintura B com concentração desconhecida de PPD¹²⁸. O grupo 1 apresentou reação aos testes de contato (+), o grupo 2 (++) e o grupo três (+++)¹²⁸. No grupo três, ambas as tinturas provocaram reações positivas em 30 minutos, 1 hora e 24 horas¹²⁸. Já no grupo 2, as duas tinturas induziram reações positivas após 24 horas de exposição à PPD¹²⁸. Esses dados evidenciam a relação direta entre o tempo de exposição e a resposta em pacientes previamente sensibilizados ao componente, ressaltando a importância de prevenir novas exposições¹²⁸.

Lis et al. avaliaram o potencial de sensibilidade cruzada na DAC para substâncias químicas relacionadas por um determinante antigênico em comum, por meio da exposição de pacientes sensibilizados a PPD a diversos componentes¹²⁹. Avaliando o potencial tóxico a PPD, todos os participantes do estudo apresentaram reações de sensibilidade à PPD¹²⁹. Além disso, observou-se que pacientes sensibilizados à PPD podem apresentar reações de sensibilidade cruzada à benzoquinona em diversas concentrações: 1% causou 12 reações irritantes, 0,5% provocaram 7 reações irritantes, 0,2% resultaram em 5 reações de irritação e 0,1% levaram a 3 reações positivas¹²⁹. Reações positivas também foram observadas para outros compostos, como para-aminodifenilamina (11 reações positivas), para-aminofenol (6 reações positivas), para-toluenodiamina (6 reações positivas), mentol (5 reações positivas) e benzocaína (2 reações positivas)¹²⁹. Esses resultados sugerem que a sensibilização à PPD pode aumentar a susceptibilidade dos pacientes a reações de sensibilidade cruzada com diversos outros compostos¹²⁹.

Skazik et al. investigaram a reação à PPD em 13 pacientes (10 mulheres e 3 homens) por meio do teste de contato¹⁸³. Desses, 8 pacientes apresentaram reação moderada (++) e 5 apresentaram reação forte (+++) à PPD¹⁸³. Esses dados sugerem que a PPD tem uma boa capacidade de provocar respostas de sensibilidade em pacientes, com uma predominância de reações moderadas e fortes, o que reforça a relevância da PPD como um alérgeno significativo em casos de DAC¹⁸³.

Blömeke et al. analisaram a exposição cutânea de PPD e seus dois derivados acetilados (MAPPD e DAPPD) em 455 indivíduos (273 mulheres e 182 homens) com o intuito de avaliar a elicitação aos derivados acetilados formados pela atividade da enzima N-acetiltransferase 1 na pele^{77,131}. PPD, MAPPD e DAPPD foram preparados a 1% em petrolato, e a exposição foi acompanhada nos dias 2, 3 e 4 (D2, D3 e D4)¹³¹.

Dos 455 indivíduos, 16 (3,5%) apresentaram teste de contato positivo a PPD; nenhum paciente reagiu a MAPPD, e apenas 1 teve teste positivo para DAPPD¹³¹. Entre os pacientes que apresentaram resposta a PPD, 2 tiveram resultados de reação fraca (+), 10 tiveram reação moderada (++) e 4 reações fortes (+++)¹³¹. O paciente que testou positivo para DAPPD apresentou reação moderada (++)¹³¹.

Tais resultados evidenciam que os derivados acetilados da PPD, em geral, não apresentam uma capacidade de reativar as células T específicas para PPD¹³¹. Esse achado levanta a hipótese de que a acetilação rápida possa reduzir a quantidade de PPD disponível no organismo, funcionando como um mecanismo para diminuir tanto da sensibilização e quando a intensidade da resposta alérgica¹³¹.

Basketter et al. investigaram se a vitamina C, um antioxidante, poderia reduzir a disponibilidade da PPD e seus derivados, minimizando os efeitos indutores e a elicitação de reações alérgicas¹³⁰. A hipótese baseou-se em estudos prévios que indicaram o papel crucial dos processos oxidativos na pele nos efeitos tóxicos da PPD^{130,131,221}.

O estudo contou com 28 voluntários com histórico de alergia de contato a produtos de tintura capilar, diagnosticados previamente por meio do teste de contato positivo com PPD a 1% em petrolato¹³⁰. Durante o experimento, os testes foram realizados nas costas dos participantes, e incluíram aplicação de PPD em concentrações de 1%, 0,5% e 0,1% em petrolato; tintura capilar contendo 1% de PPD; e base de tintura capilar sem PPD¹³⁰. As aplicações foram feitas na mesma área da pele, dividindo-se um lado para o pré-tratamento com vitamina C e o outro lado sem o pré-tratamento¹³⁰.

As áreas tratadas foram avaliadas após 48 e 96 horas¹³⁰. Os resultados mostraram que a vitamina C conseguiu inibir a elicitação de dermatite alérgica de contato provocada pela PPD em 70 a 80% das reações, independente da intensidade (0, +, ++ e +++), destacando essa como uma estratégia promissora para a redução de DAC em indivíduos sensibilizados¹³⁰.

Meisser et al. realizaram a investigação dos efeitos da exposição da PPD na pele de indivíduos expostos ocupacionalmente, com presença ou ausência de sintomas clínicos por meio do acompanhamento da expressão de proteínas do estrato córneo (SC) e das junções de oclusão (TJ)¹⁸². Conforme mencionado, a exposição à PPD leva a reações de DAC, eczema, coceira, vermelhidão, inchaço, presença de vesículas, em casos mais severos a exposição a tintura de cabelo contendo a substância pode levar ao inchaço facial e obstrução das vias respiratórias sendo necessária a hospitalização^{182,236,237}.

Na Europa, juntamente com a dermatite de contato irritativa, a DAC é uma das doenças ocupacionais mais prevalentes, o que leva a impactos econômicos e perda da produtividade^{182,237}. Os profissionais que mais são acometidos são os cabeleireiros por serem expostos com frequência a componentes alérgenos e irritantes^{182,237}. Além do mais, estudos evidenciam que apenas duas exposições são o suficiente para sensibilização à PPD, devido ao fato de ser um sensibilizador e alérgeno forte^{182,238,239}. Apenas 0,8% da população geral europeia é sensibilizada a PPD^{182,240}. Entretanto, dados coletados pela *Information Network of Departments of Dermatology* (2007 – 2012) evidenciaram que 20%, de 814 cabeleireiros testados, apresentavam DAC pela PPD¹⁸². O contato à substância não ocorre apenas no momento da tintura capilar, mas também ocorre durante o corte de cabelos recém-tingidos ou contaminação no ambiente de trabalho^{182,241}.

A barreira cutânea é a primeira linha de defesa dos humanos contra poluentes, alérgenos e patógenos¹⁸². Essa barreira apresenta queratinócitos, lipídios, íons e peptídeos antimicrobianos para proteção da microbiota da pele e para evitar a colonização por patógenos^{182,242}. Os queratinócitos selam a camada epidérmica do meio ambiente por meio da TJ, caso ela e as proteínas do SC estejam danificadas, ou com alguma disfunção, ocorre a propiciação de doenças alérgicas na pele^{182,243}. Em pacientes com a pele lesionada com dermatite atópica, as proteínas da família TJ (claudina-1, 8 e 23) apresentam níveis reduzidos^{182,244,245}. Estudos indicam que a ocorrência de polimorfismo no gene da claudina-1 está associada ao aumento de sensibilização a alérgenos de contato,

como a PPD^{182,246}. Além do mais, paciente com dermatite atópica, apresentam a expressão reduzida e mutação de genes da filagrina 1 e 2^{182,247-250}.

No estudo de Meisser e colaboradores, 10 pacientes com DAC e 11 cabeleireiros sem DAC foram submetidos a teste de contato com PPD (20 mg de 1% de PPD em vaselina) aplicada por via tópica, e a avaliação ocorreu nos dias 2 e 4 (D2 e D4)¹⁸². O estudo demonstrou que a expressão de CLDN1 e CLMP foram reduzidas em casos de DAC leve e grave¹⁸². Em indivíduos não respondedores a claudina-1, filagrina-1 e 2 estavam reduzidas¹⁸². A junção desses dados sugere que a regulação negativa de CLDN1 e CLMP ocorre pela exposição a PPD, e a desregulação das proteínas de TJ ocorrem devido a resposta à inflamação subsequente¹⁸².

5.4 RISCOS DE VIÉS

5.4.1 ESTUDOS *IN VIVO*

Foram incluídos nessa revisão trinta e oito artigos classificados como estudos *in vivo*. Para a avaliação do risco de viés desses artigos, foi utilizado o checklist do SYRCLE¹²⁶. A ferramenta é dividida em seis domínios de análise, que incluem ao todo dez questões de sinalização¹²⁶. Com base na análise desses domínios, demonstrada na tabela abaixo, foi gerado um gráfico que permitisse a comparação das respostas de cada artigo em seus respectivos domínios (Figura 4).

Tabela 4. Análise do risco de viés dos estudos *in vivo* (continua).

Risco de viés do SYRCLE para estudos <i>in vivo</i> (adaptado)											
Estudos	Seleção			Desempenho		Detecção		Atrito	Relato	Outros	Viés
	QS1	QS2	QS3	QS4	QS5	QS6	QS7	QS8	QS9	QS10	
Lloy et al., 1977 ¹³⁵	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	0,5	Médio risco
Wadaan et al., 2005 ¹	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	Médio risco
Mathur et al., 1995 ⁴⁵	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0	0,5	0,5	Alto risco
Munday et al., 1999 ⁴⁷	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	Médio risco
Lee et al., 2008 ⁵⁴	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	0,5	Médio risco

Legenda: QS1 - A sequência de alocação foi gerada e aplicada adequadamente? QS2- Os grupos eram semelhantes na linha de base ou foram ajustados para fatores de confusão na análise? QS3 - A alocação para os diferentes grupos foi adequadamente ocultada durante? QS4 - Os animais foram alojados aleatoriamente durante o experimento? QS5 - Os cuidadores e/ou investigadores foram cegados do conhecimento de qual intervenção cada animal recebeu durante o experimento? QS6- Os animais foram selecionados aleatoriamente para avaliação de resultados? QS7 - O avaliador de resultados foi cegado? QS8 - Os dados de resultados incompletos foram abordados adequadamente? QS9 - Os relatórios do estudo estão livres de relatórios de resultados seletivos? QS10 - O estudo estava aparentemente livre de outros problemas que poderiam resultar em alto risco de viés? 140. Para cada pergunta, as possíveis respostas são: Sim (1), Incerto (0,5) e Não (0)

Tabela 4 – Análise do risco de viés dos estudos *in vivo* (continuação).

Risco de viés do SYRCLE para estudos <i>in vivo</i> (adaptado)											
Estudos	Seleção			Desempenho		Deteção		Atrito	Relato	Outros	Viés
	QS1	QS2	QS3	QS4	QS5	QS6	QS7	QS8	QS9	QS10	
El-Amin et al., 2014 ⁴⁰	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	Médio risco
Rojanapo et al., 1986 ³⁷	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	0,5	Médio risco
Bonefeld et al., 2009 ¹¹²	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	0,5	Médio risco
Burnett et al., 1977 ²¹	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	Médio risco
Bharali et al., 2012 ³⁹	0,5	1	0,5	1	0,5	0,5	0,5	1	1	0,5	Médio risco
Li et al., 1995 ¹¹⁹	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1	0,5	Médio risco

Legenda: QS1 - A sequência de alocação foi gerada e aplicada adequadamente? QS2- Os grupos eram semelhantes na linha de base ou foram ajustados para fatores de confusão na análise? QS3 - A alocação para os diferentes grupos foi adequadamente ocultada durante? QS4 - Os animais foram alojados aleatoriamente durante o experimento? QS5 - Os cuidadores e/ou investigadores foram cegados do conhecimento de qual intervenção cada animal recebeu durante o experimento? QS6- Os animais foram selecionados aleatoriamente para avaliação de resultados? QS7 - O avaliador de resultados foi cegado? QS8 - Os dados de resultados incompletos foram abordados adequadamente? QS9 - Os relatórios do estudo estão livres de relatórios de resultados seletivos? QS10 - O estudo estava aparentemente livre de outros problemas que poderiam resultar em alto risco de viés? 140. Para cada pergunta, as possíveis respostas são: Sim (1), Incerto (0,5) e Não (0)

Tabela 4 – Análise do risco de viés dos estudos *in vivo* (continuação).

Risco de viés do SYRCLE para estudos <i>in vivo</i> (adaptado)											
Estudos	Seleção			Desempenho		Deteção		Atrito	Relato	Outros	Viés
	QS1	QS2	QS3	QS4	QS5	QS6	QS7	QS8	QS9	QS10	
Xie et al., 2000 ¹⁴⁰	0,5	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	0,5	Médio risco
Stenbäck et al., 1976 ¹³⁷	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	Médio risco
Soler-Niedziela et al., 1991 ¹⁰⁴	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	Médio risco
Viswanathan et al., 1985 ⁶⁸	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	Médio risco
Rubin et al., 2010 ⁶⁵	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1	0,5	Médio risco
Bharali et al., 2012 ⁷⁴	0,5	1	0,5	1	0,5	0,5	0,5	1	1	0,5	Médio risco

Legenda: QS1 - A sequência de alocação foi gerada e aplicada adequadamente? QS2- Os grupos eram semelhantes na linha de base ou foram ajustados para fatores de confusão na análise? QS3 - A alocação para os diferentes grupos foi adequadamente ocultada durante? QS4 - Os animais foram alojados aleatoriamente durante o experimento? QS5 - Os cuidadores e/ou investigadores foram cegados do conhecimento de qual intervenção cada animal recebeu durante o experimento? QS6- Os animais foram selecionados aleatoriamente para avaliação de resultados? QS7 - O avaliador de resultados foi cegado? QS8 - Os dados de resultados incompletos foram abordados adequadamente? QS9 - Os relatórios do estudo estão livres de relatórios de resultados seletivos? QS10 - O estudo estava aparentemente livre de outros problemas que poderiam resultar em alto risco de viés? ¹⁴⁰. Para cada pergunta, as possíveis respostas são: Sim (1), Incerto (0,5) e Não (0)

Tabela 4 – Análise do risco de viés dos estudos *in vivo* (continuação).

Risco de viés do SYRCLE para estudos <i>in vivo</i> (adaptado)											
Estudos	Seleção			Desempenho		Detecção		Atrito	Relato	Outros	Viés
	QS1	QS2	QS3	QS4	QS5	QS6	QS7	QS8	QS9	QS10	
Abd-Elzaher et al., 2012 ³⁸	0,5	1	0,5	1	0,5	0,5	0,5	1	1	1	Baixo risco
Garrigue et al., 1993 ¹⁷⁶	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	Médio risco
Hagiwara et al., 1990 ¹³²	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	Médio risco
To-o et al., 2010 ¹³⁹	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	Médio risco
Qin et al., 2018 ¹⁸⁰	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	Médio risco
Katsumi et al., 1982 ¹⁰⁰	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	0,5	Médio risco

Legenda: QS1 - A sequência de alocação foi gerada e aplicada adequadamente? QS2- Os grupos eram semelhantes na linha de base ou foram ajustados para fatores de confusão na análise? QS3 - A alocação para os diferentes grupos foi adequadamente ocultada durante? QS4 - Os animais foram alojados aleatoriamente durante o experimento? QS5 - Os cuidadores e/ou investigadores foram cegados do conhecimento de qual intervenção cada animal recebeu durante o experimento? QS6- Os animais foram selecionados aleatoriamente para avaliação de resultados? QS7 - O avaliador de resultados foi cegado? QS8 - Os dados de resultados incompletos foram abordados adequadamente? QS9 - Os relatórios do estudo estão livres de relatórios de resultados seletivos? QS10 - O estudo estava aparentemente livre de outros problemas que poderiam resultar em alto risco de viés? 140. Para cada pergunta, as possíveis respostas são: Sim (1), Incerto (0,5) e Não (0)

Tabela 4 – Análise do risco de viés dos estudos *in vivo* (continuação).

Risco de viés do SYRCLE para estudos <i>in vivo</i> (adaptado)											
Estudos	Seleção			Desempenho		Deteção		Atrito	Relato	Outros	Nota
	QS1	QS2	QS3	QS4	QS5	QS6	QS7	QS8	QS9	QS10	
Funch et al., 2023 ¹⁷³	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	Médio risco
Bharali et al., 2009 ²⁶	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	0,5	Médio risco
Kashima et al., 1996 ¹⁷⁸	0,5	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	0,5	Médio risco
Farrell et al., 2008 ¹⁷⁵	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	Médio risco
Jen et al., 2023 ³³	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	0,5	Médio risco
Kitchin et al., 1993 ¹³⁴	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0	0,5	0	0	0,5	Alto risco

Legenda: QS1 - A sequência de alocação foi gerada e aplicada adequadamente? QS2- Os grupos eram semelhantes na linha de base ou foram ajustados para fatores de confusão na análise? QS3 - A alocação para os diferentes grupos foi adequadamente ocultada durante? QS4 - Os animais foram alojados aleatoriamente durante o experimento? QS5 - Os cuidadores e/ou investigadores foram cegados do conhecimento de qual intervenção cada animal recebeu durante o experimento? QS6- Os animais foram selecionados aleatoriamente para avaliação de resultados? QS7 - O avaliador de resultados foi cegado? QS8 - Os dados de resultados incompletos foram abordados adequadamente? QS9 - Os relatórios do estudo estão livres de relatórios de resultados seletivos? QS10 - O estudo estava aparentemente livre de outros problemas que poderiam resultar em alto risco de viés? 140. Para cada pergunta, as possíveis respostas são: Sim (1), Incerto (0,5) e Não (0)

Tabela 4 – Análise do risco de viés dos estudos *in vivo* (continuação).

Risco de viés do SYRCLE para estudos <i>in vivo</i> (adaptado)											
Estudos	Seleção			Desempenho		Deteção		Atrito	Relato	Outros	Viés
	QS1	QS2	QS3	QS4	QS5	QS6	QS7	QS8	QS9	QS10	
Kalish et al., 1995 ¹⁷⁷	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	Médio risco
Svalgaard et al., 2014 ¹³⁸	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1	Médio risco
Bharali et al., 2012 ²⁵	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	0,5	Médio risco
Rothe et al., 2011 ¹³⁶	0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	Médio risco
de Mas et al., 2017 ¹⁷⁴	0,5	1	0,5	1	0,5	0,5	0,5	1	1	0,5	Médio risco
Wang et al., 2022 ¹⁸¹	0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	Médio risco

Legenda: QS1 - A sequência de alocação foi gerada e aplicada adequadamente? QS2- Os grupos eram semelhantes na linha de base ou foram ajustados para fatores de confusão na análise? QS3 - A alocação para os diferentes grupos foi adequadamente ocultada durante? QS4 - Os animais foram alojados aleatoriamente durante o experimento? QS5 - Os cuidadores e/ou investigadores foram cegados do conhecimento de qual intervenção cada animal recebeu durante o experimento? QS6- Os animais foram selecionados aleatoriamente para avaliação de resultados? QS7 - O avaliador de resultados foi cegado? QS8 - Os dados de resultados incompletos foram abordados adequadamente? QS9 - Os relatórios do estudo estão livres de relatórios de resultados seletivos? QS10 - O estudo estava aparentemente livre de outros problemas que poderiam resultar em alto risco de viés? 140. Para cada pergunta, as possíveis respostas são: Sim (1), Incerto (0,5) e Não (0)

Tabela 4 – Análise do risco de viés dos estudos *in vivo* (continuação).

Risco de viés do SYRCLE para estudos <i>in vivo</i> (adaptado)											
Estudos	Seleção			Desempenho		Deteção		Atrito	Relato	Outros	Viés
	QS1	QS2	QS3	QS4	QS5	QS6	QS7	QS8	QS9	QS10	
Arafa et al., 2020 ¹⁴¹	0	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1	Médio risco
OH et al., 2018 ¹⁷⁹	0,5	1	0,5	1	0,5	0,5	0,5	1	1	0,5	Médio risco
De Boeck et al., 2015 ¹⁷²	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1	Médio risco

Legenda: QS1 - A sequência de alocação foi gerada e aplicada adequadamente? QS2- Os grupos eram semelhantes na linha de base ou foram ajustados para fatores de confusão na análise? QS3 - A alocação para os diferentes grupos foi adequadamente ocultada durante? QS4 - Os animais foram alojados aleatoriamente durante o experimento? QS5 - Os cuidadores e/ou investigadores foram cegados do conhecimento de qual intervenção cada animal recebeu durante o experimento? QS6- Os animais foram selecionados aleatoriamente para avaliação de resultados? QS7 - O avaliador de resultados foi cegado? QS8 - Os dados de resultados incompletos foram abordados adequadamente? QS9 - Os relatórios do estudo estão livres de relatórios de resultados seletivos? QS10 - O estudo estava aparentemente livre de outros problemas que poderiam resultar em alto risco de viés? 140. Para cada pergunta, as possíveis respostas são: Sim (1), Incerto (0,5) e Não (0)

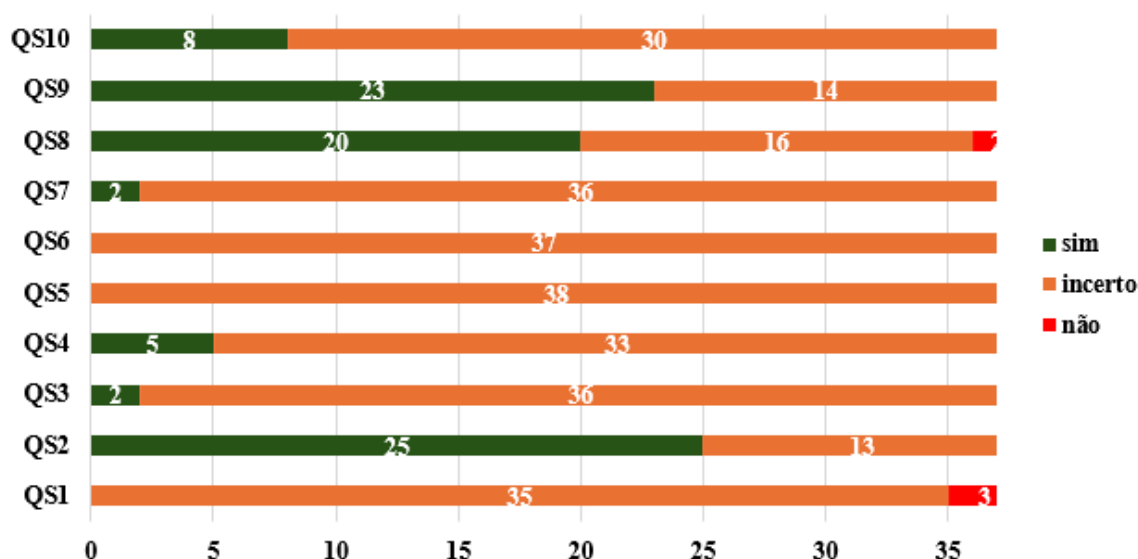


Figura 3. Resultado do risco de viés dos estudos *in vivo* incluídos na revisão.

QS1 - A sequência de alocação foi gerada e aplicada adequadamente? QS2- Os grupos eram semelhantes na linha de base ou foram ajustados para fatores de confusão na análise? QS3 - A alocação para os diferentes grupos foi adequadamente ocultada durante? QS4 - Os animais foram alojados aleatoriamente durante o experimento? QS5 - Os cuidadores e investigadores foram cegados do conhecimento de qual intervenção cada animal recebeu durante o experimento? QS6- Os animais foram selecionados aleatoriamente para avaliação de resultados? QS7 - O avaliador de resultados foi cegado? QS8 - Os dados de resultados incompletos foram abordados adequadamente? QS9 - Os relatórios do estudo estão livres de relatórios de resultados seletivos? QS10 - O estudo estava aparentemente livre de outros problemas que poderiam resultar em alto risco de viés?¹²⁶.

Analisando as respostas da QS1 (A sequência de alocação foi gerada e aplicada adequadamente?), 35 artigos foram considerados como “incertos” sobre esta informação e 3 não continham as informações^{136,141,181}. Dos 35 artigos classificados como incertos, seis informaram que os animais foram separados aleatoriamente por grupo, porém, não explicaram como ocorreu a aleatoriedade^{25,26,39,74,140,179}. Um estudo utilizou dois tipos de animais (rato e coelhos); no primeiro caso, foi confirmada a aleatoriedade, mas sem explicações detalhadas sobre o processo, enquanto no segundo não foram fornecidos dados sobre a aleatoriedade¹³⁷. Em quatro estudos, não foi mencionada a forma de alocação dos animais nos grupos^{104,133,175,180}. Em cinco estudos, não ficou claro como ocorreu o processo de randomização^{40,99,119,138,178}.

Avaliando as respostas da QS 2 (Os grupos eram semelhantes na linha de base ou foram ajustados para fatores de confusão na análise?), 25 artigos continham informações detalhadas sobre os animais, como espécie, peso, quantidade por grupo^{1,25,26,37–}

40,54,74,112,119,133–135,138–141,172,174–176,178–180. Quatro estudos não mencionaram a quantidade por grupo^{51,104,136,177}. Um estudo não apresentou informações suficientes sobre idade e peso para avaliar se a distribuição era adequada⁶⁵. Dois estudos não deixaram claro como foi feita a alocação dos grupos^{68,132}. Embora dois estudos mostrassem informações dos animais (espécie, peso, idade, quantidade por grupo), houve discrepância entre os valores mencionados no texto e aqueles nas legendas das imagens^{45,181}. Três estudos apresentavam desproporcionalidade entre os grupos, sem justificar esse fato^{21,100}. Um estudo não esclareceu como foi feita a distribuição dos animais nos grupos e não mencionou o gênero e a idade dos animais¹⁷³.

Avaliando as respostas da QS 3 (A alocação para os diferentes grupos foi adequadamente ocultada durante?), 2 artigos continham informações detalhadas sobre a alocação e como ela foi ocultada^{140,178}. Trinta e quatro estudos mencionaram a alocação, mas não deixaram claro se houve ou não cegamento da alocação^{1,21,25,26,37–40,45,47,54,68,74,100,104,112,119,132–136,138,139,141,172–177,179–181}. Um estudo não apresentou informações sobre a alocação⁶⁵. Um estudo utilizou dois tipos de animais (rato e coelhos); no primeiro caso, foi confirmada a aleatoriedade da alocação, mas sem explicação de como ela foi ocultada, enquanto no segundo não foram fornecidos dados sobre a alocação¹³⁷.

Avaliando as respostas da QS4 (Os animais foram alojados aleatoriamente durante o experimento?), 4 artigos continham informações detalhadas sobre a alocação com aleatoriedade^{38,39,74,174}. Um artigo utilizou embriões de zebrafish, e, pela quantidade desses embriões, considerou-se que a alocação ocorreu de forma aleatória¹⁷⁹. Trinta e três artigos não deixaram claros se a alocação foi feita de maneira aleatoriedade^{1,21,25,26,37,40,45,47,54,65,68,100,104,112,119,132–141,172,173,175–178,180,181}.

Avaliando as respostas da QS5 (Os cuidadores e investigadores foram cegados do conhecimento de qual intervenção cada animal recebeu durante o experimento?), todos os 38 artigos foram classificados como “incerto”^{1,21,25,26,37–40,45,47,54,65,68,74,100,104,112,119,132–141,172–181}. Os artigos não mencionavam de forma clara como os cuidadores e/ou investigadores foram conduzidos nos experimentos, não deixando evidente se o cegamento foi realmente implementado.

Avaliando as respostas da QS6 (Os animais foram selecionados aleatoriamente para avaliação de resultados?), um artigo informou, em sua discussão, que houve a

exclusão de dados estatisticamente discrepantes, o que foi considerado na análise como um indicativo de alto risco de viés¹³⁴. Os outros artigos foram avaliados como “incertos” por diversos motivos. Em um dos artigos, foi relatado que alguns resultados não foram divulgados sem justificativa na discussão do artigo²¹. Um artigo não informou como ocorreu a seleção para a avaliação, a quantidade inicial de animais no experimento e quantos foram utilizados para os resultados¹³⁶. Em treze artigos, não era possível confirmar se foram publicados os resultados de todos os animais avaliados, pois muitas tabelas ou legendas não expressavam a quantidade de animais utilizados^{1,40,68,104,132,137,175–177,180}. No entanto, nesses treze estudos, a quantidade inicial de animais era informada no início do artigo. Em vinte e dois dos estudos não ficou claro como foi a escolha dos animais para a avaliação, embora tenha sido descrito na metodologia que todos os animais foram incluídos no estudo e os resultados foram apresentados^{25,26,37–39,45,47,54,65,74,112,119,133,135,138,140,141,172,178,179,181}.

Avaliando as respostas da QS7 (O avaliador de resultados foi cegado?), 2 artigos mencionaram que o avaliador foi cegado durante a análise^{65,119}. Já trinta e seis artigos não mencionavam de forma clara como foi conduzida a avaliação dos experimentos, não deixando evidente se o cegamento foi realmente implementado^{1,25,26,37–40,45,47,54,68,74,100,104,112,132–141,172–181}.

Avaliando as respostas da QS8 (Os dados de resultados incompletos foram abordados adequadamente?), dos 20 artigos avaliados como “sim”, dezessete não apresentaram exclusão de dados^{25,26,38,39,54,65,74,112,119,133,135,138,140,141,174,178,179}, e três justificaram o motivo da exclusão dos dados, informando, na discussão que os resultados ausentes ocorreram devido à morte de alguns animais durante o estudo^{37,100,172}. Um dos 2 artigos avaliados como “não”^{45,134} informou, em sua discussão, que houve a exclusão de dados estatisticamente discrepantes, o que foi considerado, na análise, como um indicativo de alto risco de viés¹³⁴. Em outros dois artigos, houve divergência no número de animais mencionados entre a figura e a legenda sem explicação^{45,181}. Quanto aos artigos avaliados como “incertos” para este parâmetro avaliado, em um deles foi observado que alguns animais não tiveram seus resultados divulgados, sem justificativas na metodologia²¹. Outro artigo não deixou explícito os resultados da sensibilização dos animais à PPD e BB, além de não mencionar a quantidade total de animais utilizados¹⁷⁵. Por fim, em treze artigos não ficou claro se os dados de todos os animais foram incluídos

nos resultados, devido à falta de informação nas tabelas e legendas^{1,40,47,68,104,132,136,137,139,173,176,177,180}.

Avaliando as resposta da QS9 (Os relatórios do estudo estão livres de relatórios de resultados seletivos?), dos 23 artigos classificados como “sim”, um artigo informou que houve exclusão de dados devido à morte dos animais durante o processo, e isso foi devidamente relatado no estudo¹⁸⁰. Os outros vinte e dois apresentaram o protocolo completo e disponível^{25,26,37–39,65,74,100,112,119,133,135,136,138,140,141,172,174,175,178,179,181,251}. Nesta etapa de avaliação, foi considerado que o protocolo se referia à metodologia, e a parte de análise foi avaliada para verificar se todos os testes mencionados na metodologia estavam apresentados nos resultados, caso isso acontecesse o estudo era considerado “completo e disponível”. Nos vinte e um artigos, todos os testes mencionados na metodologia foram devidamente apresentados nos resultados. O artigo classificado como “não”, informou, em sua discussão, a exclusão de dados estatisticamente discrepantes, o que foi considerado na análise como um indicativo de alto risco de viés¹³⁴. Quanto aos artigos considerados como “incertos” na avaliação deste parâmetro, um estudo não apresentou a justificativa para os dados ausentes, e em treze artigos não foi possível avaliar se os dados de todos os animais foram incluídos nos resultados^{1,21,40,45,47,68,104,132,137,139,173,176,177,180}.

Avaliando as resposta da QS10 (O estudo estava aparentemente livre de outros problemas que poderiam resultar em alto risco de viés?), 8 artigos continham a declaração de conflito de interesse, na qual estava explicitamente afirmado que não houve nenhum tipo de conflito^{38,40,136,138,172,173,175,181}, trinta artigos não apresentavam uma declaração de conflito de interesse^{1,21,25,26,37,39,40,45,47,54,65,68,74,100,104,112,119,132–135,137,139,140,174,176–180}.

5.4.2 ESTUDOS *IN VITRO*

Foram incluídos nessa revisão cinquenta e nove artigos que reportaram estudos *in vitro*. Para a avaliação do risco de viés desses artigos, foi utilizado o checklist do artigo QUINT TOOL¹²⁷. A ferramenta é dividida em doze domínios de análise¹²⁷. De todos os artigos avaliados, nenhum foi classificado de baixo risco de viés, 46 foram classificados como de médio risco e 13 de alto risco de viés.

Após análise dos domínios abordados na avaliação do risco de viés dos artigos pela aplicação da ferramenta QUINT TOOL (Tabela 6), foi gerado um gráfico (Figura 5) para comparação das respostas de cada artigo em seus respectivos domínios.

Tabela 5. Avaliação do risco de viés dos estudos *in vitro* pela ferramenta QUINT TOOL (continua).

Estudos	QS1	QS2	QS3	QS4	QS5	QS6	QS7	QS8	QS9	QS10	QS11	QS12	Viés
Kumar et al., 2020 ⁵³	2	1	1	1	1	0	0	1	0	0	2	2	Alto risco
Mosley-Foreman et al., 2008 ³⁰	2	1	1	2	1	0	0	1	0	0	2	2	Médio risco
Chye et al., 2008 ⁶⁴	2	1	1	2	1	0	0	1	0	1	2	2	Médio risco
Coulter et al., 2006 ⁷⁹	2	1	1	2	1	0	0	1	0	0	2	2	Médio risco
Rojanapo et al., 1986 ³⁷	2	1	1	2	2	0	0	2	0	0	1	2	Médio risco

Legenda: QS1 - Objetivos claramente declarados (o estudo deve declarar claramente os objetivos, que devem ser seguidos ao longo do estudo). QS2- Explicação detalhada do cálculo do tamanho da amostra (os detalhes sobre o método pelo qual o tamanho da amostra foi calculado devem ser claramente declarados. Detalhes sobre o programa de software, fórmula e parâmetros usados para o cálculo do tamanho da amostra também devem ser especificado). QS3 - Explicação detalhada da técnica de amostragem (detalhes sobre a população predefinida da qual a amostra foi selecionada. A técnica de amostragem e os critérios de inclusão e exclusão devem ser claramente declarados). QS4 – Detalhes do grupo comparação (Os detalhes do grupo de comparação (controle positivo, controle negativo ou padrão) devem ser claramente especificados). QS5 – Explicação detalhada da metodologia (Clareza do procedimento, método de padronização e detalhes de quaisquer normas universais usadas (se aplicável) devem ser claramente declarados). QS6- Detalhes do operador (O número de operadores e detalhes sobre o treinamento e a calibração dos operadores (confiabilidade inter e intra-operador) devem ser claramente especificados). QS7 – Randomização (Detalhes sobre a geração da sequência e ocultação da alocação devem ser claramente declarados). QS8 – Método de medição dos desfechos (A clareza do procedimento e a justificativa para a escolha do método devem ser declaradas. O método de padronização, juntamente com detalhes de quaisquer normas universais usadas (se aplicável), também deve ser claramente especificado). QS9 – Detalhes do avaliador de desfechos (O número de avaliadores de desfechos e os detalhes sobre o treinamento e a calibração dos avaliadores (confiabilidade inter e intra-avaliador) devem ser claramente especificados). QS10 – Cegamento (Os detalhes sobre o cegamento dos operadores, avaliadores de desfechos e estatísticos devem ser claramente especificados). QS11 –Análise estatística (Os detalhes sobre o programa de software usado e a análise estatística devem ser claramente especificados). QS12 Apresentação dos resultados (O desfecho deve ser baseado nos objetivos predefinidos. Todos os dados devem ser adequadamente tabulados, com os dados de linha de base claramente especificados). Para essa avaliação foi considerado as seguintes respostas: adequadamente especificado (2 pontos), inadequadamente especificado (1 ponto) e não especificado (0 pontos).

Tabela 5 – Avaliação do risco de viés dos estudos *in vitro* pela ferramenta QUINT TOOL (continuação).

Estudos	QS1	QS2	QS3	QS4	QS5	QS6	QS7	QS8	QS9	QS10	QS11	QS12	Viés
Picardo et al., 1995 ¹¹⁷	2	2	2	2	2	0	0	2	0	0	2	2	Médio risco
Picardo et al., 1992 ¹¹⁸	2	1	1	2	1	0	0	1	0	0	2	2	Médio risco
Chen et al., 2010 ¹⁶	2	1	2	2	1	0	0	1	0	0	2	2	Médio risco
Srhayri et al., 2016 ⁷³	2	1	1	2	1	0	0	1	0	0	1	2	Alto risco
Chen et al., 2006 ³⁴	2	1	2	2	1	0	0	1	0	0	2	2	Médio risco

Legenda: QS1 - Objetivos claramente declarados (o estudo deve declarar claramente os objetivos, que devem ser seguidos ao longo do estudo). QS2- Explicação detalhada do cálculo do tamanho da amostra (os detalhes sobre o método pelo qual o tamanho da amostra foi calculado devem ser claramente declarados. Detalhes sobre o programa de software, fórmula e parâmetros usados para o cálculo do tamanho da amostra também devem ser especificado). QS3 - Explicação detalhada da técnica de amostragem (detalhes sobre a população predefinida da qual a amostra foi selecionada. A técnica de amostragem e os critérios de inclusão e exclusão devem ser claramente declarados). QS4 – Detalhes do grupo comparação (Os detalhes do grupo de comparação (controle positivo, controle negativo ou padrão) devem ser claramente especificados). QS5 – Explicação detalhada da metodologia (Clareza do procedimento, método de padronização e detalhes de quaisquer normas universais usadas (se aplicável) devem ser claramente declarados). QS6- Detalhes do operador (O número de operadores e detalhes sobre o treinamento e a calibração dos operadores (confiabilidade inter e intra-operador) devem ser claramente especificados). QS7 – Randomização (Detalhes sobre a geração da sequência e ocultação da alocação devem ser claramente declarados). QS8 – Método de medição dos desfechos (A clareza do procedimento e a justificativa para a escolha do método devem ser declaradas. O método de padronização, juntamente com detalhes de quaisquer normas universais usadas (se aplicável), também deve ser claramente especificado). QS9 – Detalhes do avaliador de desfechos (O número de avaliadores de desfechos e os detalhes sobre o treinamento e a calibração dos avaliadores (confiabilidade inter e intra-avaliador) devem ser claramente especificados). QS10 – Cegamento (Os detalhes sobre o cegamento dos operadores, avaliadores de desfechos e estatísticos devem ser claramente especificados). QS11 –Análise estatística (Os detalhes sobre o programa de software usado e a análise estatística devem ser claramente especificados). QS12 Apresentação dos resultados (O desfecho deve ser baseado nos objetivos predefinidos. Todos os dados devem ser adequadamente tabulados, com os dados de linha de base claramente especificados). Para essa avaliação foi considerado as seguintes respostas: adequadamente especificado (2 pontos), inadequadamente especificado (1 ponto) e não especificado (0 pontos).

Tabela 5 – Avaliação do risco de viés dos estudos *in vitro* pela ferramenta QUINT TOOL (continuação).

Estudos	QS1	QS2	QS3	QS4	QS5	QS6	QS7	QS8	QS9	QS10	QS11	QS12	Viés
Kalish et al., 1995 ¹⁷⁷	2	1	1	1	2	0	0	2	0	0	2	2	Médio risco
Huang et al., 2007 ¹⁴³	2	1	2	2	1	0	0	1	0	0	2	2	Médio risco
Liu et al., 2022 ³⁶	2	1	2	2	1	0	0	1	0	0	2	2	Médio risco
Garrigue et al., 1993 ¹⁷⁶	2	1	1	2	1	0	0	1	0	0	2	2	Médio risco
Chung et al., 1996 ¹⁴⁴	1	1	2	2	1	0	0	1	0	0	1	1	Alto risco

Legenda: QS1 - Objetivos claramente declarados (o estudo deve declarar claramente os objetivos, que devem ser seguidos ao longo do estudo). QS2- Explicação detalhada do cálculo do tamanho da amostra (os detalhes sobre o método pelo qual o tamanho da amostra foi calculado devem ser claramente declarados. Detalhes sobre o programa de software, fórmula e parâmetros usados para o cálculo do tamanho da amostra também devem ser especificado). QS3 - Explicação detalhada da técnica de amostragem (detalhes sobre a população predefinida da qual a amostra foi selecionada. A técnica de amostragem e os critérios de inclusão e exclusão devem ser claramente declarados). QS4 – Detalhes do grupo comparação (Os detalhes do grupo de comparação (controle positivo, controle negativo ou padrão) devem ser claramente especificados). QS5 – Explicação detalhada da metodologia (Clareza do procedimento, método de padronização e detalhes de quaisquer normas universais usadas (se aplicável) devem ser claramente declarados). QS6- Detalhes do operador (O número de operadores e detalhes sobre o treinamento e a calibração dos operadores (confiabilidade inter e intra-operador) devem ser claramente especificados). QS7 – Randomização (Detalhes sobre a geração da sequência e ocultação da alocação devem ser claramente declarados). QS8 – Método de medição dos desfechos (A clareza do procedimento e a justificativa para a escolha do método devem ser declaradas. O método de padronização, juntamente com detalhes de quaisquer normas universais usadas (se aplicável), também deve ser claramente especificado). QS9 – Detalhes do avaliador de desfechos (O número de avaliadores de desfechos e os detalhes sobre o treinamento e a calibração dos avaliadores (confiabilidade inter e intra-avaliador) devem ser claramente especificados). QS10 – Cegamento (Os detalhes sobre o cegamento dos operadores, avaliadores de desfechos e estatísticos devem ser claramente especificados). QS11 –Análise estatística (Os detalhes sobre o programa de software usado e a análise estatística devem ser claramente especificados). QS12 Apresentação dos resultados (O desfecho deve ser baseado nos objetivos predefinidos. Todos os dados devem ser adequadamente tabulados, com os dados de linha de base claramente especificados). Para essa avaliação foi considerado as seguintes respostas: adequadamente especificado (2 pontos), inadequadamente especificado (1 ponto) e não especificado (0 pontos).

Tabela 5 – Avaliação do risco de viés dos estudos *in vitro* pela ferramenta QUINT TOOL (continuação).

Estudos	QS1	QS2	QS3	QS4	QS5	QS6	QS7	QS8	QS9	QS10	QS11	QS12	Viés
Sonnenburg et al., 2012 ¹⁴⁵	2	1	2	2	2	0	0	2	0	0	2	2	Médio risco
Coulter et al., 2007 ⁶⁹	2	1	1	2	1	0	0	1	0	0	1	2	Alto risco
Ade et al., 2006 ¹⁴⁶	2	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	2	Alto risco
Schreiner et al., 2007 ¹⁴⁷	2	1	2	1	1	0	0	1	0	0	1	2	Alto risco
dos Santos et al., 2010 ¹⁴⁸	2	1	2	2	2	0	0	2	0	0	2	2	Médio risco

Legenda: QS1 - Objetivos claramente declarados (o estudo deve declarar claramente os objetivos, que devem ser seguidos ao longo do estudo). QS2- Explicação detalhada do cálculo do tamanho da amostra (os detalhes sobre o método pelo qual o tamanho da amostra foi calculado devem ser claramente declarados. Detalhes sobre o programa de software, fórmula e parâmetros usados para o cálculo do tamanho da amostra também devem ser especificado). QS3 - Explicação detalhada da técnica de amostragem (detalhes sobre a população predefinida da qual a amostra foi selecionada. A técnica de amostragem e os critérios de inclusão e exclusão devem ser claramente declarados). QS4 – Detalhes do grupo comparação (Os detalhes do grupo de comparação (controle positivo, controle negativo ou padrão) devem ser claramente especificados). QS5 – Explicação detalhada da metodologia (Clareza do procedimento, método de padronização e detalhes de quaisquer normas universais usadas (se aplicável) devem ser claramente declarados). QS6- Detalhes do operador (O número de operadores e detalhes sobre o treinamento e a calibração dos operadores (confiabilidade inter e intra-operador) devem ser claramente especificados). QS7 – Randomização (Detalhes sobre a geração da sequência e ocultação da alocação devem ser claramente declarados). QS8 – Método de medição dos desfechos (A clareza do procedimento e a justificativa para a escolha do método devem ser declaradas. O método de padronização, juntamente com detalhes de quaisquer normas universais usadas (se aplicável), também deve ser claramente especificado). QS9 – Detalhes do avaliador de desfechos (O número de avaliadores de desfechos e os detalhes sobre o treinamento e a calibração dos avaliadores (confiabilidade inter e intra-avaliador) devem ser claramente especificados). QS10 – Cegamento (Os detalhes sobre o cegamento dos operadores, avaliadores de desfechos e estatísticos devem ser claramente especificados). QS11 –Análise estatística (Os detalhes sobre o programa de software usado e a análise estatística devem ser claramente especificados). QS12 Apresentação dos resultados (O desfecho deve ser baseado nos objetivos predefinidos. Todos os dados devem ser adequadamente tabulados, com os dados de linha de base claramente especificados). Para essa avaliação foi considerado as seguintes respostas: adequadamente especificado (2 pontos), inadequadamente especificado (1 ponto) e não especificado (0 pontos).

Tabela 5 – Avaliação do risco de viés dos estudos *in vitro* pela ferramenta QUINT TOOL (continuação).

Estudos	QS1	QS2	QS3	QS4	QS5	QS6	QS7	QS8	QS9	QS10	QS11	QS12	Viés
Buzzella et al., 2019 ¹⁴⁹	2	2	2	2	2	0	0	2	0	0	2	2	Médio risco
Kumar et al., 2020 ¹⁴²	2	0	1	2	1	0	0	1	0	0	2	2	Alto risco
Qin et al., 2018 ¹⁸⁰	2	1	1	2	2	0	0	2	0	0	2	2	Médio risco
Lauenstein et al., 2014 ¹⁵⁰	2	0	2	2	1	0	0	1	0	0	2	2	Médio risco
Funch et al., 2023 ¹⁷³	2	1	1	2	2	0	0	2	0	0	2	2	Médio risco

Legenda: QS1 - Objetivos claramente declarados (o estudo deve declarar claramente os objetivos, que devem ser seguidos ao longo do estudo). QS2- Explicação detalhada do cálculo do tamanho da amostra (os detalhes sobre o método pelo qual o tamanho da amostra foi calculado devem ser claramente declarados. Detalhes sobre o programa de software, fórmula e parâmetros usados para o cálculo do tamanho da amostra também devem ser especificado). QS3 - Explicação detalhada da técnica de amostragem (detalhes sobre a população predefinida da qual a amostra foi selecionada. A técnica de amostragem e os critérios de inclusão e exclusão devem ser claramente declarados). QS4 – Detalhes do grupo comparação (Os detalhes do grupo de comparação (controle positivo, controle negativo ou padrão) devem ser claramente especificados). QS5 – Explicação detalhada da metodologia (Clareza do procedimento, método de padronização e detalhes de quaisquer normas universais usadas (se aplicável) devem ser claramente declarados). QS6- Detalhes do operador (O número de operadores e detalhes sobre o treinamento e a calibração dos operadores (confiabilidade inter e intra-operador) devem ser claramente especificados). QS7 – Randomização (Detalhes sobre a geração da sequência e ocultação da alocação devem ser claramente declarados). QS8 – Método de medição dos desfechos (A clareza do procedimento e a justificativa para a escolha do método devem ser declaradas. O método de padronização, juntamente com detalhes de quaisquer normas universais usadas (se aplicável), também deve ser claramente especificado). QS9 – Detalhes do avaliador de desfechos (O número de avaliadores de desfechos e os detalhes sobre o treinamento e a calibração dos avaliadores (confiabilidade inter e intra-avaliador) devem ser claramente especificados). QS10 – Cegamento (Os detalhes sobre o cegamento dos operadores, avaliadores de desfechos e estatísticos devem ser claramente especificados). QS11 –Análise estatística (Os detalhes sobre o programa de software usado e a análise estatística devem ser claramente especificados). QS12 Apresentação dos resultados (O desfecho deve ser baseado nos objetivos predefinidos. Todos os dados devem ser adequadamente tabulados, com os dados de linha de base claramente especificados). Para essa avaliação foi considerado as seguintes respostas: adequadamente especificado (2 pontos), inadequadamente especificado (1 ponto) e não especificado (0 pontos).

Tabela 5 – Avaliação do risco de viés dos estudos *in vitro* pela ferramenta QUINT TOOL (continuação).

Estudos	QS1	QS2	QS3	QS4	QS5	QS6	QS7	QS8	QS9	QS10	QS11	QS12	Viés
Del Bufalo et al., 2011 ¹⁵¹	2	1	2	2	2	0	0	2	0	0	2	2	Médio risco
Hu et al., 2009 ¹⁵²	2	1	2	2	2	0	0	2	0	0	2	2	Médio risco
Yasunaga et al., 2006 ¹⁵³	2	1	1	2	2	0	0	2	0	0	1	2	Médio risco
Neves et al., 2007 ¹⁵⁴	2	1	2	2	1	0	0	1	0	0	2	2	Médio risco
Kobets et al., 2019 ¹⁵⁵	2	1	2	2	1	0	0	1	0	0	2	2	Médio risco

Legenda: QS1 - Objetivos claramente declarados (o estudo deve declarar claramente os objetivos, que devem ser seguidos ao longo do estudo). QS2- Explicação detalhada do cálculo do tamanho da amostra (os detalhes sobre o método pelo qual o tamanho da amostra foi calculado devem ser claramente declarados. Detalhes sobre o programa de software, fórmula e parâmetros usados para o cálculo do tamanho da amostra também devem ser especificado). QS3 - Explicação detalhada da técnica de amostragem (detalhes sobre a população predefinida da qual a amostra foi selecionada. A técnica de amostragem e os critérios de inclusão e exclusão devem ser claramente declarados). QS4 – Detalhes do grupo comparação (Os detalhes do grupo de comparação (controle positivo, controle negativo ou padrão) devem ser claramente especificados). QS5 – Explicação detalhada da metodologia (Clareza do procedimento, método de padronização e detalhes de quaisquer normas universais usadas (se aplicável) devem ser claramente declarados). QS6- Detalhes do operador (O número de operadores e detalhes sobre o treinamento e a calibração dos operadores (confiabilidade inter e intra-operador) devem ser claramente especificados). QS7 – Randomização (Detalhes sobre a geração da sequência e ocultação da alocação devem ser claramente declarados). QS8 – Método de medição dos desfechos (A clareza do procedimento e a justificativa para a escolha do método devem ser declaradas. O método de padronização, juntamente com detalhes de quaisquer normas universais usadas (se aplicável), também deve ser claramente especificado). QS9 – Detalhes do avaliador de desfechos (O número de avaliadores de desfechos e os detalhes sobre o treinamento e a calibração dos avaliadores (confiabilidade inter e intra-avaliador) devem ser claramente especificados). QS10 – Cegamento (Os detalhes sobre o cegamento dos operadores, avaliadores de desfechos e estatísticos devem ser claramente especificados). QS11 –Análise estatística (Os detalhes sobre o programa de software usado e a análise estatística devem ser claramente especificados). QS12 Apresentação dos resultados (O desfecho deve ser baseado nos objetivos predefinidos. Todos os dados devem ser adequadamente tabulados, com os dados de linha de base claramente especificados). Para essa avaliação foi considerado as seguintes respostas: adequadamente especificado (2 pontos), inadequadamente especificado (1 ponto) e não especificado (0 pontos).

Tabela 5 – Avaliação do risco de viés dos estudos *in vitro* pela ferramenta QUINT TOOL (continuação).

Estudos	QS1	QS2	QS3	QS4	QS5	QS6	QS7	QS8	QS9	QS10	QS11	QS12	Viés
de Ávila et al., 2019 ¹⁵⁶	2	2	2	2	2	0	0	2	0	0	2	2	Médio risco
Karri et al., 2021 ¹⁵⁷	2	1	1	2	1	0	0	1	0	0	2	2	Médio risco
Lee et al., 2015 ¹⁸⁴	2	1	1	2	1	0	0	1	0	0	2	2	Médio risco
Kashima et al., 1996 ¹⁷⁸	2	1	2	2	2	0	0	2	0	0	2	2	Médio risco
Babich et al., 1992 ⁵²	2	1	1	2	1	0	0	1	0	0	1	2	Alto risco

Legenda: QS1 - Objetivos claramente declarados (o estudo deve declarar claramente os objetivos, que devem ser seguidos ao longo do estudo). QS2- Explicação detalhada do cálculo do tamanho da amostra (os detalhes sobre o método pelo qual o tamanho da amostra foi calculado devem ser claramente declarados. Detalhes sobre o programa de software, fórmula e parâmetros usados para o cálculo do tamanho da amostra também devem ser especificado). QS3 - Explicação detalhada da técnica de amostragem (detalhes sobre a população predefinida da qual a amostra foi selecionada. A técnica de amostragem e os critérios de inclusão e exclusão devem ser claramente declarados). QS4 – Detalhes do grupo comparação (Os detalhes do grupo de comparação (controle positivo, controle negativo ou padrão) devem ser claramente especificados). QS5 – Explicação detalhada da metodologia (Clareza do procedimento, método de padronização e detalhes de quaisquer normas universais usadas (se aplicável) devem ser claramente declarados). QS6- Detalhes do operador (O número de operadores e detalhes sobre o treinamento e a calibração dos operadores (confiabilidade inter e intra-operador) devem ser claramente especificados). QS7 – Randomização (Detalhes sobre a geração da sequência e ocultação da alocação devem ser claramente declarados). QS8 – Método de medição dos desfechos (A clareza do procedimento e a justificativa para a escolha do método devem ser declaradas. O método de padronização, juntamente com detalhes de quaisquer normas universais usadas (se aplicável), também deve ser claramente especificado). QS9 – Detalhes do avaliador de desfechos (O número de avaliadores de desfechos e os detalhes sobre o treinamento e a calibração dos avaliadores (confiabilidade inter e intra-avaliador) devem ser claramente especificados). QS10 – Cegamento (Os detalhes sobre o cegamento dos operadores, avaliadores de desfechos e estatísticos devem ser claramente especificados). QS11 –Análise estatística (Os detalhes sobre o programa de software usado e a análise estatística devem ser claramente especificados). QS12 Apresentação dos resultados (O desfecho deve ser baseado nos objetivos predefinidos. Todos os dados devem ser adequadamente tabulados, com os dados de linha de base claramente especificados). Para essa avaliação foi considerado as seguintes respostas: adequadamente especificado (2 pontos), inadequadamente especificado (1 ponto) e não especificado (0 pontos).

Tabela 5 – Avaliação do risco de viés dos estudos *in vitro* pela ferramenta QUINT TOOL (continuação).

Estudos	QS1	QS2	QS3	QS4	QS5	QS6	QS7	QS8	QS9	QS10	QS11	QS12	Viés
Garrigue et al., 2006 ⁵⁶	2	1	1	2	1	0	0	1	0	0	1	2	Alto Risco
Gibson et al., 2015 ¹⁵⁸	2	1	1	2	1	0	0	1	0	0	2	2	Médio risco
Farrell et al., 2008 ¹⁷⁵	2	1	1	2	1	0	0	1	0	0	1	1	Alto risco
Goyal et al., 2015 ¹⁵⁹	2	2	2	2	2	0	0	2	0	0	2	2	Médio risco
Frombach et al., 2018 ¹⁶⁰	2	1	1	2	1	0	0	1	0	0	2	2	Médio risco

Legenda: QS1 - Objetivos claramente declarados (o estudo deve declarar claramente os objetivos, que devem ser seguidos ao longo do estudo). QS2- Explicação detalhada do cálculo do tamanho da amostra (os detalhes sobre o método pelo qual o tamanho da amostra foi calculado devem ser claramente declarados. Detalhes sobre o programa de software, fórmula e parâmetros usados para o cálculo do tamanho da amostra também devem ser especificado). QS3 - Explicação detalhada da técnica de amostragem (detalhes sobre a população predefinida da qual a amostra foi selecionada. A técnica de amostragem e os critérios de inclusão e exclusão devem ser claramente declarados). QS4 – Detalhes do grupo comparação (Os detalhes do grupo de comparação (controle positivo, controle negativo ou padrão) devem ser claramente especificados). QS5 – Explicação detalhada da metodologia (Clareza do procedimento, método de padronização e detalhes de quaisquer normas universais usadas (se aplicável) devem ser claramente declarados). QS6- Detalhes do operador (O número de operadores e detalhes sobre o treinamento e a calibração dos operadores (confiabilidade inter e intra-operador) devem ser claramente especificados). QS7 – Randomização (Detalhes sobre a geração da sequência e ocultação da alocação devem ser claramente declarados). QS8 – Método de medição dos desfechos (A clareza do procedimento e a justificativa para a escolha do método devem ser declaradas. O método de padronização, juntamente com detalhes de quaisquer normas universais usadas (se aplicável), também deve ser claramente especificado). QS9 – Detalhes do avaliador de desfechos (O número de avaliadores de desfechos e os detalhes sobre o treinamento e a calibração dos avaliadores (confiabilidade inter e intra-avaliador) devem ser claramente especificados). QS10 – Cegamento (Os detalhes sobre o cegamento dos operadores, avaliadores de desfechos e estatísticos devem ser claramente especificados). QS11 –Análise estatística (Os detalhes sobre o programa de software usado e a análise estatística devem ser claramente especificados). QS12 Apresentação dos resultados (O desfecho deve ser baseado nos objetivos predefinidos. Todos os dados devem ser adequadamente tabulados, com os dados de linha de base claramente especificados). Para essa avaliação foi considerado as seguintes respostas: adequadamente especificado (2 pontos), inadequadamente especificado (1 ponto) e não especificado (0 pontos).

Tabela 5 – Avaliação do risco de viés dos estudos *in vitro* pela ferramenta QUINT TOOL (continuação).

Estudos	QS1	QS2	QS3	QS4	QS5	QS6	QS7	QS8	QS9	QS10	QS11	QS12	Viés
Chung et al., 1995 ¹⁸	2	1	1	2	1	0	0	1	0	0	1	2	Alto risco
Zeller et al., 2013 ¹⁶¹	2	2	2	2	2	0	0	2	0	0	2	2	Médio risco
Reena et al., 2015 ¹⁶²	2	1	2	2	1	0	0	1	0	0	2	2	Médio risco
Huang et al., 2011 ¹⁶³	2	1	1	2	2	0	0	2	0	0	2	2	Médio risco
Lee et al., 2013 ¹⁶⁴	2	1	1	2	1	0	0	1	0	0	2	2	Médio risco

Legenda: QS1 - Objetivos claramente declarados (o estudo deve declarar claramente os objetivos, que devem ser seguidos ao longo do estudo). QS2- Explicação detalhada do cálculo do tamanho da amostra (os detalhes sobre o método pelo qual o tamanho da amostra foi calculado devem ser claramente declarados. Detalhes sobre o programa de software, fórmula e parâmetros usados para o cálculo do tamanho da amostra também devem ser especificado). QS3 - Explicação detalhada da técnica de amostragem (detalhes sobre a população predefinida da qual a amostra foi selecionada. A técnica de amostragem e os critérios de inclusão e exclusão devem ser claramente declarados). QS4 – Detalhes do grupo comparação (Os detalhes do grupo de comparação (controle positivo, controle negativo ou padrão) devem ser claramente especificados). QS5 – Explicação detalhada da metodologia (Clareza do procedimento, método de padronização e detalhes de quaisquer normas universais usadas (se aplicável) devem ser claramente declarados). QS6- Detalhes do operador (O número de operadores e detalhes sobre o treinamento e a calibração dos operadores (confiabilidade inter e intra-operador) devem ser claramente especificados). QS7 – Randomização (Detalhes sobre a geração da sequência e ocultação da alocação devem ser claramente declarados). QS8 – Método de medição dos desfechos (A clareza do procedimento e a justificativa para a escolha do método devem ser declaradas. O método de padronização, juntamente com detalhes de quaisquer normas universais usadas (se aplicável), também deve ser claramente especificado). QS9 – Detalhes do avaliador de desfechos (O número de avaliadores de desfechos e os detalhes sobre o treinamento e a calibração dos avaliadores (confiabilidade inter e intra-avaliador) devem ser claramente especificados). QS10 – Cegamento (Os detalhes sobre o cegamento dos operadores, avaliadores de desfechos e estatísticos devem ser claramente especificados). QS11 –Análise estatística (Os detalhes sobre o programa de software usado e a análise estatística devem ser claramente especificados). QS12 Apresentação dos resultados (O desfecho deve ser baseado nos objetivos predefinidos. Todos os dados devem ser adequadamente tabulados, com os dados de linha de base claramente especificados). Para essa avaliação foi considerado as seguintes respostas: adequadamente especificado (2 pontos), inadequadamente especificado (1 ponto) e não especificado (0 pontos).

Tabela 5 – Avaliação do risco de viés dos estudos *in vitro* pela ferramenta QUINT TOOL (continuação).

Estudos	QS1	QS2	QS3	QS4	QS5	QS6	QS7	QS8	QS9	QS10	QS11	QS12	Viés
Lee et al., 2014 ¹⁶⁵	2	1	1	2	1	0	0	1	0	0	2	2	Médio risco
Skazi et al., 2008 ¹⁸³	2	1	2	2	1	0	0	1	0	0	1	1	Alto risco
Woo et al., 2021 ¹⁶⁶	2	1	2	2	1	0	0	1	0	0	2	2	Médio risco
Meisser et al., 2019 ¹⁸²	2	0	1	2	1	0	0	1	0	0	2	2	Alto risco
Tsujita-Inoue et al., 2014 ¹⁶⁷	2	2	2	2	2	0	0	2	0	0	2	2	Médio risco

Legenda: QS1 - Objetivos claramente declarados (o estudo deve declarar claramente os objetivos, que devem ser seguidos ao longo do estudo). QS2- Explicação detalhada do cálculo do tamanho da amostra (os detalhes sobre o método pelo qual o tamanho da amostra foi calculado devem ser claramente declarados. Detalhes sobre o programa de software, fórmula e parâmetros usados para o cálculo do tamanho da amostra também devem ser especificado). QS3 - Explicação detalhada da técnica de amostragem (detalhes sobre a população predefinida da qual a amostra foi selecionada. A técnica de amostragem e os critérios de inclusão e exclusão devem ser claramente declarados). QS4 – Detalhes do grupo comparação (Os detalhes do grupo de comparação (controle positivo, controle negativo ou padrão) devem ser claramente especificados). QS5 – Explicação detalhada da metodologia (Clareza do procedimento, método de padronização e detalhes de quaisquer normas universais usadas (se aplicável) devem ser claramente declarados). QS6- Detalhes do operador (O número de operadores e detalhes sobre o treinamento e a calibração dos operadores (confiabilidade inter e intra-operador) devem ser claramente especificados). QS7 – Randomização (Detalhes sobre a geração da sequência e ocultação da alocação devem ser claramente declarados). QS8 – Método de medição dos desfechos (A clareza do procedimento e a justificativa para a escolha do método devem ser declaradas. O método de padronização, juntamente com detalhes de quaisquer normas universais usadas (se aplicável), também deve ser claramente especificado). QS9 – Detalhes do avaliador de desfechos (O número de avaliadores de desfechos e os detalhes sobre o treinamento e a calibração dos avaliadores (confiabilidade inter e intra-avaliador) devem ser claramente especificados). QS10 – Cegamento (Os detalhes sobre o cegamento dos operadores, avaliadores de desfechos e estatísticos devem ser claramente especificados). QS11 –Análise estatística (Os detalhes sobre o programa de software usado e a análise estatística devem ser claramente especificados). QS12 Apresentação dos resultados (O desfecho deve ser baseado nos objetivos predefinidos. Todos os dados devem ser adequadamente tabulados, com os dados de linha de base claramente especificados). Para essa avaliação foi considerado as seguintes respostas: adequadamente especificado (2 pontos), inadequadamente especificado (1 ponto) e não especificado (0 pontos).

Tabela 5 – Avaliação do risco de viés dos estudos *in vitro* pela ferramenta QUINT TOOL (continuação).

Estudos	QS1	QS2	QS3	QS4	QS5	QS6	QS7	QS8	QS9	QS10	QS11	QS12	Viés
Seydi et al., 2018 ¹⁶⁸	2	1	2	2	1	0	0	1	0	0	2	2	Médio risco
Zanoni et al., 2015 ¹⁶⁹	2	1	2	2	1	0	0	1	0	0	2	2	Médio risco
Salami et al., 2023 ¹⁷⁰	2	1	2	2	1	0	0	1	0	0	2	2	Médio risco
de Mas et al., 2017 ¹⁷⁴	2	1	1	2	1	0	0	1	0	0	2	2	Médio risco
Krasteva et al., 1993 ⁷⁵	2	1	2	2	1	0	0	1	0	0	2	2	Médio risco

Legenda: QS1 - Objetivos claramente declarados (o estudo deve declarar claramente os objetivos, que devem ser seguidos ao longo do estudo). QS2- Explicação detalhada do cálculo do tamanho da amostra (os detalhes sobre o método pelo qual o tamanho da amostra foi calculado devem ser claramente declarados. Detalhes sobre o programa de software, fórmula e parâmetros usados para o cálculo do tamanho da amostra também devem ser especificado). QS3 - Explicação detalhada da técnica de amostragem (detalhes sobre a população predefinida da qual a amostra foi selecionada. A técnica de amostragem e os critérios de inclusão e exclusão devem ser claramente declarados). QS4 – Detalhes do grupo comparação (Os detalhes do grupo de comparação (controle positivo, controle negativo ou padrão) devem ser claramente especificados). QS5 – Explicação detalhada da metodologia (Clareza do procedimento, método de padronização e detalhes de quaisquer normas universais usadas (se aplicável) devem ser claramente declarados). QS6- Detalhes do operador (O número de operadores e detalhes sobre o treinamento e a calibração dos operadores (confiabilidade inter e intra-operador) devem ser claramente especificados). QS7 – Randomização (Detalhes sobre a geração da sequência e ocultação da alocação devem ser claramente declarados). QS8 – Método de medição dos desfechos (A clareza do procedimento e a justificativa para a escolha do método devem ser declaradas. O método de padronização, juntamente com detalhes de quaisquer normas universais usadas (se aplicável), também deve ser claramente especificado). QS9 – Detalhes do avaliador de desfechos (O número de avaliadores de desfechos e os detalhes sobre o treinamento e a calibração dos avaliadores (confiabilidade inter e intra-avaliador) devem ser claramente especificados). QS10 – Cegamento (Os detalhes sobre o cegamento dos operadores, avaliadores de desfechos e estatísticos devem ser claramente especificados). QS11 –Análise estatística (Os detalhes sobre o programa de software usado e a análise estatística devem ser claramente especificados). QS12 Apresentação dos resultados (O desfecho deve ser baseado nos objetivos predefinidos. Todos os dados devem ser adequadamente tabulados, com os dados de linha de base claramente especificados). Para essa avaliação foi considerado as seguintes respostas: adequadamente especificado (2 pontos), inadequadamente especificado (1 ponto) e não especificado (0 pontos).

Tabela 5 – Avaliação do risco de viés dos estudos *in vitro* pela ferramenta QUINT TOOL (continuação).

Estudos	QS1	QS2	QS3	QS4	QS5	QS6	QS7	QS8	QS9	QS10	QS11	QS12	Viés
Wang et al., 2022 ¹⁸¹	2	1	1	2	1	0	0	1	0	0	2	2	Médio risco
OH et al., 2018 ¹⁷⁹	2	1	1	2	1	0	0	1	0	0	2	2	Médio risco
De Boeck et al., 2015 ¹⁷²	2	1	1	2	1	0	0	1	0	0	2	2	Médio risco
Sassa et al., 2021 ¹⁷¹	2	1	2	2	1	0	0	1	0	0	2	2	Médio risco

Legenda: QS1 - Objetivos claramente declarados (o estudo deve declarar claramente os objetivos, que devem ser seguidos ao longo do estudo). QS2- Explicação detalhada do cálculo do tamanho da amostra (os detalhes sobre o método pelo qual o tamanho da amostra foi calculado devem ser claramente declarados. Detalhes sobre o programa de software, fórmula e parâmetros usados para o cálculo do tamanho da amostra também devem ser especificado). QS3 - Explicação detalhada da técnica de amostragem (detalhes sobre a população predefinida da qual a amostra foi selecionada. A técnica de amostragem e os critérios de inclusão e exclusão devem ser claramente declarados). QS4 – Detalhes do grupo comparação (Os detalhes do grupo de comparação (controle positivo, controle negativo ou padrão) devem ser claramente especificados). QS5 – Explicação detalhada da metodologia (Clareza do procedimento, método de padronização e detalhes de quaisquer normas universais usadas (se aplicável) devem ser claramente declarados). QS6- Detalhes do operador (O número de operadores e detalhes sobre o treinamento e a calibração dos operadores (confiabilidade inter e intra-operador) devem ser claramente especificados). QS7 – Randomização (Detalhes sobre a geração da sequência e ocultação da alocação devem ser claramente declarados). QS8 – Método de medição dos desfechos (A clareza do procedimento e a justificativa para a escolha do método devem ser declaradas. O método de padronização, juntamente com detalhes de quaisquer normas universais usadas (se aplicável), também deve ser claramente especificado). QS9 – Detalhes do avaliador de desfechos (O número de avaliadores de desfechos e os detalhes sobre o treinamento e a calibração dos avaliadores (confiabilidade inter e intra-avaliador) devem ser claramente especificados). QS10 – Cegamento (Os detalhes sobre o cegamento dos operadores, avaliadores de desfechos e estatísticos devem ser claramente especificados). QS11 –Análise estatística (Os detalhes sobre o programa de software usado e a análise estatística devem ser claramente especificados). QS12 Apresentação dos resultados (O desfecho deve ser baseado nos objetivos predefinidos. Todos os dados devem ser adequadamente tabulados, com os dados de linha de base claramente especificados). Para essa avaliação foi considerado as seguintes respostas: adequadamente especificado (2 pontos), inadequadamente especificado (1 ponto) e não especificado (0 pontos).

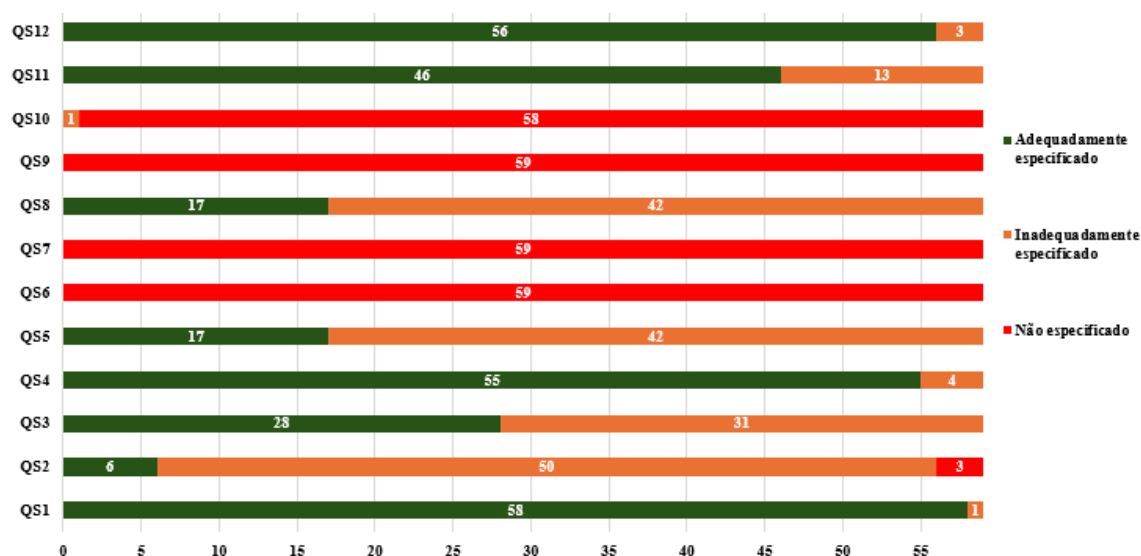


Figura 4. Resultado da análise do risco de viés dos estudos *in vitro* – QUIN TOOL.

QS1 - Objetivos claramente declarados (o estudo deve declarar claramente os objetivos, que devem ser seguidos ao longo do estudo). QS2- Explicação detalhada do cálculo do tamanho da amostra (os detalhes sobre o método pelo qual o tamanho da amostra foi calculado devem ser claramente declarados. Detalhes sobre o programa de software, fórmula e parâmetros usados para o cálculo do tamanho da amostra também devem ser especificado). QS3 - Explicação detalhada da técnica de amostragem (detalhes sobre a população predefinida da qual a amostra foi selecionada. A técnica de amostragem e os critérios de inclusão e exclusão devem ser claramente declarados). QS4 – Detalhes do grupo comparação (Os detalhes do grupo de comparação (controle positivo, controle negativo ou padrão) devem ser claramente especificados). QS5 – Explicação detalhada da metodologia (Clareza do procedimento, método de padronização e detalhes de quaisquer normas universais usadas (se aplicável) devem ser claramente declarados). QS6- Detalhes do operador (O número de operadores e detalhes sobre o treinamento e a calibração dos operadores (confiabilidade inter e intra-operador) devem ser claramente especificados). QS7 – Randomização (Detalhes sobre a geração da sequência e ocultação da alocação devem ser claramente declarados). QS8 – Método de medição dos desfechos (A clareza do procedimento e a justificativa para a escolha do método devem ser declaradas. O método de padronização, juntamente com detalhes de quaisquer normas universais usadas (se aplicável), também deve ser claramente especificado). QS9 – Detalhes do avaliador de desfechos (O número de avaliadores de desfechos e os detalhes sobre o treinamento e a calibração dos avaliadores (confiabilidade inter e intra-avaliador) devem ser claramente especificados). QS10 – Cegamento (Os detalhes sobre o cegamento dos operadores, avaliadores de desfechos e estatísticos devem ser claramente especificados). QS11 –Análise estatística (Os detalhes sobre o programa de software usado e a análise estatística devem ser claramente especificados). QS12 Apresentação dos resultados (O desfecho deve ser baseado nos objetivos predefinidos. Todos os dados devem ser adequadamente tabulados, com os dados de linha de base claramente especificados). Para essa avaliação foi considerado as seguintes respostas: adequadamente especificado (2 pontos), inadequadamente especificado (1 ponto) e não especificado (0 pontos).

Na avaliação do parâmetro QS1 (objetivos claramente declarados), cinquenta e oito artigos deixaram claro os objetivos^{16,18,30,34,36,37,52,53,56,64,69,73,75,79,118,142,143,145–184}. Apenas um artigo apresentou esse item como inadequadamente especificado (1 ponto), e

acabou sendo utilizado o contexto geral da introdução para identificar o objetivo do estudo¹⁴⁴. Na avaliação de Qs2 (explicação detalhada do cálculo do tamanho da amostra), três artigos não especificaram como foi feito o cálculo do tamanho da amostra^{142,150,182}. Cinquenta artigos apresentaram de maneira inadequadamente especificada os métodos do cálculo do tamanho da amostra, software, fórmula e parâmetros usados^{16,18,30,34,36,37,52,53,56,64,69,73,75,79,118,143–147,151–155,157,160,162–167,169–181,183,184}. A presença da densidade celular foi considerada como um demonstrativo do cálculo do tamanho da amostra. Seis artigos realizaram especificaram de forma adequada o métodos de cálculo, tamanho da amostra, software, fórmula e parâmetros usados. Nesse ponto o relato do crescimento celular confluyente foi considerado como descrição adequada de tamanho da amostra^{117,149,156,159,161,167}.

Na avaliação de QS3 (explicação detalhada da técnica de amostragem), vinte e oito artigos apresentaram detalhes da população, qual a amostra foi selecionada, técnica de amostragem e os critérios de inclusão e exclusão^{16,34,36,75,117,143–145,147–152,154–156,159,161,162,166–171,178,183}. Nessa etapa foi considerado como detalhamento adequado o relato de uso de confluência celular e estudo em triplicatas com a presença de detalhes estatísticos como descrição do erro padrão. Trinta e um artigos apresentaram de forma inadequadamente especificada os fatores de inclusão e exclusão dos estudos^{18,30,37,52,53,56,64,69,73,79,118,142,146,153,157,158,160,163–165,172–177,179–182,184}. No domínio QS4 (detalhes do grupo de comparação), quatro estudos não apresentaram no texto quais foram os grupos de tratamento^{53,146,147,177}. Cinquenta e cinco descreveram de forma adequada^{16,18,30,34,36,37,52,56,64,69,73,75,79,117,118,142–145,148–159,161–176,178–184}.

Os itens QS5 (explicação detalhada da metodologia) e QS8 (método de medição dos desfechos) buscam avaliar a clareza dos procedimentos, a justificativa da escolha do método, métodos de padronização e detalhes de normas universais utilizadas. Apenas dezessete artigos apresentaram de forma adequada a padronização e justificativa dos métodos usados para avaliação dos desfechos^{117,145,148,149,151–153,156,159,161,163,167,173,177,178,180}. Quarentena e dois artigos apresentaram de forma inadequadamente especificada a maneira que os testes foram padronizados para a medição dos desfechos^{16,18,30,34,36,52,53,56,64,69,75,79,118,142–144,146,147,150,154,155,157–160,162,164–166,168–172,174–177,179,181–184}.

Os itens QS6 (detalhes do operador) e QS9 (detalhes do avaliador de desfechos) buscavam avaliar se o número de operadores ou avaliadores e detalhes sobre o

treinamento e a calibração dos operadores ou avaliadores (confiabilidade inter e intra-operador) estavam descritos no trabalho. Nenhum dos artigos incluídos nessa revisão apresentaram esses dados^{16,18,30,34,36,37,52,53,56,64,69,75,79,117,118,142,143,145–147,149–184}, sendo ausente quaisquer dados envolvendo a quantidade de operadores ou avaliadores, como ocorreu o treinamento e calibração dos operadores e avaliadores.

O item QS7 (randomização) buscava avaliar se a geração da sequência e ocultação da alocação foram especificadas. Todos os artigos apresentaram esses dados de maneira inadequadamente especificada, pois estavam ausentes quaisquer dados envolvendo a randomização experimental^{16,18,30,34,36,37,52,53,56,64,69,75,79,117,118,142,143,145–147,149–184}. O QS10 busca avaliar o cegamento dos operadores, avaliadores de desfechos e estatísticos. Apenas um artigo apresentou essa informação de maneira inadequadamente especificada, pois foi informado que o avaliador dos testes foi cegado durante o experimento, não revelando a forma como ocorreu, apenas citando esse fato⁶⁴. Os outros cinquenta e oito artigos não apresentaram informações sobre o cegamento^{16,18,30,34,36,37,52,53,56,69,75,79,117,118,142,143,145–147,149–184}.

No item QS11 (análise estatística), treze artigos relataram o programa de software usado e a análise estatística de forma inadequadamente especificada^{18,37,52,56,69,73,144,146,147,153,175,182,183}, e quarenta e seis apresentaram esses dados de maneira adequada^{16,30,34,36,53,64,75,79,117,118,142,143,145,148–152,154–174,176–181,184}. Por fim, no QS12 (apresentação dos resultados) buscava avaliar se os desfecho estavam baseados nos objetivos predefinidos, e se todos os dados estavam adequadamente tabulados, com os dados de linha de base claramente especificados. Cinquenta e seis artigos realizaram a apresentação dos resultados de forma adequada^{16,18,30,34,36,37,52,53,56,64,69,75,79,117,118,142,143,145–147,149–174,176–182,184}. Apenas três artigos foram considerados com apresentação inadequados dados, um por não ter apresentado os objetivos claramente¹⁴⁴, e dois por informar a presença de dados ausentes no texto, sem maiores informações^{175,183}.

5.4.3 ENSAIOS CLÍNICOS NÃO RANDOMIZADOS

Foram inclusos nessa revisão seis artigos classificados como ensaios clínicos não randomizados. Nessa etapa foi utilizada a ferramenta ROBINS-I para realizar a avaliação do risco de viés desses artigos¹²⁵. A ferramenta é separada em sete domínios de análise,

sendo os pontos de avaliação: viés de confundimento, viés na seleção dos participantes, viés na classificação das intervenções, viés de intervenções pretendidas, viés devido a dados faltantes, viés na medição dos desfechos e viés na seleção dos resultados reportados¹²⁵. A partir da realização da análise desses domínios, foi utilizado a ferramenta “*robvis tool*” para a geração da imagem de resumo dos resultados¹²⁵. A análise de cada artigo é apresentada a seguir.

Tabela 6. Risco de viés devido a fatores de confusão dos ensaios clínicos incluídos na revisão (continua).

Domínios da avaliação do risco de viés		Estudos					
		Blömeke et al., 2008 ¹³¹	Jowsey et al., 2006 ¹²⁸	Lis et al., 1998 ¹²⁹	Skazik et al., 2008 ¹⁸³	Meisser et al., 2019 ¹⁸²	Basketter et al., 2016 ¹³⁰
QS1 - Viés devido a fatores de confusão	1.1	PN	PN	PN	PS	PN	PN
	1.2	NA	NA	NA	NI	NA	NA
	1.3	NA	NA	NA	N	NA	NA
	1.4	NA	NA	NA	NI	NA	NA
	1.5	NA	NA	NA	NI	NA	NA
	1.6	NA	NA	NA	NI	NA	NA
	1.7	NA	NA	NA	NI	NA	NA
	1.8	NA	NA	NA	NI	NA	NA
	Risco de viés	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco	Médio risco	Baixo risco	Baixo risco
QS2 - Viés na seleção de participantes para o estudo	2.1	N	N	N	N	N	N
	2.2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	2.3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	2.4	S	S	S	S	S	S
	2.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Risco de viés	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco
QS3 - Viés na classificação das intervenções	3.1	S	S	S	S	S	S
	3.2	S	S	S	S	S	S
	3.3	PN	PN	PN	PN	PN	PN
	Risco de viés	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco

Legenda: 1.1 Existe potencial de confusão do efeito da intervenção neste estudo? 1.2 A análise foi baseada na divisão do tempo de acompanhamento dos participantes de acordo com a intervenção recebida? 1.3 As descontinuações ou mudanças na intervenção foram provavelmente relacionadas a fatores que são prognósticos para o desfecho? 1.4 Os autores utilizaram um método de análise apropriado que controlou todos os domínios importantes de confusão? 1.5 Se a resposta for 'Sim' ou 'Provavelmente sim' para 1.4: Os domínios de confusão que foram controlados foram medidos de maneira válida e confiável pelas variáveis disponíveis neste estudo? 1.6 Os autores controlaram alguma variável pós-intervenção que poderia ter sido afetada pela intervenção? 1.7 Os autores usaram um método de análise apropriado que ajustou todos os domínios importantes de confusão e para confusão que varia ao longo do tempo? 1.8 Se a resposta for 'Sim' ou 'Provavelmente sim' para 1.7: Os domínios de confusão que foram ajustados foram medidos de maneira válida e confiável pelas variáveis disponíveis neste estudo? A sequência de alocação foi gerada e aplicada adequadamente? 2.1. A seleção de participantes para o estudo (ou para a análise) foi baseada em características dos participantes observadas após o início da intervenção? Se 'Não' ou 'Provavelmente não' para 2.1, vá para 2.4. 2.2. Se 'Sim' ou 'Provavelmente sim' para 2.1: As variáveis pós-intervenção que influenciaram a seleção provavelmente estavam associadas à intervenção? 2.3. Se 'Sim' ou 'Provavelmente sim' para 2.2: As variáveis pós-intervenção que influenciaram a seleção provavelmente foram influenciadas pelo desfecho ou por uma causa do desfecho? 2.4. O início do acompanhamento e o início da intervenção coincidem para a maioria dos participantes? 2.5. Se 'Sim' ou 'Provavelmente sim' para 2.2 e 2.3, ou 'Não' ou 'Provavelmente não' para 2.4: Foram utilizadas técnicas de ajuste que provavelmente corrigem a presença de vieses de seleção? 3.1. Os grupos de intervenção foram claramente definidos? 3.2. As informações usadas para definir os grupos de intervenção foram registradas no início da intervenção? 3.3. A classificação do status da intervenção poderia ter sido afetada pelo conhecimento do desfecho ou do risco do desfecho? Para cada pergunta, as possíveis respostas são: Sim (S), Provavelmente Sim (PS), Não (N), Provavelmente Não (PN), Não Informado (NI) e Não aplicado (NA).

Tabela 6 – Risco de viés devido a fatores de confusão dos ensaios clínicos incluídos na revisão (continuação).

Domínios da avaliação do risco de viés		Estudos					
		Blömeke et al., 2008 ¹³¹	Jowsey et al., 2006 ¹²⁸	Lis et al., 1998 ¹²⁹	Skazik et al., 2008 ¹⁸³	Meisser et al., 2019 ¹⁸²	Basketter et al., 2016 ¹³⁰
QS4 - Viés devido a desvios das intervenções planejadas	4.1	N	N	N	N	N	N
	4.2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	4.3	S	S	S	S	S	S
	4.4	S	S	S	S	S	S
	4.5	S	S	S	S	S	S
	4.6	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Risco de viés	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco
QS5 - Viés devido a dados ausentes	5.1	S	S	S	S	S	S
	5.2	N	N	N	N	N	N
	5.3	N	N	N	N	N	N
	5.4	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	5.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Risco de viés	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco
QS6 - Viés na mensuração dos desfechos	6.1	PN	PN	PN	PN	PN	PN
	6.2	PN	PN	PN	PN	PN	PN
	6.3	S	S	S	S	S	S
	6.4	PN	PN	PN	PN	PN	PN
	Risco de viés	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco
QS7 - Viés na seleção do resultado relatado	7.1	PN	PN	PN	PN	PN	PN
	7.2	PN	PN	PN	PN	PN	PN
	7.3	PN	PN	PN	PN	PN	PN
	Risco de viés	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco

Legenda: 4.1. Houve desvios da intervenção planejada além do que seria esperado na prática usual? 4.2. Se 'Sim' ou 'Provavelmente sim' para 4.1: Esses desvios da intervenção planejada foram desequilibrados entre os grupos e provavelmente afetaram o desfecho? 4.3. Co-intervenções importantes foram equilibradas entre os grupos de intervenção? 4.4. A intervenção foi implementada com sucesso para a maioria dos participantes? 4.5. Os participantes do estudo aderiram ao regime de intervenção atribuído? 4.6. Se 'Não' ou 'Provavelmente não' para 4.3, 4.4 ou 4.5: Foi utilizada uma análise apropriada para estimar o efeito de iniciar e aderir à intervenção? 5.1. Os dados de desfecho estavam disponíveis para todos ou quase todos os participantes? 5.2. Participantes foram excluídos devido a dados ausentes sobre o status da intervenção? 5.3. Participantes foram excluídos devido a dados ausentes em outras variáveis necessárias para a análise? 5.4. Se 'Provavelmente não' ou 'Não' para 5.1, ou 'Sim' ou 'Provavelmente sim' para 5.2 ou 5.3: As proporções de participantes e os motivos para os dados ausentes são similares entre as intervenções? 5.5. Se 'Provavelmente não' ou 'Não' para 5.1, ou 'Sim' ou 'Provavelmente sim' para 5.2 ou 5.3: Há evidências de que os resultados foram robustos à presença de dados ausentes? 6.1. A mensuração do desfecho poderia ter sido influenciada pelo conhecimento da intervenção recebida? 6.2. Os avaliadores dos desfechos estavam cientes da intervenção recebida pelos participantes do estudo? 6.3. Os métodos de avaliação dos desfechos foram comparáveis entre os grupos de intervenção? 6.4. Houve algum erro sistemático na mensuração do desfecho relacionado à intervenção recebida? 7.1 múltiplas mensurações de desfecho dentro do domínio do desfecho? 7.2 múltiplas análises da relação intervenção-desfecho? 7.3. diferentes subgrupos? Para cada pergunta, as possíveis respostas são: Sim (S), Provavelmente Sim (PS), Não (N), Provavelmente Não (PN), Não Informado (NI) e Não aplicado (NA).

No domínio 1 de avaliação do viés devido a fatores de confundimento, cinco artigos foram classificados como baixo risco^{128-131,182} e um como moderado¹⁸³. Todos os estudos marcados como baixo risco de viés tiveram como resposta à pergunta “Existe potencial de confusão do efeito da intervenção neste estudo?” Provavelmente Não (PN). Os estudos foram considerados dessa maneira pois não apresentaram explicitamente um potencial de confusão claro durante o estudo, as intervenções foram bem controladas, composto testados foram aplicados de maneira padronizada e controladas de acordo com o protocolo do estudo, sem divisão do acampamento e intervenções ao longo do tempo, sem descontinuidades ou mudanças de intervenções^{128-131,182}. O estudo marcado como risco moderado de viés investigava pacientes com histórico de DAC devido a exposição a PPD, o que poderia gerar fatores de confusão já que as reações não podiam ser atribuídas apenas a PPD, também não estavam presentes a divisão do tempo de acompanhamento da intervenção ou descontinuações ou mudanças na intervenção¹⁸³.

No domínio 2 de avaliação viés na seleção de participantes para o estudo todos os estudos foram considerados de baixo risco de viés.^{128-131,182,183}. Na pergunta “a seleção de participantes para o estudo (ou para a análise) foi baseada em características dos participantes observadas após o início da intervenção?” foi respondida como “Não” e a pergunta “Foram utilizadas técnicas de ajuste que provavelmente corrigem a presença de vieses de seleção?” foi respondida como “Sim”^{128-131,182,183}. Ambos os estudos não apresentaram mudanças na seleção dos participantes após o inícios das intervenções, a seleção ocorreu a partir de características pré-existent e não características observadas durante as intervenções, não existiu indícios de que a seleção poderia ter sido influenciada após o início da intervenção, a intervenção foi aplicada de acordo com o protocolo do estudo, o início do acompanhamento e da intervenção coincidiram para todos os participante^{128-131,182,183}.

No domínio 3 de avaliação do viés na classificação das intervenções todos os estudos foram selecionados como baixo risco de viés^{128-131,182,183}. Na pergunta “Os grupos de intervenção foram claramente definidos?” todos os estudos foram respondidos com Sim^{128-131,182,183}. Na pergunta “As informações usadas para definir os grupos de intervenção foram registradas no início da intervenção?” todos os estudos foram respondidos com Sim^{128-131,182,183}. Na terceira pergunta “A classificação do status da intervenção poderia ter sido afetada pelo conhecimento do desfecho ou do risco do desfecho?” todos os estudos foram respondidos com Provavelmente Não^{128-131,182,183}. Em

todos os casos os grupos de intervenção foram claramente definidos, com as reações monitoras de forma padronizada e de acordo com o especificado no protocolo que trazia qual intervenção cada grupo usaria^{128-131,182,183}. E por fim, não há indicações de que o conhecimento do desfecho tenha influenciado a classificação da intervenção, já que o protocolo foi padronizado e as reações foram monitoradas de forma direta, sem viés relacionado ao conhecimento dos resultados^{128-131,182,183}.

No domínio 4 de Viés devido a desvios das intervenções planejadas, todos os artigos foram classificados com baixo risco de viés^{128-131,182,183}. A pergunta “Houve desvios da intervenção planejada além do que seria esperado na prática usual?” foi respondida como “não”^{128-131,182,183}. As perguntas “Co-intervenções importantes foram equilibradas entre os grupos de intervenção?”, “A intervenção foi implementada com sucesso para a maioria dos participantes?” e “Os participantes do estudo aderiram ao regime de intervenção atribuído?” foram respondidas como “sim”^{128-131,182,183}. Os artigos pontuam que as intervenções foram conduzidas de maneira controlada, com aplicação precisa das formulações nas áreas designadas, sem menção de desvios durante o experimento significativos ou co-intervenções desequilibradas^{128-131,182,183}. E por fim, Não houve problemas de adesão, e os participantes seguiram o protocolo estabelecido^{128-131,182,183}.

No domínio 5 de avaliação de viés devido a dados ausentes, todos os estudos foram classificados como baixo risco de viés^{128-131,182,183}. A pergunta “Os dados de desfecho estavam disponíveis para todos ou quase todos os participantes?” foi respondida como “sim”^{128-131,182,183}. As perguntas “Participantes foram excluídas devido a dados ausentes sobre o status da intervenção?” e “Participantes foram excluídos devido a dados ausentes em outras variáveis necessárias para a análise?” foram respondidas como “não”^{128-131,182,183}. Cinco estudos mostraram os desfechos dos experimentos sem conter dados ausentes ou exclusão de participantes sem justificativas, o que sugere que os desfechos estavam disponíveis para todos os participantes e não ocorreu a exclusão devido a resposta de intervenções ou de outras prováveis variáveis na análise^{128,129,131,182,183}. Apenas um estudo, ocorreu a exclusão de dados, mas isso aconteceu antes do início do estudo e foi justificado na metodologia¹³⁰.

No domínio 6 de avaliação na mensuração dos desfechos todos os artigos foram classificados com baixo risco de viés^{128-131,182,183}. E as perguntas “A mensuração do desfecho poderia ter sido influenciada pelo conhecimento da intervenção recebida?”, “Os

avaliadores dos desfechos estavam cientes da intervenção recebida pelos participantes do estudo?” e “Houve algum erro sistemático na mensuração do desfecho relacionado à intervenção recebida?” foram respondidas como provavelmente não^{128–131,182,183}. E a pergunta “Os métodos de avaliação dos desfechos foram comparáveis entre os grupos de intervenção?” foi respondida como sim^{128–131,182,183}. Os estudos utilizaram uma metodologia objetiva para medir as respostas das intervenções, com protocolos padronizados, sem evidências de viés devido ao conhecimento da intervenção por participantes ou avaliadores, não foram mencionados erros sistemáticos na mensuração dos desfechos, sugerindo que a medição foi feita de forma consistente, sem influência significativa da intervenção recebida^{128–131,182,183}.

No domínio 7 de avaliação de viés na seleção dos resultados relatos, todos os estudos foram considerados de baixo risco de viés e tiveram respostas iguais para as três perguntas do domínio^{128–131,182,183}. As perguntas “múltiplas mensurações de desfecho dentro do domínio do desfecho?”, “múltiplas análises da relação intervenção-desfecho?” e “diferentes subgrupos?” foram respondidas com provavelmente não^{128–131,182,183}. Todas as medições de desfechos nos artigos foram baseadas no estabelecido no protocolo sem estar vinculado a múltiplos desfechos ou seleção de efeito com base em subgrupos, as análises dos desfechos foram feitas de maneira global e comparativa entre os grupos de intervenção e controle^{128–131,182,183}.

Dessa maneira, após as respostas de cada domínio, os estudos foram adicionados a ferramenta *robvis tool* para a sumarização dos resultados em cada domínio.

		Risco de viés dos domínios							
		D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	Viés
Estudos	Blomeke et al., 2008	+	+	+	+	+	+	+	+
	Jowsey et al., 2006	+	+	+	+	+	+	+	+
	Lis et al., 1998	+	+	+	+	+	+	+	+
	Skazik et al., 2008	-	+	+	+	+	+	+	-
	Meisser et al., 2019	+	+	+	+	+	+	+	+
	Basketter et al., 2016	+	+	+	+	+	+	+	+
		Domínios: D1: Domínio de confundimento. D2: Viés de seleção dos participantes. D3: Viés de classificação das intervenções. D4: Viés de desvios das intervenções pretendidas. D5: Viés de dados faltantes. D6: Viés na mensuração dos desfechos. D7: Viés na seleção do resultado reportado.							Julgamentos - Moderado + Baixo

Figura 5. Avaliação do risco de viés dos artigos classificados como ensaios clínicos não randomizados.

Ferramenta *robvis tool*.¹²⁵.

6 CONCLUSÃO

Na presente revisão sistemática, 90 estudos, pré-clínicos (*in vivo* e *in vitro*) e clínicos (ensaios clínicos não randomizados), foram avaliados em relação aos efeitos tóxicos da parafenilenodiamina (PPD), de forma a reunir e analisar dados sobre os efeitos tóxicos atribuídos à PPD e buscar quais são os efeitos adversos relatados pelo seu uso em cosméticos. No entanto, a etapa de metanálise não foi realizada, pois, apesar de os estudos investigarem os mesmos desfechos, eles empregam metodologias distintas.

Dentre os estudos avaliados nesta revisão, foi possível observar que a PPD, utilizada a 3,5% em tinturas de cabelo (500 µg/mL) e adicionada a tanques de zebrafish, foi suficiente para atingir uma mortalidade embrionária de 100%¹⁷⁹. Em porquinhos-da-índia, evidenciou-se o potencial de sensibilização da PPD em três estudos que realizaram aplicação tópica, demonstrando que esse efeito pode ser alcançado com apenas 0,1% de PPD^{139,140,178}, e em concentrações de 0,003 mg¹³⁹.

A administração oral de 40 mg/kg de PPD em ratos Charles River resultou em fraqueza severa nos membros anteriores, alopecia, tremores generalizados, dificuldade respiratória, convulsões e agravamento da dificuldade respiratória próximo à morte⁴⁰. Já a administração oral de 0,4% de PPD levou ao aumento do peso do fígado e dos rins, além de causar degeneração gordurosa hepática em ratos F344¹⁰⁰.

O uso de 200 mmol/kg/dia por via subcutânea provocou necrose nos músculos esqueléticos, no diafragma e na língua de ratas Sprague-Dawley⁴⁷. A administração tópica de 1, 2 e 3 mg/kg por 30 dias resultou no aumento de biomarcadores séricos de lesão hepática (ALT, AST e ALP) em ratos Sprague-Dawley^{26,38}. Quando utilizada a 1 mg/kg, em ratos Sprague-Dawley, a PPD causou infiltração leucocitária e necrose periportal grave; em 3 mg/kg, levou a necrose centrolobular severa, dilatação da veia central e exsudatos fibrinosos marcantes circundando a veia central, aderindo às estruturas circundantes, além do aumento da hemoglobina²⁶.

A PPD reduziu a viabilidade celular de forma dose-dependente em células uropiteliais humanas (2, 5, 10, 20 e 40 g/mL)¹⁴³, células dendríticas (250 µM e 500 µM)⁷⁹, e linfócitos humanos (0,8 mM em 8 h)¹⁷⁰. Além disso, foi capaz de induzir danos ao DNA e aumentar a expressão de p53 em doses crescentes (2, 5, 10, 20 e 40 g/mL)¹⁴³, (0,018, 0,046 e 0,37 mM por 24 h)¹⁶³, (78, 156 e 312 µg/mL)¹⁸⁰.

Foram observadas alterações morfológicas em células SV-HUC-1 (0,018, 0,046 e 0,37 mM por 24 h)¹⁶³, e em células renais de cães Mardin-Darby (37,5 e 50 µg/mL)³⁴. Além disso, a PPD apresentou efeitos apoptóticos em células nHHDPCs (400 µM)¹⁸⁴, em linfócitos humanos (0,8 mM)¹⁷⁰, e em células renais de cães Mardin-Darby (37,5 µg/mL)³⁴.

A PPD é um potente sensibilizador, sendo a principal responsável pela dermatite de contato alérgica (DAC). Essa condição pode ser facilmente identificada por meio do teste de contato, no qual a exposição a 1% de PPD desencadeia respostas de elicitação, evidenciando que essa concentração é suficiente para gerar uma resposta imunológica^{128,139,145,149,178,235}.

O uso de uma tintura capilar contendo 0,5% de PPD resultou em reações positivas no teste de contato após 30 minutos, 1 hora e 24 horas de aplicação¹²⁸. Além disso, a aplicação tópica de PPD nas concentrações de 0,1%, 0,5% e 1% foi capaz de desencadear reações de sensibilidade cruzada com benzoquinona, para-aminodifenilamina, para-aminofenol, para-toluenodiamina, mentol e benzocaína¹²⁹.

Entre os estudos incluídos na revisão sistemática, alguns buscaram comparar os efeitos da PPD em relação a outros tratamentos. Foi observado que o extrato de *Ecklonia cava* aumentou a taxa de sobrevivência de zebrafish expostos à PPD quando utilizado nas concentrações de 5% e 7%¹⁷⁹.

A inibição de danos ao DNA e a redução da viabilidade celular induzidas pela PPD foram minimizadas com o uso de antioxidantes, como vitaminas C e E, além de inibidores das caspases-8 e -9^{16,34,130}. Após o processo de N-acetilação, a PPD origina dois metabólitos: MAPPD (metabólito intermediário) e DAPPD (metabólito final)^{78,131,152}. O uso de 1% de MAPPD, DAPPD e PPD foi avaliado em um teste com 455 indivíduos, no qual apenas um apresentou reação à DAPPD, nenhum à MAPPD e 16 à PPD. Esses achados sugerem que os derivados acetilados da PPD, em geral, não reativam células T, demonstrando um perfil de redução da resposta imunológica à PPD no organismo^{77,141,162}.

Embora alguns compostos tenham reduzido os efeitos da PPD, outros demonstraram potencial para intensificá-los. A administração oral de vitamina A em camundongos das linhagens CBA/J e Balb/C aumentou os efeitos adversos da PPD¹⁷⁷. Da

mesma forma, a combinação da PPD com peróxido de hidrogênio potencializou a citotoxicidade celular e os danos ao DNA, devido à oxidação da parafenilenodiamina^{16,34}.

Diversos mecanismos foram elucidados nos estudos incluídos nesta revisão. Um dos mais destacados é o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzido pela PPD, que é um marcador utilizado para avaliar o estresse oxidativo e o desequilíbrio do estado redox em tecidos e células^{16,34,168,179}. A exposição de *zebrafish* a 250 µg/mL de tinta contendo PPD foi suficiente para provocar um aumento significativo de ROS¹⁷⁹. Também foi observada a liberação aumentada de histamina na presença de 0,1 mL de PPD (0,9% em 25% de etanol)⁶⁸ e 0,1 mL de PPD (4% (p/v) em 25% de etanol)⁴⁵. Esse aumento de histamina é um indicativo de hipersensibilidade, sugerindo o envolvimento de células inflamatórias e uma possível indução de dermatite de contato alérgica.

Além disso, a PPD gerou danos ao DNA e causou o acúmulo de p53¹⁵², ativação de ERK1/2¹⁶³ e ERK5³⁶, além da regulação positiva da transição epitélio-mesenquimal (EMT)³⁶. PPD levou ao aumento da expressão de CD40, 80 e 86 possibilitando que células dendríticas ou a sinalização por via MHC-II levassem a secreção de citocinas e regulação positiva de moléculas coestimuladas aumentando, assim, a capacidade de ativação de células T gerando uma reação imunológica e morte celular^{79,147}.

Diante dos dados apresentados nesta revisão sistemática, foi possível concluir que o limite de 6% de PPD permitido em tinturas capilares pela RDC nº 03, de 20 de janeiro de 2012, da ANVISA¹⁴, pode não ser adequado para prevenir efeitos adversos em usuários de cosméticos que contenham esse composto, bem como em profissionais expostos diariamente a esses produtos. A prevalência da alergia à PPD pode ser significativamente reduzida por meio de estratégias eficazes de gerenciamento de risco, como rotulagem preventiva e medidas de segurança ocupacional, incluindo o uso de luvas de proteção e a minimização do contato da tinta com o couro cabeludo durante a aplicação. Em vista disso, é sugerido que haja uma reavaliação das diretrizes de segurança e das concentrações de PPD nos produtos de tinta capilar, uma vez que os dados apresentados indicam que, mesmo em concentrações reduzidas, os efeitos tóxicos e alérgicos associadas à PPD continuam a representar riscos para a saúde.

7 REFERÊNCIAS

1. Mohammad, A. M. W. & Mubarak, M. Effect of an Oxidative Hair Dye on the Skin of Domestic Rabbits. *J. Biol. Sci.* 5, 809–812 (2005).
2. Cipriani, A., Geddes, J. R. & Barbui, C. Venlafaxine for major depression. *BMJ* 334, 215–216 (2007).
3. Sosted, H., Hesse, U., Menne, T., Andersen, K. E. & Johansen, J. D. Contact dermatitis to hair dyes in a Danish adult population: an interview-based study. *Br. J. Dermatol.* 153, 132–135 (2005).
4. Ortiz Salvador, J. M. *et al.* Dermatitis alérgica de contacto a parafenilendiamina por tatuajes con henna en población pediátrica. *An. Pediatria* 86, 122–126 (2017).
5. Güdeloğlu, E. & Erdur, B. Retrospective evaluation of childhood paraphenylenediamine intoxication due to black henna. *Turk. J. Pediatr.* 62, 387–393 (2020).
6. Işık, S., Caglayan-Sözmen, S., Anal, Ö., Karaman, Ö. & Uzuner, N. Severe Neck and Face Edema in an Adolescent—Delayed Hypersensitivity Reaction to Hair Dye. *Pediatr. Emerg. Care* 33, 422–423 (2017).
7. Nazik, H., Gül, F. Ç., Mülayim, M. K., Öztürk, P. & Kirik, S. Transient hypertrichosis with temporary tattooing in two siblings. *Dermatologica Sin.* 36, 229–231 (2018).
8. Şık, G. & Çıtak, A. Fatal paraphenylenediamine poisoning due to black henna. *Turk. J. Pediatr.* 58, 301–304 (2016).
9. Santa Barbara, M. C. *et al.* Otimização e validação intralaboratorial de método analítico por CLAE/UV para identificação e quantificação de p-fenilenodiamina em tinturas de hena para cabelos e sobrancelhas. *Vigilância Sanitária em Debate* 7, 62–68 (2019).
10. Gallo, F. R. *et al.* Henna through the centuries: a quick HPTLC analysis proposal to check henna identity. *Rev. Bras. Farmacogn.* 24, 133–140 (2014).
11. AP, Q., MA, A., A, B. & MS, M. Emerging Trend of Self Harm by ‘Kala Pathar’ Hair Dye (Paraphenylene diamine) : An Epidemiological Study. *APMC* 10, 26–30 (2016).
12. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Resolução Da Diretoria Colegiada - RDC No 530.*
13. EUROPEAN, UNION, S. C. on C. S. *Opinion on: p- Phe-nylenediamine.* vol. COLIPA nº (2012).
14. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Resolução Da Diretoria Colegiada RDC No 03.*
15. Burnett, C. *et al.* Long-term toxicity studies on oxidation hair dyes. *Food Cosmet. Toxicol.* 13, 353–357 (1975).
16. Chen, S. C. *et al.* Para-phenylenediamine induced DNA damage and apoptosis through oxidative stress and enhanced caspase-8 and -9 activities in Mardin–Darby canine kidney cells. *Toxicol. Vitro.* 24, 1197–1202 (2010).
17. Cho, J.-A., Oh, E., Lee, E. & Sul, D. Effects of Hair Dyeing on DNA Damage in Human Lymphocytes. *J. Occup. Health* 45, 376–381 (2003).
18. Chung, K.-T. *et al.* Mutagenicity and toxicity studies of p-phenylenediamine and its derivatives. *Toxicol. Lett.* 81, 23–32 (1995).
19. Correa, A., Mohan, A., Jackson, L., Perry, H. & Helzlsouer, K. Use of Hair Dyes, Hematopoietic Neoplasms, and Lymphomas: A Literature Review. I. Leukemias and Myelodysplastic Syndromes. *Cancer Invest.* 18, 366–380 (2000).
20. Park, H. *et al.* Skin irritation and sensitization potential of oxidative hair dye substances evaluated with *in vitro*, *in chemico* and *in silico* test methods. *Food Chem. Toxicol.* 121, 360–

366 (2018).

21. Burnett, C., Loehr, R. & Corbett, J. Dominant lethal mutagenicity study on hair dyes. *J. Toxicol. Environ. Health* 2, 657–662 (1977).
22. Kiese, M. & Rauscher, E. The absorption of p-toluenediamine through human skin in hair dyeing. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 13, 325–331 (1968).
23. NEAGU, M. *et al.* Chemically induced skin carcinogenesis: Updates in experimental models (Review). *Oncol. Rep.* 35, 2516–2528 (2016).
24. Ames, B. N., Kammen, H. O. & Yamasaki, E. Hair dyes are mutagenic: identification of a variety of mutagenic ingredients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72, 2423–2427 (1975).
25. Bharali, M. K. & Dutta, K. Testicular toxicity of para-phenylenediamine after subchronic topical application in rat. *Int. J. Environ. Health Res.* 22, 270–278 (2012).
26. Bharali, M. K. & Dutta, K. Hepatic Histopathological Abnormalities in Rats Treated Topically with Para-Phenylene Diamine (PPD). *J. Pharmacol. Toxicol.* 4, 221–228 (2009).
27. Czene, K., Tiikkaja, S. & Hemminki, K. Cancer risks in hairdressers: Assessment of carcinogenicity of hair dyes and gels. *Int. J. Cancer* 105, 108–112 (2003).
28. Gago-Dominguez, M. *et al.* Use of permanent hair dyes and bladder-cancer risk. *Int. J. Cancer* 94, 903–904 (2001).
29. Mederos, A., Domínguez, S., Hernández-Molina, R., Sanchiz, J. & Brito, F. Coordinating ability of phenylenediamines. *Coord. Chem. Rev.* 193–195, 913–939 (1999).
30. Mosley-Foreman, C., Choi, J., Wang, S. & Yu, H. Phototoxicity of phenylenediamine hair dye chemicals in *Salmonella typhimurium* TA102 and human skin keratinocytes. *Food Chem. Toxicol.* 46, 3780–3784 (2008).
31. Diembeck, W. *et al.* Test Guidelines for *In vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients. *Food Chem. Toxicol.* 37, 191–205 (1999).
32. Rauscher, G. H. Hair Dye Use and Risk of Adult Acute Leukemia. *Am. J. Epidemiol.* 160, 19–25 (2004).
33. Thun, M. J. *et al.* Hair Dye Use and Risk of Fatal Cancers in U.S. Women. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 86, 210–215 (1994).
34. Chen, S.-C. *et al.* p-Phenylenediamine induces p53-mediated apoptosis in Mardin–Darby canine kidney cells. *Toxicol. Vitro.* 20, 801–807 (2006).
35. Eberle, C. E., Sandler, D. P., Taylor, K. W. & White, A. J. Hair dye and chemical straightener use and breast cancer risk in a large US population of black and white women. *Int. J. Cancer* 147, 383–391 (2020).
36. Liu, Z. *et al.* p-Phenylenediamine induces epithelial-mesenchymal transition in SV-40 immortalized human urothelial cells via the ERK5/AP-1 signaling. *Toxicol. Lett.* 371, 1–8 (2022).
37. Rojanapo, W., Kupradinun, P., Tepsuwan, A., Chutimataewin, S. & Tanyakaset, M. Carcinogenicity of an oxidation product of p-phenylenediamine. *Carcinogenesis* 7, 1997–2002 (1986).
38. Abd-ElZaher, M. A., Fawzy, I. A., Ahmed, H. M., Abd-Allah, A. M. & Gayyed, M. F. Some toxicological health hazards associated with subchronic dermal exposure to paraphenylenediamine (PPD): An experimental study. *Egypt. J. Forensic Sci.* 2, 105–111 (2012).
39. Bharali, M. K. & Dutta, K. Hematopathology in Sprague–Dawley Rats Following Sub-Chronic Topical Application of Para-Phenylenediamine. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 89, 712–717 (2012).
40. Salih El Amin, E. I. Toxicity Effects of Hair Dye Application on Liver Function in

Experimental Animals. *J. Clin. Toxicol.* 04, (2014).

41. Kandil, H. H., Al-Ghanem, M. M., Sarwat, M. A. & Al-Thallab, F. S. Henna (*Lawsonia inermis* Linn.) inducing haemolysis among G6PD-deficient newborns. A new clinical observation. *Ann. Trop. Paediatr.* 16, 287–291 (1996).
42. Pasricha, J. S., Gupta, R. & Panjwani, S. Contact dermatitis to henna (*Lawsonia*). *Contact Dermatitis* 6, 288–289 (1980).
43. Sandeep Reddy, Y. *et al.* Hair Dye Related Acute Kidney Injury – A Clinical and Experimental Study. *Ren. Fail.* 34, 880–884 (2012).
44. Doull, J. *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons.* (2014).
45. Mathur, A. K., Raizada, R. B., Srivastava, M. K. & Singh, A. Effect of dermal exposure to paraphenylenediamine and linear alkylbenzene sulphonate in guinea pigs. *Biomed. Environ. Sci.* 18, 238–40 (2005).
46. Munday, R., Manns, E., Fowke, E. A. & Hoggard, G. K. Muscle necrosis by N-methylated p-phenylenediamines in rats: Structure-activity relationships and correlation with free-radical production *in vitro*. *Toxicology* 57, 303–314 (1989).
47. Munday, R. & Manns, E. Muscle Necrosis in Rats Induced by 2-Methoxy-p-phenylenediamine. *Food Chem. Toxicol.* 37, 561–564 (1999).
48. Walker, R., Grasso, P. & Gaunt, I. F. Myotoxicity of amine metabolites from brown FK. *Food Cosmet. Toxicol.* 8, 539–542 (1970).
49. Ashraf, W., Dawling, S. & Farrow, L. J. Systemic Paraphenylenediamine (PPD) Poisoning: A Case Report and Review. *Hum. Exp. Toxicol.* 13, 167–170 (1994).
50. Averbukh, Z. *et al.* Rhabdomyolysis and Acute Renal Failure Induced by Paraphenylenediamine. *Hum. Toxicol.* 8, 345–348 (1989).
51. Munday, R. & Manns, E. 2,3,6-triaminopyridine, a metabolite of the urinary tract analgesic phenazopyridine, causes muscle necrosis and renal damage in rats. *J. Appl. Toxicol.* 18, 161–165 (1998).
52. Babich, H., Stern, A. & Munday, R. *In vitro* cytotoxicity of methylated phenylenediamines. *Toxicol. Lett.* 63, 171–179 (1992).
53. Kumar, S. *et al.* EVALUATION OF ANTIGENOTOXIC POTENTIAL OF BEET ROOT EXTRACT AGAINST HAIR DYE INDUCED GENOTOXICITY. (2020) doi:10.13040/IJPSR.0975-8232.11(4).1874-78.
54. Lee, S.-H., Cho, H.-G. & Lee, S.-I. The Effects of Tungstate on Skin Lesions Caused by PPD in Rats. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 681–684 (2008).
55. Wynder, E. L., Onderdonk, J. & Mantel, N. An epidemiological investigation of cancer of the bladder. *Cancer* 16, 1388–1407 (1963).
56. Garrigue, J.-L. *et al.* *In vitro* genotoxicity of para-phenylenediamine and its N-monoacetyl or N,N'-diacetyl metabolites. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 608, 58–71 (2006).
57. Nohynek, G. J., Fautz, R., Benech-Kieffer, F. & Toutain, H. Toxicity and human health risk of hair dyes. *Food Chem. Toxicol.* 42, 517–543 (2004).
58. Bruchhausen, S., Zahn, S., Valk, E., Knop, J. & Becker, D. Thiol Antioxidants Block the Activation of Antigen-Presenting Cells by Contact Sensitizers. *J. Invest. Dermatol.* 121, 1039–1044 (2003).
59. Bickers, D. R. & Athar, M. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Skin Disease. *J. Invest. Dermatol.* 126, 2565–2575 (2006).
60. Mattia, C. J., Adams, J. D. & Bondy, S. C. Free radical induction in the brain and liver by products of toluene catabolism. *Biochem. Pharmacol.* 46, 103–110 (1993).

61. Mizuashi, M., Ohtani, T., Nakagawa, S. & Aiba, S. Redox Imbalance Induced by Contact Sensitizers Triggers the Maturation of Dendritic Cells. *J. Invest. Dermatol.* 124, 579–586 (2005).
62. Nagata, C. *et al.* Hair dye use and occupational exposure to organic solvents as risk factors for myelodysplastic syndrome. *Leuk. Res.* 23, 57–62 (1999).
63. Chung, K.-T. & Stevens, S. E. Degradation azo dyes by environmental microorganisms and helminths. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 2121–2132 (1993).
64. Chye, S. M., Hseu, Y. C., Liang, S.-H., Chen, C.-H. & Chen, S. C. Single Strand DNA Breaks in Human Lymphocytes Exposed to para-Phenylenediamine and its Derivatives. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 80, 58–62 (2008).
65. Rubin, I. M. C. *et al.* Repeated exposure to hair dye induces regulatory T cells in mice. *Br. J. Dermatol.* 163, 992–998 (2010).
66. Perry, P. E. & Searle, C. E. Induction of sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells by the hair dye constituents 2-nitro-p-phenylenediamine and 4-nitro-o-phenylenediamine. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 56, 207–210 (1977).
67. Shelby, M. D. & Stasiewicz, S. Chemicals showing no evidence of carcinogenicity in long-term, two-species rodent studies: The need for short-term test data. *Environ. Mutagen.* 6, 871–878 (1984).
68. VISWANATHAN, P. N., GUPTA, V. & MISRA, V. Studies on the dermal toxicity of p-phenylene diamine. *Int. J. Cosmet. Sci.* 7, 213–218 (1985).
69. Coulter, E. M. *et al.* Activation of T-Cells from Allergic Patients and Volunteers by p-Phenylenediamine and Bandrowski's Base. *J. Invest. Dermatol.* 128, 897–905 (2008).
70. Smith Pease, C. From xenobiotic chemistry and metabolism to better prediction and risk assessment of skin allergy. *Toxicology* 192, 1–22 (2003).
71. Curtsinger, J. M. & Mescher, M. F. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr. Opin. Immunol.* 22, 333–340 (2010).
72. Matzinger, P. Tolerance, Danger, and the Extended Family. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 991–1045 (1994).
73. Naimi Y, S. R. Chemical and Biological Analyses of the Role of the Poly- Para-Phenylenediamine in the Erythrocytes Resistance in Hypotonic Environment. *J. Membr. Sci. Technol.* 06, (2016).
74. Bharali, M., Rahman, T., Basumatary, R. & Dutta, K. Repeated topical application of Para-phenylenediamine induces renal histopathological changes in rats. *Toxicol. Int.* 19, 132 (2012).
75. Krasteva, M. *et al.* Dissociation of Allergenic and Immunogenic Functions in Contact Sensitivity to Para-Phenylenediamine. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 102, 200–204 (1993).
76. Lakard, B., Herlem, G., Lakard, S. & Fahys, B. Ab initio study of the polymerization mechanism of poly(p-phenylenediamine). *J. Mol. Struct. THEOCHEM* 638, 177–187 (2003).
77. Dressler, W. E. & Appelqvist, T. Plasma/blood pharmacokinetics and metabolism after dermal exposure to para-aminophenol or para-phenylenediamine. *Food Chem. Toxicol.* 44, 371–379 (2006).
78. Nohynek, G. J. *et al.* Under the skin: Biotransformation of para-aminophenol and para-phenylenediamine in reconstructed human epidermis and human hepatocytes. *Toxicol. Lett.* 158, 196–212 (2005).
79. Coulter, E. M. *et al.* Activation of Human Dendritic Cells by p-Phenylenediamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 320, 885–892 (2007).
80. Krasteva, M. *et al.* In vitro primary sensitization of hapten-specific T cells by cultured human epidermal Langerhans cells--a screening predictive assay for contact sensitizers. *Clin. Exp.*

Allergy 26, 563–70 (1996).

81. Toebak, M. J. *et al.* CXCL8 secretion by dendritic cells predicts contact allergens from irritants. *Toxicol. Vitro*. 20, 117–124 (2006).
82. Rougier, N., Redziniak, G., Mouglin, D., Schmitt, D. & Vincent, C. *In vitro* evaluation of the sensitization potential of weak contact allergens using langerhans-like dendritic cells and autologous T cells. *Toxicology* 145, 73–82 (2000).
83. Ashikaga, T., Hoya, M., Itagaki, H., Katsumura, Y. & Aiba, S. Evaluation of CD86 expression and MHC class II molecule internalization in THP-1 human monocyte cells as predictive endpoints for contact sensitizers. *Toxicol. Vitro*. 16, 711–716 (2002).
84. Aeby, P. *et al.* Characterization of the Sensitizing Potential of Chemicals by *In vitro* Analysis of Dendritic Cell Activation and Skin Penetration. *J. Invest. Dermatol.* 122, 1154–1164 (2004).
85. Cumberbatch, M., Clelland, K., Dearman, R. J. & Kimber, I. Impact of Cutaneous IL-10 on Resident Epidermal Langerhans' Cells and the Development of Polarized Immune Responses. *J. Immunol.* 175, 43–50 (2005).
86. Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. The instructive role of dendritic cells on T cell responses: lineages, plasticity and kinetics. *Curr. Opin. Immunol.* 13, 291–298 (2001).
87. Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245–252 (1998).
88. Zhang, L. & Tinkle, S. S. Chemical Activation of Innate and Specific Immunity in Contact Dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 115, 168–176 (2000).
89. Hulette, B. C., Ryan, C. A., Gildea, L. A. & Gerberick, G. F. Relationship of CD86 surface marker expression and cytotoxicity on dendritic cells exposed to chemical allergen. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 209, 159–166 (2005).
90. Amo, H. *et al.* Carcinogenicity and toxicity study of m-phenylenediamine administered in the drinking-water to (C57BL/6 × C3H/He)F1 mice. *Food Chem. Toxicol.* 26, 893–897 (1988).
91. Anto, R. J., George, J., Babu, K. V. D., Rajasekharan, K. N. & Kuttan, R. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of natural and synthetic curcuminoids. *Mutat. Res. Toxicol.* 370, 127–131 (1996).
92. Crebelli, R. *et al.* Mutagenicity studies in a tyre plant: *in vitro* activity of workers' urinary concentrates and raw materials. *Occup. Environ. Med.* 42, 481–487 (1985).
93. Sasiadek, M. Sister-chromatid exchanges and cell-cycle kinetics in the lymphocytes of workers occupationally exposed to a chemical mixture in the tyre industry. *Mutat. Res. Lett.* 302, 197–200 (1993).
94. Gentile, J. M., Gentile, G. J. & Plewa, M. J. *In vitro* activation of chemicals by plants: a comparison of techniques. *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* 164, 53–58 (1986).
95. Degawa, M., Shoji, Y., Masuko, K. & Hashimoto, Y. Mutagenicity of metabolites of carcinogenic aminoazo dyes. *Cancer Lett.* 8, 71–76 (1979).
96. Kalopissis, G. Structure-activity relationships of aromatic diamines in the Ames Salmonella typhimurium assay. Part II. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 269, 9–26 (1992).
97. NORDENSKJOLD, M. Prostaglandin synthase-catalyzed metabolic of some aromatic amines to genotoxic products. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 127, 107–112 (1984).
98. Burnett, C., Fuchs, C., Corbett, J. & Menkart, J. The effect of dimethylsulfoxide on the mutagenicity of the hair dye p-phenylenediamine. *Mutat. Res. Lett.* 103, 1–4 (1982).
99. Hueber-Becker, F. *et al.* Occupational exposure of hairdressers to [14C]-para-phenylenediamine-containing oxidative hair dyes: A mass balance study. *Food Chem. Toxicol.* 45, 160–169 (2007).

100. Katsumi, I., Yuichi, I., Osamu, N., Keisuke, N. & Nobuyuki, I. Carcinogenicity and toxicity tests on p-phenylenediamine in F344 rats. *Toxicol. Lett.* 16, 259–269 (1983).
101. KIRKLAND, D. J. The mutagenicity and carcinogenicity of hair dyes. *Int. J. Cosmet. Sci.* 5, 51–71 (1983).
102. National Toxicology Program. Bioassay of 4-chloro-o-phenylenediamine for possible carcinogenicity. *Natl. Cancer Inst. Carcinog. Tech. Rep. Ser.* 63, 1–115 (1978).
103. Dunkel, V. C. *et al.* Reproducibility of microbial mutagenicity assays: II. Testing of carcinogens and noncarcinogens in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Environ. Mutagen.* 7, 1–19 (1985).
104. Soler-Niedziela, L., Shi, X., Nath, J. & Ong, T. Studies on three structurally related phenylenediamines with the mouse micronucleus assay system. *Mutat. Res. Toxicol.* 259, 43–48 (1991).
105. Oberly, T. J., Bewsey, B. J. & Probst, G. S. An evaluation of the L5178Y TK+/- mouse lymphoma forward mutation assay using 42 chemicals. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 125, 291–306 (1984).
106. Prival, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Peiperl, M. D. & Vaughan, V. L. Mutagenicity of benzidine and benzidine-congener dyes and selected monoazo dyes in a modified *Salmonella* assay. *Mutat. Res. Toxicol.* 136, 33–47 (1984).
107. Merk, H. F. Allergisches Kontaktekzem. *H&G Zeitschrift für Hautkrankheiten* 77, 466–472 (2002).
108. Dickel, H. *et al.* Surveillance scheme for occupational skin disease in the Saarland, FRG. *Contact Dermatitis* 46, 197–206 (2002).
109. Schäfer, T. *et al.* Epidemiology of contact allergy in adults. *Allergy* 56, 1192–1196 (2001).
110. Basketter, D. A. & Kimber, I. Predictive testing in contact allergy: facts and future. *Allergy* 56, 937–943 (2001).
111. Sebastiani, S. *et al.* The role of chemokines in allergic contact dermatitis. *Arch. Dermatol. Res.* 293, 552–559 (2002).
112. Bonefeld, C. M. *et al.* Consumer available permanent hair dye products cause major allergic immune activation in an animal model. *Br. J. Dermatol.* 162, 102–107 (2010).
113. Hertl, M. *et al.* Predominance of Epidermal CD8+ T Lymphocytes in Bullous Cutaneous Reactions Caused by β -Lactam Antibiotics. *J. Invest. Dermatol.* 101, 794–799 (1993).
114. Vocanson, M., Hennino, A., Rozières, A., Poyet, G. & Nicolas, J. -F. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy* 64, 1699–1714 (2009).
115. Trautmann, A. *et al.* T cell-mediated Fas-induced keratinocyte apoptosis plays a key pathogenetic role in eczematous dermatitis. *J. Clin. Invest.* 106, 25–35 (2000).
116. Traidl, C., Merk, H. F., Cavani, A. & Hunzelmann, N. New Insights into the Pathomechanisms of Contact Dermatitis by the Use of Transgenic Mouse Models. *Skin Pharmacol. Physiol.* 13, 300–312 (2000).
117. PICAUDO, M. *et al.* Paraphenylene diamine, a contact allergen, induces oxidative stress in normal human keratinocytes in culture. *Br. J. Dermatol.* 134, 681–685 (1996).
118. PICARDO, M. *et al.* Paraphenylenediamine, a contact allergen, induces oxidative stress and ICAM-1 expression in human keratinocytes. *Br. J. Dermatol.* 126, 450–455 (1992).
119. Li, Q., Inagaki, H. & Minami, M. Evaluation of cross-sensitization among dye-intermediate agents using a modified lymphocyte transformation test. *Arch. Toxicol.* 70, 414–419 (1996).
120. Basketter, D. A. & Liden, C. Further investigation of the prohaptens concept: reactions to benzene derivatives in man. *Contact Dermatitis* 27, 90–97 (1992).

121. Basketter, D. A. & Goodwin, B. F. J. Investigation of the prohaptens concept Cross reactions between 1,4-substituted benzene derivatives in the guinea pig. *Contact Dermatitis* 19, 248–253 (1988).
122. Mitchell, J. C. The angry back syndrome: eczema creates eczema. *Contact Dermatitis* 1, 193–194 (1975).
123. Page, M. J. *et al.* The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ* 18, n71 (2021).
124. De Luca Canto, G. *et al.* *Revisões sistemáticas da literatura: guia prático. Revisões sistemáticas da literatura: guia prático* (Brazil Publishing, 2020). doi:10.31012/978-65-5016-353-2.
125. Sterne, J. A. *et al.* ROBINS-I: a tool for assessing risk of bias in non-randomised studies of interventions. *BMJ* i4919 (2016) doi:10.1136/bmj.i4919.
126. Hooijmans, C. R. *et al.* SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC Med. Res. Methodol.* 14, 43 (2014).
127. Sheth, V. H., Shah, N. P., Jain, R., Bhanushali, N. & Bhatnagar, V. Development and validation of a risk-of-bias tool for assessing *in vitro* studies conducted in dentistry: The QUIN. *J. Prosthet. Dent.* 131, 1038–1042 (2024).
128. Jowsey, I. R., Basketter, D. A., McFadden, J. P., Kullavanijaya, P. & Duangdeeden, I. Elicitation response characteristics to permanent hair dye in paraphenylenediamine-allergic volunteers. *Contact Dermatitis* 55, 330–334 (2006).
129. Lisi, P. & Hansel, K. Is benzoquinone the prohaptens in cross-sensitivity among aminobenzene compounds? *Contact Dermatitis* 39, 304–306 (1998).
130. Basketter, D. A. *et al.* Influence of vitamin C on the elicitation of allergic contact dermatitis to p-phenylenediamine. *Contact Dermatitis* 74, 368–372 (2016).
131. Blömeke, B., Pietzsch, T. & Merk, H. F. Elicitation response characteristics to mono- and to N, N'-diacetyl-para-phenylenediamine. *Contact Dermatitis* 58, 355–358 (2008).
132. Akihiro, H. Lack of modifying effects of p-phenylenediamine on induction of γ -glutamyl transpeptidase-positive foci in a medium-term bioassay system using F344 rats. *Toxicol. Lett.* 52, 261–268 (1990).
133. Jen, S. E., Adam, M. A., Garba, S. H., Attah, M. O. O. & Dibal, N. I. Lawsonia inermis and paraphenylenediamine exerts an insidious effect on the epidermal, renal, and hepatic tissue with repeated application: a histological and morphometrical study. *Eur. J. Anat.* 27, 463–474 (2023).
134. Kitchin, K. T., Brown, J. L. & Kulkarni, A. P. Predicting rodent carcinogenicity of Ames test false positives by *in vivo* biochemical parameters. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 290, 155–164 (1993).
135. Lloyd, G. K., Liggett, M. P., Kynoch, S. R. & Davies, R. E. Assessment of the acute toxicity and potential irritancy of hair dye constituents. *Food Cosmet. Toxicol.* 15, 607–610 (1977).
136. Rothe, H., Sarlo, K., Scheffler, H. & Goebel, C. The hair dyes PPD and PTD fail to induce a T H 2 immune response following repeated topical application in BALB/c mice. *J. Immunotoxicol.* 8, 46–55 (2011).
137. Stenbäck, F. G., Rowland, J. C. & Russell, L. A. Non-carcinogenicity of hair dyes: Lifetime percutaneous applications in mice and rabbits. *Food Cosmet. Toxicol.* 15, 601–606 (1977).
138. Svalgaard, J. D. *et al.* Systemic immunogenicity of para-Phenylenediamine and Diphenylcyclopropenone: two potent contact allergy-inducing haptens. *Immunol. Res.* 58, 40–50 (2014).
139. TO-O, K. *et al.* Experimental study on cross-reactivity of α -arbutin toward p-phenylenediamine and hydroquinone in guinea pigs. *J. Dermatol.* 37, 455–462 (2010).

140. Xie, Z. *et al.* Experimental study on skin sensitization potencies and cross-reactivities of hair-dye-related chemicals in guinea pigs. *Contact Dermatitis* 42, 270–275 (2000).
141. Arafa, E.-S. A. *et al.* Protective Effects of Cocos Nucifera Oil in Paraphenylenediamine Toxicity. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 22, 423–432 (2021).
142. Kumar, S. *et al.* Antigenotoxic Effects of Epigallocatechin Gallate against Hair Dye Induced Genotoxicity in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes. *J. Biol. Act. Prod. from Nat.* 10, 141–152 (2020).
143. Huang, Y.-C., Hung, W.-C., Kang, W.-Y., Chen, W.-T. & Chai, C.-Y. p-Phenylenediamine induced DNA damage in SV-40 immortalized human uroepithelial cells and expression of mutant p53 and COX-2 proteins. *Toxicol. Lett.* 170, 116–123 (2007).
144. Chung, K.-T. *et al.* Effects of the nitro-group on the mutagenicity and toxicity of some benzamines. *Environ. Mol. Mutagen.* 27, 67–74 (1996).
145. Sonnenburg, A., Ahuja, V., Schreiner, M., Platzek, T. & Stahlmann, R. Assessment of the sensitizing potential of textile disperse dyes and some of their metabolites by the loose-fit coculture-based sensitization assay (LCSA). *Arch. Toxicol.* 86, 733–740 (2012).
146. Ade, N., Martinozzi-Teissier, S., Pallardy, M. & Rousset, F. Activation of U937 Cells by Contact Sensitizers: CD86 Expression is Independent of Apoptosis. *J. Immunotoxicol.* 3, 189–197 (2006).
147. Schreiner, M. *et al.* A loose-fit coculture of activated keratinocytes and dendritic cell-related cells for prediction of sensitizing potential. *Allergy* 62, 1419–1428 (2007).
148. dos Santos, G. G. *et al.* A potential *in vitro* epidermal equivalent assay to determine sensitizer potency. *Toxicol. Vitro* 25, 347–357 (2011).
149. Buzzella, A., Mazzini, G., Vicini, R., Angelinetta, C. & Pastoris, O. A preliminary study of an alternative method for evaluating skin sensitizing potential of chemicals. *Int. J. Cosmet. Sci.* 41, 257–264 (2019).
150. Lauenstein, L. *et al.* Assessment of immunotoxicity induced by chemicals in human precision-cut lung slices (PCLS). *Toxicol. Vitro* 28, 588–599 (2014).
151. Del Bufalo, A. *et al.* Contact sensitizers modulate the arachidonic acid metabolism of PMA-differentiated U-937 monocytic cells activated by LPS. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 256, 35–43 (2011).
152. Hu, T. *et al.* Dermal penetration and metabolism of p-aminophenol and p-phenylenediamine: Application of the EpiDermTM human reconstructed epidermis model. *Toxicol. Lett.* 188, 119–129 (2009).
153. Yasunaga, K., Kiyonari, A., Nakagawa, M. & Yoshikawa, K. Different Results of the Salmonella umu Test Between Three Isomers of Phenylenediamine (PDA) Derivatives. *Drug Chem. Toxicol.* 29, 203–213 (2006).
154. Neves, B. M. *et al.* Differential modulation of CXCR4 and CD40 protein levels by skin sensitizers and irritants in the FSDC cell line. *Toxicol. Lett.* 177, 74–82 (2008).
155. Kobets, T. *et al.* DNA-damaging activities of twenty-four structurally diverse unsubstituted and substituted cyclic compounds in embryo-fetal chicken livers. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 844, 10–24 (2019).
156. de Ávila, R. I. *et al.* Evaluation of *in vitro* testing strategies for hazard assessment of the skin sensitization potential of “real-life” mixtures: The case of henna-based hair-colouring products containing p-phenylenediamine. *Contact Dermatitis* 81, 194–209 (2019).
157. Karri, V., Lidén, C., Fyhrquist, N., Högberg, J. & Karlsson, H. L. Impact of mono-culture vs. Co-culture of keratinocytes and monocytes on cytokine responses induced by important skin sensitizers. *J. Immunotoxicol.* 18, 74–84 (2021).
158. Gibson, A. *et al.* *In vitro* Priming of Naïve T-cells with p-Phenylenediamine and Bandrowski’s

- Base. *Chem. Res. Toxicol.* 28, 2069–2077 (2015).
159. Goyal, S. *et al.* Involvement of cathepsin B in mitochondrial apoptosis by p-phenylenediamine under ambient UV radiation. *J. Hazard. Mater.* 300, 415–425 (2015).
 160. Frombach, J. *et al.* Lymphocyte surface markers and cytokines are suitable for detection and potency assessment of skin-sensitizing chemicals in an *in vitro* model of allergic contact dermatitis: the LCSA-ly. *Arch. Toxicol.* 92, 1495–1505 (2018).
 161. Zeller, A. & Pfuhler, S. N-acetylation of three aromatic amine hair dye precursor molecules eliminates their genotoxic potential. *Mutagenesis* 29, 37–48 (2014).
 162. Reena, K., Ng, K. Y., Koh, R. Y., Gnanajothy, P. & Chye, S. M. para -Phenylenediamine induces apoptosis through activation of reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway, and inhibition of the NF- κ B , m TOR , and W nt pathways in human urothelial cells. *Environ. Toxicol.* 32, 265–277 (2017).
 163. Huang, Y.-C., Hung, W.-C., Chye, S.-M., Chen, W.-T. & Chai, C.-Y. para-Phenylenediamine-induced autophagy in human uroepithelial cell line mediated mutant p53 and activation of ERK signaling pathway. *Toxicol. Vitro.* 25, 1630–1637 (2011).
 164. Lee, H.-Y., Jeong, Y.-I., Kim, D.-H. & Choi, K.-C. Permanent hair dye-incorporated hyaluronic acid nanoparticles. *J. Microencapsul.* 30, 189–197 (2013).
 165. Lee, S. *et al.* Predicting full thickness skin sensitization using a support vector machine. *Toxicol. Vitro.* 28, 1413–1423 (2014).
 166. Woo, H. *et al.* Rhus semialata M. extract ameliorate para-phenylenediamine-induced toxicity in keratinocytes. *Toxicol. Reports* 8, 96–105 (2021).
 167. Tsujita-Inoue, K. *et al.* Skin sensitization risk assessment model using artificial neural network analysis of data from multiple *in vitro* assays. *Toxicol. Vitro.* 28, 626–639 (2014).
 168. Seydi, E., Fatahi, M., Naserzadeh, P. & Pourahmad, J. The effects of para-phenylenediamine (PPD) on the skin fibroblast cells. *Xenobiotica* 49, 1143–1148 (2019).
 169. Zaroni, T. B. *et al.* Allergens of permanent hair dyes induces epidermal damage, skin barrier loss and IL-1 α increase in epidermal *in vitro* model. *Food Chem. Toxicol.* 112, 265–272 (2018).
 170. Salami, M., Pourahmad, J. & Zarei, M. H. Toxicity of para-phenylenediamine (PPD;1, 4 diaminobenzene) on isolated human lymphocytes: The key role of intracellular calcium enhancement in PPD-induced apoptosis. *Toxicol. Ind. Health* 39, 388–397 (2023).
 171. Sassa, A. *et al.* Follow-up genotoxicity assessment of Ames-positive/equivocal chemicals using the improved thymidine kinase gene mutation assay in DNA repair-deficient human TK6 cells. *Mutagenesis* 36, 331–338 (2021).
 172. De Boeck, M. *et al.* Evaluation of p-phenylenediamine, o-phenylphenol sodium salt, and 2,4-diaminotoluene in the rat comet assay as part of the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM)-initiated international validation study of *in vivo* rat alkaline . *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 786–788, 151–157 (2015).
 173. Funch, A. B. *et al.* CD4^{+} T cells inhibit the generation of CD8^{+} epidermal-resident memory T cells directed against clinically relevant contact allergens. *Contact Dermatitis* 88, 425–437 (2023).
 174. Marín de Mas, I. *et al.* Unveiling the Metabolic Changes on Muscle Cell Metabolism Underlying p-Phenylenediamine Toxicity. *Front. Mol. Biosci.* 4, (2017).
 175. Farrell, J. *et al.* Investigation of the immunogenicity of p-phenylenediamine and Bandrowski's base in the mouse. *Toxicol. Lett.* 185, 153–159 (2009).
 176. Garrigue, J. *et al.* Optimization of the mouse ear swelling test for *in vivo* and *in vitro* studies of weak contact sensitizers *. *Contact Dermatitis* 30, 231–237 (1994).
 177. Kalish, R. S. & Wood, J. A. Sensitization of mice to paraphenylenediamine and structurally-

- related compounds: adjuvant effects of vitamin A supplementation. *Contact Dermatitis* 33, 407–413 (1995).
178. Kashima, R., Oyake, Y., Okada, J. & Ikeda, Y. Improved ex vivo/in vitro lymph node cell proliferation assay in guinea pigs for a screening test of contact hypersensitivity of chemical compounds. *Toxicology* 114, 47–55 (1996).
 179. Oh, J.-Y. *et al.* Protective effects of Ecklonia cava extract on the toxicity and oxidative stress induced by hair dye in in-vitro and in-vivo models. *J. Oceanol. Limnol.* 37, 909–917 (2019).
 180. Qin, M. *et al.* Application of the in vivo Pig-a gene mutation assay to test the potential genotoxicity of p-phenylenediamine. *Food Chem. Toxicol.* 123, 424–430 (2019).
 181. Wang, X. *et al.* Para -phenylenediamine deteriorates oocyte quality by impairing mitochondrial function. *Environ. Toxicol.* 37, 1803–1813 (2022).
 182. Meisser, S. S. *et al.* Skin barrier damage after exposure to paraphenylenediamine. *J. Allergy Clin. Immunol.* 145, 619–631.e2 (2020).
 183. Skazik, C. *et al.* Reactivity of in vitro activated human T lymphocytes to p -phenylenediamine and related substances. *Contact Dermatitis* 59, 203–211 (2008).
 184. LEE, O.-K. *et al.* Implication of microRNA regulation in para-phenylenediamine-induced cell death and senescence in normal human hair dermal papilla cells. *Mol. Med. Rep.* 12, 921–936 (2015).
 185. Hueber-Becker, F., Nohynek, G. J., Meuling, W. J. A., Benech-Kieffer, F. & Toutain, H. Human systemic exposure to a [14C]-para-phenylenediamine-containing oxidative hair dye and correlation with in vitro percutaneous absorption in human or pig skin. *Food Chem. Toxicol.* 42, 1227–1236 (2004).
 186. Heo, S.-J. *et al.* Effect of phlorotannins isolated from Ecklonia cava on melanogenesis and their protective effect against photo-oxidative stress induced by UV-B radiation. *Toxicol. Vitro.* 23, 1123–1130 (2009).
 187. Joe, M.-J. *et al.* The Inhibitory Effects of Eckol and Dieckol from Ecklonia stolonifera on the Expression of Matrix Metalloproteinase-1 in Human Dermal Fibroblasts. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 1735–1739 (2006).
 188. Ko, S.-C. *et al.* Protective effect of Ecklonia cava on UVB-induced oxidative stress: in vitro and in vivo zebrafish model. *J. Appl. Phycol.* 23, 697–708 (2011).
 189. Pallela, R., Na-Young, Y. & Kim, S.-K. Anti-photoaging and Photoprotective Compounds Derived from Marine Organisms. *Mar. Drugs* 8, 1189–1202 (2010).
 190. Asharani, P. V, Lian Wu, Y., Gong, Z. & Valiyaveetil, S. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology* 19, 255102 (2008).
 191. Kang, M.-C. *et al.* Antioxidant activity of polysaccharide purified from Acanthopanax koreanum Nakai stems in vitro and in vivo zebrafish model. *Carbohydr. Polym.* 127, 38–46 (2015).
 192. Li, K. *et al.* Developmental toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in zebrafish embryos. *Chemosphere* 171, 40–48 (2017).
 193. Jackson, E. M. Cellular and Molecular Events of Inflammation. *J. Toxicol. Cutan. Ocul. Toxicol.* 3, 347–356 (1984).
 194. Artik, S., Haarhuis, K., Wu, X., Begerow, J. & Gleichmann, E. Tolerance to Nickel: Oral Nickel Administration Induces a High Frequency of Anergic T Cells with Persistent Suppressor Activity. *J. Immunol.* 167, 6794–6803 (2001).
 195. Schwarz, A. *et al.* Ultraviolet Radiation-Induced Regulatory T Cells Not Only Inhibit the Induction but Can Suppress the Effector Phase of Contact Hypersensitivity. *J. Immunol.* 172, 1036–1043 (2004).

196. Faria, A. M. C. & Weiner, H. L. Oral tolerance. *Immunol. Rev.* 206, 232–259 (2005).
197. Funch, A. B. *et al.* CD8 + tissue-resident memory T cells recruit neutrophils that are essential for flare-ups in contact dermatitis. *Allergy* 77, 513–524 (2022).
198. Mahnke, K. *et al.* Down-Regulation of CD62L Shedding in T Cells by CD39+ Regulatory T Cells Leads to Defective Sensitization in Contact Hypersensitivity Reactions. *J. Invest. Dermatol.* 137, 106–114 (2017).
199. Ring, S., Schäfer, S. C., Mahnke, K., Lehr, H. & Enk, A. H. CD4 + CD25 + regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions by blocking influx of effector T cells into inflamed tissue. *Eur. J. Immunol.* 36, 2981–2992 (2006).
200. Ring, S., Karakhanova, S., Johnson, T., Enk, A. H. & Mahnke, K. Gap junctions between regulatory T cells and dendritic cells prevent sensitization of CD8+ T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, 237–246.e7 (2010).
201. Watanabe, H., Unger, M., Tuvel, B., Wang, B. & Sauder, D. N. Review: Contact Hypersensitivity: The Mechanism of Immune Responses and T Cell Balance. *J. Interf. Cytokine Res.* 22, 407–412 (2002).
202. Copple, B. L. Endothelial Cell Injury and Fibrin Deposition in Rat Liver after Monocrotaline Exposure. *Toxicol. Sci.* 65, 309–318 (2002).
203. Hooff, G. P. *et al.* Analytical Investigations of Toxic p-Phenylenediamine (PPD) Levels in Clinical Urine Samples with Special Focus on MALDI-MS/MS. *PLoS One* 6, e22191 (2011).
204. Hashim, M. S., Hamza, Y. O., Yahia, B., Khogali, F. M. & Sulieman, G. I. Poisoning from henna dye and para-phenylenediamine mixtures in children in Khartoum. *Ann. Trop. Paediatr.* 12, 3–6 (1992).
205. Suliman, S. M., Homeida, M. & Aboud, O. I. Paraphenylenediamine Induced Acute Tubular Necrosis Following Hair Dye Ingestion. *Hum. Toxicol.* 2, 633–635 (1983).
206. Ito, Y. *et al.* Mechanisms and pathophysiological implications of sinusoidal endothelial cell gap formation following treatment with galactosamine/endotoxin in mice. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 291, G211–G218 (2006).
207. Jaeschke, H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 284, G15–G26 (2003).
208. Jaeschke, H. & Smith, C. W. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J. Leukoc. Biol.* 61, 647–653 (1997).
209. Aziz, N. *et al.* Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertil. Steril.* 81, 349–354 (2004).
210. Murata, M., Nishimura, T., Chen, F. & Kawanishi, S. Oxidative DNA damage induced by hair dye components ortho-phenylenediamines and the enhancement by superoxide dismutase. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 607, 184–191 (2006).
211. Picardo, M., Cannistraci, C., Cristaudo, A., De Luca, C. & Santucci, B. Study on Cross-Reactivity to the Para Group. *Dermatology* 181, 104–108 (1990).
212. Kömhoff, M. *et al.* Enhanced Expression of Cyclooxygenase-2 in High Grade Human Transitional Cell Bladder Carcinomas. *Am. J. Pathol.* 157, 29–35 (2000).
213. Yoshimura, R. *et al.* Expression of cyclooxygenase-2 in patients with bladder carcinoma. *J. Urol.* 165, 1468–72 (2001).
214. Antoon, J. W. *et al.* MEK5/ERK5 Signaling Suppresses Estrogen Receptor Expression and Promotes Hormone-Independent Tumorigenesis. *PLoS One* 8, e69291 (2013).
215. Simões, A. E. S. *et al.* Aberrant MEK5/ERK5 signalling contributes to human colon cancer progression via NF-κB activation. *Cell Death Dis.* 6, e1718–e1718 (2015).

216. Aeby, P., Sieber, T., Beck, H., Frank Gerberick, G. & Goebel, C. Skin Sensitization to p-Phenylenediamine: The Diverging Roles of Oxidation and N-Acetylation for Dendritic Cell Activation and the Immune Response. *J. Invest. Dermatol.* 129, 99–109 (2009).
217. Lepoittevin, J. Metabolism versus chemical transformation or pro- versus prehapten? *Contact Dermatitis* 54, 73–74 (2006).
218. Landsteiner, K. & Jacobs, J. STUDIES ON THE SENSITIZATION OF ANIMALS WITH SIMPLE CHEMICAL COMPOUNDS. II. *J. Exp. Med.* 64, 625–639 (1936).
219. Weltzien, H. U. *et al.* T cell immune responses to haptens. Structural models for allergic and autoimmune reactions. *Toxicology* 107, 141–151 (1996).
220. Zanni, M. P. *et al.* HLA-restricted, processing- and metabolism-independent pathway of drug recognition by human alpha beta T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 102, 1591–1598 (1998).
221. Sieben, S., Kawakubo, Y., Masaoudi, T. Al, Merk, H. F. & Blömeke, B. Delayed-type hypersensitivity reaction to paraphenylenediamine is mediated by 2 different pathways of antigen recognition by specific $\alpha\beta$ + human T-cell clones. *J. Allergy Clin. Immunol.* 109, 1005–1011 (2002).
222. Salerno, A., Dieli, F., Sireci, G., Bellavia, A. & Asherson, G. L. Interleukin-4 is a critical cytokine in contact sensitivity. *Immunology* 84, 404–9 (1995).
223. Asherson, G. L., Dieli, F., Sireci, G. & Salerno, A. Role of IL-4 in delayed type hypersensitivity. *Clin. Exp. Immunol.* 103, 1–4 (2003).
224. NEIS, M. *et al.* Enhanced expression levels of IL-31 correlate with IL-4 and IL-13 in atopic and allergic contact dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118, 930–937 (2006).
225. Torikai, E., Kageyama, Y., Suzuki, M., Ichikawa, T. & Nagano, A. The effect of infliximab on chemokines in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* 26, 1088–1093 (2007).
226. Vilá, L. M. *et al.* Association of serum MIP-1 α , MIP-1 β , and RANTES with clinical manifestations, disease activity, and damage accrual in systemic lupus erythematosus. *Clin. Rheumatol.* 26, 718–722 (2007).
227. Keilin, D. & Hartree, E. F. Cytochrome and cytochrome oxidase. *Proc. R. Soc. London. Ser. B - Biol. Sci.* 127, 167–191 (1939).
228. Packer, L. & Mustafa, M. G. Pathways of electron flow established by tetramethyl-phenylenediamine in mitochondria and ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta - Enzymol. Biol. Oxid.* 113, 1–12 (1966).
229. Lee, C., Sottocasa, G. L. & Ernster, L. [5] Use of artificial electron acceptors for abbreviated phosphorylating electron transport: Flavin-cytochrome c. in 33–37 (1967). doi:10.1016/0076-6879(67)10008-6.
230. Akdis, M., Palomares, O., van de Veen, W., van Splunter, M. & Akdis, C. A. TH17 and TH22 cells: A confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129, 1438–1449 (2012).
231. Cavani, A., Pennino, D. & Eyerich, K. Th17 and Th22 in Skin Allergy. in *Chem Immunol Allergy. Basel, Karger* vol. 96 39–44 (2012).
232. Cho, K.-A., Suh, J. W., Lee, K. H., Kang, J. L. & Woo, S.-Y. IL-17 and IL-22 enhance skin inflammation by stimulating the secretion of IL-1 β by keratinocytes via the ROS-NLRP3-caspase-1 pathway. *Int. Immunol.* 24, 147–158 (2012).
233. Eyerich, S., Eyerich, K., Cavani, A. & Schmidt-Weber, C. IL-17 and IL-22: siblings, not twins. *Trends Immunol.* 31, 354–361 (2010).
234. Faizi, M. *et al.* Toxicity of cuprizone a Cu 2+ chelating agent on isolated mouse brain mitochondria: a justification for demyelination and subsequent behavioral dysfunction. *Toxicol. Mech. Methods* 26, 276–283 (2016).

235. Panfili, E., Esposito, S. & Di Cara, G. Temporary Black Henna Tattoos and Sensitization to para-Phenylenediamine (PPD): Two Paediatric Case Reports and a Review of the Literature. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14, 421 (2017).
236. McFadden, J. P., Yeo, L. & White, J. L. Clinical and experimental aspects of allergic contact dermatitis to para-phenylenediamine. *Clin. Dermatol.* 29, 316–324 (2011).
237. Sætterstrøm, B., Olsen, J. & Johansen, J. D. Cost-of-illness of patients with contact dermatitis in Denmark. *Contact Dermatitis* 71, 154–161 (2014).
238. Kligman, A. M. The Identification of Contact Allergens by Human Assay. *J. Invest. Dermatol.* 47, 375–392 (1966).
239. Uter, W., Lessmann, H., Geier, J. & Schnuch, A. Contact allergy to ingredients of hair cosmetics in female hairdressers and clients – an 8-year analysis of IVDK* data. *Contact Dermatitis* 49, 236–240 (2003).
240. Diepgen, T. L. *et al.* Prevalence of Contact Allergy to p-Phenylenediamine in the European General Population. *J. Invest. Dermatol.* 136, 409–415 (2016).
241. Lind, M., Johnsson, S., Lidén, C., Meding, B. & Boman, A. Hairdressers' skin exposure to hair dyes during different hair dyeing tasks. *Contact Dermatitis* 77, 303–310 (2017).
242. Jenkinson, C. *et al.* Characterization of p-Phenylenediamine–Albumin Binding Sites and T-Cell Responses to Hapten-Modified Protein. *J. Invest. Dermatol.* 130, 732–742 (2010).
243. Malajian, D. & Belsito, D. V. Cutaneous delayed-type hypersensitivity in patients with atopic dermatitis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 69, 232–237 (2013).
244. De Benedetto, A. *et al.* Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127, 773–786.e7 (2011).
245. Suárez-Fariñas, M. *et al.* RNA sequencing atopic dermatitis transcriptome profiling provides insights into novel disease mechanisms with potential therapeutic implications. *J. Allergy Clin. Immunol.* 135, 1218–1227 (2015).
246. Ross-Hansen, K. *et al.* The role of glutathione S-transferase and claudin-1 gene polymorphisms in contact sensitization: a cross-sectional study. *Br. J. Dermatol.* 168, 762–770 (2013).
247. Andersen, Y. M. F. *et al.* Filaggrin loss-of-function mutations, atopic dermatitis and risk of actinic keratosis: results from two cross-sectional studies. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* 31, 1038–1043 (2017).
248. Heede, N. G. *et al.* Health-related quality of life in adult dermatitis patients stratified by filaggrin genotype. *Contact Dermatitis* 76, 167–177 (2017).
249. Pellerin, L. *et al.* Defects of filaggrin-like proteins in both lesional and nonlesional atopic skin. *J. Allergy Clin. Immunol.* 131, 1094–1102 (2013).
250. Thyssen, J. P. *et al.* Filaggrin mutations are strongly associated with contact sensitization in individuals with dermatitis. *Contact Dermatitis* 68, 273–276 (2013).
251. Lee, J.-Y. J., Miller, J. A., Basu, S., Kee, T.-Z. V. & Loo, L.-H. Building predictive *in vitro* pulmonary toxicity assays using high-throughput imaging and artificial intelligence. *Arch. Toxicol.* 92, 2055–2075 (2018).

Anexo 1. Descrição da busca de artigos.

Tabela A1. Termos de busca usados em cada base de dados e números de artigos encontrados (continua).

Base de dados pesquisada	Termos de busca utilizados	Número de artigos encontrados
Pubmed	((PPD) AND (cosmetic)) AND (toxicity)	46
	((Paraphenylenediamine) AND (Cosmetic)) AND (Toxicity)	71
	((PPD) AND (Tattoo)) AND (Toxicity)	5
	((PPD) AND (henna)) AND (toxicity)	12
	((Paraphenylenediamine) AND (tatto)) AND (toxicity)	7
	((Paraphenylenediamine) AND (henna)) AND (toxicity)	19
	((PPD) AND (<i>in vivo</i>) AND (toxicity)	49
	((PPD) AND (<i>in vitro</i>) AND (toxicity)	88
	((Paraphenylenediamine) AND (<i>in vivo</i>) AND (toxicity)	28
Embase	((Paraphenylenediamine) AND (<i>in vitro</i>) AND (toxicity)	63
	ppd AND ('cosmetic'/exp OR cosmetic) AND ('toxicity'/exp OR toxicity)	161
	ppd AND tatto AND ('toxicity'/exp OR toxicity)	1
	ppd AND ('henna'/exp OR henna) AND ('toxicity'/exp OR toxicity)	56
	ppd AND (' <i>in vivo</i> '/exp OR ' <i>in vivo</i> ') AND ('toxicity'/exp OR toxicity)	71
	ppd AND (' <i>in vitro</i> '/exp OR ' <i>in vitro</i> ') AND ('toxicity'/exp OR toxicity)	275
	('paraphenylenediamine'/exp OR paraphenylenediamine) AND ('cosmetic'/exp OR cosmetic) AND ('toxicity'/exp OR toxicity)	367
	('paraphenylenediamine'/exp OR paraphenylenediamine) AND ('tattoo'/exp OR tattoo) AND ('toxicity'/exp OR toxicity)	67
	('paraphenylenediamine'/exp OR paraphenylenediamine) AND ('henna'/exp OR henna) AND ('toxicity'/exp OR toxicity)	101
	('paraphenylenediamine'/exp OR paraphenylenediamine) AND (' <i>in vivo</i> '/exp OR ' <i>in vivo</i> ') AND ('toxicity'/exp OR toxicity)	54

Tabela A1. Termos de busca usados em cada base de dados e números de artigos encontrados (continuação).

Base de dados pesquisada	Termos de busca utilizados	Número de artigos encontrados
Embase	('paraphenylenediamine'/exp OR paraphenylenediamine) AND ('in vitro'/exp OR 'in vitro') AND ('toxicity'/exp OR toxicity)	214
	PPD, cosmetic e toxicity (article title, abstract and keywords)	15
	PPD, tattoo e toxicity (article title, abstract and keywords)	5
	PPD, henna e toxicity (article title, abstract and keywords)	9
	PPD, "in vivo" e toxicity (article title, abstract and keywords)	39
	PPD, "in vitro" e toxicity (article title, abstract and keywords)	69
Scopus	Paraphenylenediamine, cosmetic e toxicity (article title, abstract and keywords)	9
	Paraphenylenediamine, tattoo e toxicity (article title, abstract and keywords)	2
	Paraphenylenediamine, henna e toxicity (article title, abstract and keywords)	8
	Paraphenylenediamine, "in vivo" e toxicity (article title, abstract and keywords)	3
	Paraphenylenediamine, "in vitro" e toxicity (article title, abstract and keywords)	4
	(ppp) AND (cosmetic) AND (toxicity)	0
	(PPD) AND (TATTOO) AND (TOXICITY)	0
LILICAS (inglês) (BVS)	(PPD) AND (HENNA) AND (TOXICITY)	0
	(PPD) AND ('IN VIVO) AND (TOXICITY)	0
	(PPD) AND ('IN VITRO) AND (TOXICITY)	0

Tabela A1. Termos de busca usados em cada base de dados e números de artigos encontrados (continuação).

Base de dados pesquisada	Termos de busca utilizados	Número de artigos encontrados
LILICAS (inglês) (BVS)	(Paraphenylenediamine) AND (cosmetic) AND (toxicity)	0
	(Paraphenylenediamine) AND (tattoo) AND (toxicity)	0
	(Paraphenylenediamine) AND (henna) AND (toxicity)	0
	(Paraphenylenediamine) AND ("in vivo") AND (toxicity)	0
	(Paraphenylenediamine) AND ("in vitro") AND (toxicity)	0
LILICAS (português) (BVS)	(PPD) AND (COSMETICO) AND (TOXICIDADE)	0
	(PPD) AND (TATUAGEM) AND (TOXICIDADE)	0
	(PPD) AND (HENA) AND (TOXICIDADE)	0
	(PPD) AND ("IN VIVO") AND (TOXICIDADE)	0
	(PPD) AND ("IN VITRO") AND (TOXICIDADE)	0
	(Parafenilenodiamina) AND (cosmetico) AND (toxicidade)	0
	(Parafenilenodiamina) AND (tatuagem) AND (toxicidade)	0
	(Parafenilenodiamina) AND (hena) AND (toxicidade)	0
	(Parafenilenodiamina) AND ("in vivo") AND (toxicidade)	0
	(Parafenilenodiamina) AND ("in vitro") AND (toxicidade)	0
MEDLINE (inglês) (BVS)	(ppp) AND (cosmetic) AND (toxicity)	1
	(PPD) AND (TATTOO) AND (TOXICITY)	4
	(PPD) AND (HENNA) AND (TOXICITY)	9
	(PPD) AND ('IN VIVO) AND (TOXICITY)	46

Tabela A1. Termos de busca usados em cada base de dados e números de artigos encontrados (continuação).

Base de dados pesquisada	Termos de busca utilizados	Número de artigos encontrados
MEDLINE (inglês) (BVS)	(PPD) AND (' <i>IN VITRO</i> ') AND (TOXICITY)	74
	(Paraphenylenediamine) AND (cosmetic) AND (toxicity)	5
	(Paraphenylenediamine) AND (tattoo) AND (toxicity)	3
	(Paraphenylenediamine) AND (henna) AND (toxicity)	10
	(Paraphenylenediamine) AND (" <i>in vivo</i> ") AND (toxicity)	4
	(Paraphenylenediamine) AND (" <i>in vitro</i> ") AND (toxicity)	9
MEDLINE (português) (BVS)	(PPD) AND (COSMETICO) AND (TOXICIDADE)	2
	(PPD) AND (TATUAGEM) AND (TOXICIDADE)	2
	(PPD) AND (HENA) AND (TOXICIDADE)	0
	(PPD) AND (" <i>IN VIVO</i> ") AND (TOXICIDADE)	27
	(PPD) AND (" <i>IN VITRO</i> ") AND (TOXICIDADE)	49
	(Parafenilenodiamina) AND (cosmetico) AND (toxicidade)	0
	(Parafenilenodiamina) AND (tatuagem) AND (toxicidade)	0
	(Parafenilenodiamina) AND (hena) AND (toxicidade)	0
	(Parafenilenodiamina) AND (" <i>in vivo</i> ") AND (toxicidade)	0
	(Parafenilenodiamina) AND (" <i>in vitro</i> ") AND (toxicidade)	0
Google Scholar 1	ppd AND cosmetic AND toxicity, filetype:pdf	823 encontrados, 150 selecionados
Google Scholar 2	paraphenylenediamine AND cosmetic AND toxicity, filetype:pdf	339 encontrados, 150 selecionados

Anexo 2. Artigos excluídos da revisão e motivo da exclusão.

Tabela A2. Artigos excluídos após a leitura na íntegra e motivos da exclusão.

Artigos	Motivo de exclusão
Ahmed et al., 2010 ¹ Antelmi et al., 2022 ² An et al., 2011 ³ So et al., 2011 ⁴ Zanoni et al., 2017 ⁵ Katsarou et al., 1995 ⁶	Resumo Publicado em Congresso
Merk, 2002 ⁷ Giles Jr et al., 1976 ⁸	Revisão da literatura
Chung et al., 2000 ⁹ Suter et al., 1996 ¹⁰ Dossou et al., 1985 ¹¹	Não avaliava a PPD mas sim outros compostos
Geppert et al., 2020 ¹² Venkatesan et al., 2019 ¹³ Uter et al., 2003 ¹⁴ Li et al., 2004 ¹⁵ Nohynek et al., 2015 ¹⁶ Raghu et al., 2013 ¹⁷ Han et al., 2018 ¹⁸ Sutthipisal et al., 1992 ¹⁹ Hueber-Becker et al., 2006 ²⁰ Emmons et al., 1985 ²¹ Nawalage et al., 2020 ²² Hooff et al., 2011 ²³ Hueber-Becker et al., 2004 ²⁴	Estudo não é um ensaio clínico ou estudo experimental <i>in vivo</i> ou <i>in vitro</i>
Pronk et al., 2011 ²⁵ Yokozeki et al., 1995 ²⁶ Park et al., 2018 ²⁷ Burnett et al., 1988 ²⁸ Manjunatha et al., 2020 ²⁹ He et al., 2023 ³⁰ Xing et al., 2006 ³¹ Gradin et al., 2020 ³² Lee et al., 2018 ³³ Sangeetha et al., 2010 ³⁴ Kock et al., 2015 ³⁵ Amo et al., 1988 ³⁶ George et al., 1996 ³⁷	Resultados não apresentavam dados para a PPD
Jain et al., 2013 ³⁸ Mathur et al., 2005 ³⁹ Bai et al., 2012 ⁴⁰ Nadeem et al., 2001 ⁴¹ Hoting et al., 1995 ⁴² Kawakubo et al., 2000 ⁴³	Artigos que não foram encontrados para leitura na íntegra
Cho et al., 2003 ⁴⁴ Burneit et al., 1975 ⁴⁵	Não foram possíveis associar os resultados descritos à PPD
Wang et al., 2003 ⁴⁶ Dressler et al., 2006 ⁴⁷ Kawakubo et al., 1997 ⁴⁸ Stanley et al., 2005 ⁴⁹ Föllmann et al., 2012 ⁵⁰ Calabrese et al., 1988 ⁵¹ Nohynek, et al., 2005 ⁵²	Resultados apresentados eram do metabolismo, e não de efeitos tóxicos

Referências Bibliográfica

1. Abstracts. (2010). *Clinical Toxicology*, 48(6), 604–667. <https://doi.org/10.3109/15563650.2010.493290>.
2. Abstracts. (2022). *Contact Dermatitis* Volume 86, Issue S1 p. 7-38. DOI: 10.1111/cod.14095.
3. S. An; S. Kim; K.M. Jung; K.M. Lim; T.R. Lee; H.K. Kim. (2010). Evaluation of a substance's inhibition effect on the PPD induced skin sensitization using the human monocytic leukaemia cell line, THP-1. , 196(suppl-S), 0–. doi:10.1016/j.toxlet.2010.03.475.
4. Abstracts. (2011). *Toxicology and Environmental Health Sciences* 2011 3 (S79) SUPPL. 1. PUI: L72038850.
5. Abstracts. (2017) *Nederlands Tijdschrift voor Dermatologie en Venereologie* 2017 27:1 (45-46). PUI: L620505610.
6. A. Katsarou; B. Koufou; K. Takou; D. Kalogeromitros; G. Papanayiotou; A. Vareltzidis. (1995). Patch test results in hairdressers with contact dermatitis in Greece (1985–1994). , 33(5), 347–348. doi:10.1111/j.1600-0536.1995.tb02050.x.
7. Merk H.F. (2002). Allergie contact dermatitic. *H+G Zeitschrift fur Hautkrankheiten* 2002 77:10 (466-472). 10.1046/j.1439-0353.2002.02601.x
8. Giles Jr A.L.; Chung C.W.; Kommineni C. (1976). Dermal carcinogenicity study by mouse skin painting with 2,4 toluenediamine alone or in representative hair dye formulations. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 1976 1:3 (433-440). PUI: L7017735.
9. Chung K, Hughes TJ, Claxton LD. Comparison of the mutagenic specificity induced by four nitro-group-containing aromatic amines in *Salmonella typhimurium* his genes. *Mutat Res*. 2000 Feb 16;465(1-2):165-71. doi: 10.1016/s1383-5718(99)00225-9. PMID: 10708983.
10. Suter W, Ahiabor R, Blanco B, Locher F, Mantovani F, Robinson M, Sreenan G, Staedtler F, Swingler T, Vignutelli A, Perentes E. Evaluation of the *in vivo* genotoxic potential of three carcinogenic aromatic amines using the Big Blue transgenic mouse mutation assay. *Environ Mol Mutagen*. 1996;28(4):354-62. doi: 10.1002/(SICI)1098-2280(1996)28:4<354::AID-EM9>3.0.CO;2-B. PMID: 8991064.
11. Dossou KG, Sicard C, Kalopissis G, Reymond D, Schaefer H. Method for assessment of experimental allergy in guinea pigs adapted to cosmetic ingredients. *Contact Dermatitis*. 1985 Oct;13(4):226-34. doi: 10.1111/j.1600-0536.1985.tb02555.x. PMID: 4085222.
12. Geppert M, Schwarz A, Stangassinger LM, Wenger S, Wienerroither LM, Ess S, Duschl A, Himly M. Interactions of TiO₂ Nanoparticles with Ingredients from Modern Lifestyle Products and Their Effects on Human Skin Cells. *Chem Res Toxicol*. 2020 May 18;33(5):1215-1225. doi: 10.1021/acs.chemrestox.9b00428. Epub 2020 Mar 5. PMID: 32088960; PMCID: PMC7238409.
13. Venkatesan G.; Dancik Y.; Sinha A.; Bigliardi M.; Srinivas R.; Dawson T.; Valiyaveetil S.; Bigliardi P.; Pastorin G.; (2019). Facile synthesis of oligo anilines as permanent hair dyes: How chemical modifications impart colour and avoid toxicity. *New Journal of Chemistry* 2019 43:41 (16188-16199). 10.1039/c9nj03362a
14. Uter W, Lessmann H, Geier J, Schnuch A. Contact allergy to ingredients of hair cosmetics in female hairdressers and clients--an 8-year analysis of IVDK data. *Contact Dermatitis*. 2003 Nov;49(5):236-40. doi: 10.1111/j.0105-1873.2003.0233.x. PMID: 14996045.
15. Li LF, Guo J, Wang J. Environmental contact factors in eczema and the results of patch testing Chinese patients with a modified European standard series of allergens. *Contact Dermatitis*. 2004 Jul;51(1):22-5. doi: 10.1111/j.0105-1873.2004.00369.x. PMID: 15291828.
16. Nohynek GJ, Skare JA, Meuling WJA, Wehmeyer KR, de Bie ATHJ, Vaes WHJ, Dufour EK, Fautz R, Steiling W, Bramante M, Toutain H. Human systemic exposure to [¹⁴C]-paraphenylenediamine-containing oxidative hair dyes: Absorption, kinetics, metabolism, excretion and safety assessment. *Food Chem Toxicol*. 2015 Jul;81:71-80. doi: 10.1016/j.fct.2015.04.003. Epub 2015 Apr 3. PMID: 25846501.
17. Raghu K.; Rama Mohan P.; Satish Kumar S.; Srinivas M.; Rajashekar S.T.; Subramanyam B.V.; Buchineni M.; (2013). N Acetyl Cysteine treatment plus standard care reduces duration of mechanical ventilation in hair dye poisoning. *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research* 2013 5:1 (26-29). PUI: L368516945.
18. Han JH, Lee HJ, Bang CH, Lee JH, Park YM, Lee JY. P-Phenylenediamine Hair Dye Allergy and Its Clinical Characteristics. *Ann Dermatol*. 2018 Jun;30(3):316-321. doi: 10.5021/ad.2018.30.3.316. Epub 2018 Apr 23. PMID: 29853746; PMCID: PMC5929949.

19. Sutthipisal N, McFadden JP, Cronin E. Sensitization in atopic and non-atopic hairdressers with hand eczema. *Contact Dermatitis*. 1993 Oct;29(4):206-9. doi: 10.1111/j.1600-0536.1993.tb03539.x. PMID: 8281785.
20. Hueber-Becker F, Nohynek GJ, Dufour EK, Meuling WJ, de Bie AT, Toutain H, Bolt HM. Occupational exposure of hairdressers to [14C]-para-phenylenediamine-containing oxidative hair dyes: a mass balance study. *Food Chem Toxicol*. 2007 Jan;45(1):160-9. doi: 10.1016/j.fct.2006.08.002. Epub 2006 Aug 30. PMID: 17030383.
21. Emmons WW, Marks JG Jr. Immediate and delayed reactions to cosmetic ingredients. *Contact Dermatitis*. 1985 Oct;13(4):258-65. doi: 10.1111/j.1600-0536.1985.tb02560.x. PMID: 4085225.
22. Nawalage SK, Pathiratne A. Application of cytogenetic model *Allium cepa* for screening potential cytogenotoxicity of herbal-based hair dyes. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*. 2020;55(11):1366-1372. doi: 10.1080/10934529.2020.1795502. Epub 2020 Jul 20. PMID: 32684077.
23. Hooff GP, van Huizen NA, Meesters RJ, Zijlstra EE, Abdelraheem M, Abdelraheem W, Hamdouk M, Lindemans J, Luiders TM. Analytical investigations of toxic p-phenylenediamine (PPD) levels in clinical urine samples with special focus on MALDI-MS/MS. *PLoS One*. 2011;6(8):e22191. doi: 10.1371/journal.pone.0022191. Epub 2011 Aug 4. PMID: 21829608; PMCID: PMC3150356.
24. Frédérique Hueber-Becker; Gerhard J. Nohynek; Wim J.A. Meuling; Florence Benech-Kieffer; Hervé Toutain. (2004). Human systemic exposure to a [14C]-para-phenylenediamine-containing oxidative hair dye and correlation with *in vitro* percutaneous absorption in human or pig skin. , 42(8), 0–1236. doi:10.1016/j.fct.2004.02.020.
25. Pronk TE, van der Veen JW, Ezendam J, Van Loveren H, Pennings JL. Effects of pooling RNA from samples treated with different compounds for determining class specific biomarkers and processes in toxicogenomics. *Toxicol In vitro*. 2011 Dec;25(8):1841-7. doi: 10.1016/j.tiv.2011.05.012. Epub 2011 May 19. PMID: 21620947.
26. Yokozeki H, Katayama I, Nishioka K. Experimental study for the development of an *in vitro* test for contact allergens. 1. Primary activation of hapten-specific T cells by hapten-conjugated epidermal cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 1995 Apr;106(4):394-400. doi: 10.1159/000236872. PMID: 7536503.
27. Park H, Hwang JH, Han JS, Lee BS, Kim YB, Joo KM, Choi MS, Cho SA, Kim BH, Lim KM. Skin irritation and sensitization potential of oxidative hair dye substances evaluated with *in vitro*, *in chemico* and *in silico* test methods. *Food Chem Toxicol*. 2018 Nov;121:360-366. doi: 10.1016/j.fct.2018.09.017. Epub 2018 Sep 11. PMID: 30213554.
28. Burnett CM, Goldenthal EI. Multigeneration reproduction and carcinogenicity studies in Sprague-Dawley rats exposed topically to oxidative hair-colouring formulations containing p-phenylenediamine and other aromatic amines. *Food Chem Toxicol*. 1988 May;26(5):467-74. doi: 10.1016/0278-6915(88)90059-2. PMID: 3391471.
29. Manjunatha B, Han L, Kundapur RR, Liu K, Lee SJ. Herbul black henna (hair dye) causes cardiovascular defects in zebrafish (*Danio rerio*) embryo model. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2020 Apr;27(12):14150-14159. doi: 10.1007/s11356-020-07762-z. Epub 2020 Feb 10. PMID: 32040736.
30. He W, Gu A, Wang D. Four-week repeated exposure to tire-derived 6-PPD quinone causes multiple organ injury in male BALB/c mice. *Sci Total Environ*. 2023 Oct 10;894:164842. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.164842. Epub 2023 Jun 17. PMID: 37336398.
31. Xing JZ, Zhu L, Gabos S, Xie L. Microelectronic cell sensor assay for detection of cytotoxicity and prediction of acute toxicity. *Toxicol In vitro*. 2006 Sep;20(6):995-1004. doi: 10.1016/j.tiv.2005.12.008. Epub 2006 Feb 14. PMID: 16481145.
32. Gradin R, Johansson A, Forreryd A, Aaltonen E, Jerre A, Larne O, Mattson U, Johansson H. The GARDpotency Assay for Potency-Associated Subclassification of Chemical Skin Sensitizers-Rationale, Method Development, and Ring Trial Results of Predictive Performance and Reproducibility. *Toxicol Sci*. 2020 Aug 1;176(2):423-432. doi: 10.1093/toxsci/kfaa068. PMID: 32421796; PMCID: PMC7416325.
33. Lee JJ, Miller JA, Basu S, Kee TV, Loo LH. Building predictive *in vitro* pulmonary toxicity assays using high-throughput imaging and artificial intelligence. *Arch Toxicol*. 2018 Jun;92(6):2055-2075. doi: 10.1007/s00204-018-2213-0. Epub 2018 Apr 28. PMID: 29705884; PMCID: PMC6002469.

34. Sangeetha R.; Karthi N.; (2010) Topical application of hair dye containing paraphenylenediamine - evaluation of antioxidant status and renal parameters in diabetic and non-diabetic users. *Pharmacologyonline* 2010 3 (285-290). PUI: L361020090
35. Kock M, Coenraads PJ, Blömeke B, Goebel C. Continuous usage of a hair dye product containing 2-methoxymethyl-para-phenylenediamine by hair-dye-allergic individuals. *Br J Dermatol.* 2016 May;174(5):1042-50. doi: 10.1111/bjd.14390. Epub 2016 Mar 27. PMID: 26749506.
36. Amo H, Matsuyama M, Amano H, Yamada C, Kawai M, Miyata N, Nakadate M. Carcinogenicity and toxicity study of m-phenylenediamine administered in the drinking-water to (C57BL/6 x C3H/He)F1 mice. *Food Chem Toxicol.* 1988 Nov-Dec;26(11-12):893-7. doi: 10.1016/0278-6915(88)90086-5. PMID: 3209129.
37. George J, Kuttan R. Lack of induction of chromosome aberrations and micronuclei by N-(1,3-dimethylbutyl)-N-phenylparaphenylenediamine in mouse bone marrow cells. *Mutat Res.* 1996 Oct 1;370(3-4):191-4. doi: 10.1016/s0165-1218(96)00072-9. PMID: 8917665.
38. Jain PK, Sharma AK, Agarwal N, Jain PK, Sengar NS, Agarwal N, Siddiqui MZ, Pawal P, Singh AK, Gaba RD. A prospective clinical study of myocarditis in cases of acute ingestion of paraphenylenediamine (hair dye) poisoning in northern India. *J Assoc Physicians India.* 2013 Sep;61(9):633-6, 644. PMID: 24772701.
39. Mathur AK, Raizada RB, Srivastava MK, Singh A. Effect of dermal exposure to paraphenylenediamine and linear alkylbenzene sulphonate in guinea pigs. *Biomed Environ Sci.* 2005 Aug;18(4):238-40. PMID: 16274105.
40. Bai YH, Peng YM, Yin WQ, Liu H, Liu FY, Duan SB, Xiao P. p-Aminophenol and p-paraphenylenediamine induce injury and apoptosis of human HK-2 proximal tubular epithelial cells. *J Nephrol.* 2012 Jul-Aug;25(4):481-9. doi: 10.5301/JN.2011.8495. PMID: 21786225.
41. Nadeem M.; Akbar T.; Haroon T.S.; (2001). Patch testing with European standard series our experience at Mayo Hospital, Lahore. *Journal of Pakistan Association of Dermatologists* 2001 11:OCT./DEC. (7-12). PUI: L34764089.
42. Hoting E.; Baum C.; Schulz K.-H.; (1995). Studies on the cross-allergenic potential of amino- and nitrosubstituted aromatic compounds. *Dermatosen in Beruf und Umwelt* 1995 43:2 (50-58). PUI: L25128108.
43. Kawakubo Y, Merk HF, Masaoudi TA, Sieben S, Blömeke B. N-Acetylation of paraphenylenediamine in human skin and keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000 Jan;292(1):150-5. PMID: 10604942.
44. Cho JA, Oh E, Lee E, Sul D. Effects of hair dyeing on DNA damage in human lymphocytes. *J Occup Health.* 2003 Nov;45(6):376-81. doi: 10.1539/joh.45.376. PMID: 14676417.
45. Burnett C, Lanman B, Giovacchini R, Wolcott G, Scala R, Keplinger M. Long-term toxicity studies on oxidation hair dyes. *Food Cosmet Toxicol.* 1975 Jun;13(3):353-7. doi: 10.1016/s0015-6264(75)80299-9. PMID: 1158323.
46. Wang LH, Tsai SJ. Simultaneous determination of oxidative hair dye p-phenylenediamine and its metabolites in human and rabbit biological fluids. *Anal Biochem.* 2003 Jan 15;312(2):201-7. doi: 10.1016/s0003-2697(02)00501-8. PMID: 12531206.
47. Dressler WE, Appelqvist T. Plasma/blood pharmacokinetics and metabolism after dermal exposure to para-aminophenol or para-phenylenediamine. *Food Chem Toxicol.* 2006 Mar;44(3):371-9. doi: 10.1016/j.fct.2005.08.009. Epub 2005 Oct 18. PMID: 16239057.
48. Kawakubo Y, Nakamori M, Schöpf E, Ohkido M. Acetylator phenotype in patients with p-phenylenediamine allergy. *Dermatology.* 1997;195(1):43-5. doi: 10.1159/000245683. PMID: 9267736.
49. Lesley A. Stanley; Julie A. Skare; Edward Doyle; Robert Powrie; Diane D'Angelo; Clifford R. Elcombe. (2005). Lack of evidence for metabolism of p-phenylenediamine by human hepatic cytochrome P450 enzymes. , 210(2-3), 147–157. doi:10.1016/j.tox.2005.01.019.
50. Föllmann W, Blaszkewicz M, Behm C, Degen GH, Golka K. N-Acetylation of p-aminobenzoic acid and p-phenylenediamine in primary porcine urinary bladder epithelial cells and in the human urothelial cell line 5637. *J Toxicol Environ Health A.* 2012;75(19-20):1206-15. doi: 10.1080/15287394.2012.709167. PMID: 22994574.
51. Calabrese, Edward J.; Tilli, Frank; Horton, Holly M.; Stoddard, Anne . (1988). The effects of ethanol on the hematotoxicity of twelve pharmaceutical and environmental agents. *Journal of Environmental Science and Health . Part A: Environmental Science and Engineering*, 23(4), 359–367. doi:10.1080/10934528809375417.

52. Nohynek GJ, Duche D, Garrigues A, Meunier PA, Toutain H, Leclaire J. Under the skin: Biotransformation of para-aminophenol and para-phenylenediamine in reconstructed human epidermis and human hepatocytes. *Toxicol Lett.* 2005 Sep 15;158(3):196-212. doi: 10.1016/j.toxlet.2005.03.014. PMID: 15890478.

Anexo 3. Resumo das principais informações de cada estudo incluído nesta revisão.

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para a revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continua).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
Liu et al., 2022 ³⁶ China	Investigar se a PPD induz a EMT em SV-40 e analisar seu papel regulador na via de sinalização ERK5-AP-1	SV-HUC-1	No tratamento e teste de viabilidade celular foram utilizados 0 a 100 µM de PPD dissolvido no meio celular. No teste de invasão celular e migração foram adicionados, diretamente no meio de cultura, 0,002, 0,01 e 0,05 µM de PPD	Teste de viabilidade celular, ensaio de cicatrização, invasão, Western Blot, RT-PCR e Imunofluorescência	PPD induziu EMT em SV-HUC-1, comprovado por alterações na morfologia celular, invasão e migração. PPD desencadeou a ativação da sinalização ERK5-AP-1. XMD8-92 levou a inibição de ERK5	PPD pode atuar como um agente cancerígeno no câncer de bexiga. A via ERK5/AP-1 pode estar envolvida no efeito da PPD em induzir o desenvolvimento desse tipo de câncer
Huang et al., 2007 ¹⁴³ Taiwan	Investigação dos efeitos da PPD em SV-HUC-1, e a relação com danos ao DNA, expressão de p53 mutante e COX-2	SV-HUC-1	A solução estoque de PPD (100 mg/mL) foi dissolvida em DMSO e diferentes concentrações foram preparadas no meio de cultura (DMSO a 0,1%). As concentrações finais para PPD foram 2, 5, 10, 20 e 40 g/mL	Teste de viabilidade celular, Ensaio Cometa alcalino, Imunocitoquímica, Western Blot e análise estatísticas	PPD reduz a viabilidade de forma dose-dependente. PPD leva a danos no DNA. PPD aumenta, de forma dose-dependente, a expressão de p53 mutante e COX-2.	PPD pode ser um potencial agente carcinogênico para o câncer de bexiga
Wadaan et al., 2005 ¹ Arabia Saudia	Efeito de tintura oxidativa na pele de coelhos	Coelhos (6M e 6F), variação de peso de 1050 - 1150 g	Tópica (costas, couro cabeludo e orelhas). Sem especificação da concentração de PPD	Análise visual dos efeitos	Pelo adquiriu coloração preta após a primeira aplicação; Na semana 8 o pêlo estava seco e facilmente separado do couro cabeludo; Surgimento de alopecia (costa e cabeça) a partir da semana 16 pontos de alopecia; Sensibilidade da pele na semana 20, com hiperemia irregular e crostas; Presença de sinais de desconforto, comportamento irritado e perda de peso (redução da ingestão de dieta)	Possibilidade de reação cruzada e presença de sensibilização cutânea entre os compostos da tintura

Legenda: PPD – parafenilenodiamina. EMT - transição epitélio-mesenquimal. SV-40 células uroteliais humanas imortalizadas. ERK5 - quinase regulada por sinal extracelular 5. AP-1 - proteína ativadora 1. XMD8-92 - 2-[2-etoxi-4-(4-hidroxi-piperidin-1-il)anilino]-5,11-dimetilpirimido[4,5-b][1,4]benzodiazepin-6-ona. P53 – fosfoproteína 53. COX 2 - ciclooxigenase 2. SV-HUC-1 - Células epiteliais uroteliais humanas. DMSO - dimetilsulfóxido.

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
Mathur et al., 1995 ⁴⁵ Índia	Avaliação da atividade enzimática, LPO e liberação de histaminas na pele após o uso de PPD	Porquinhos-da-índia albinos (fêmeas), com peso variando entre 240 e 260g. 30 animais (10 do Grupo Controle e 20 do Grupo Tratado)	Dose diária de 4% da solução de PPD em 25% de etanol. Aplicação tópica de 0,1 mL em uma área de 2 x 2 cm	Análise enzimática e peroxidação lipídica	PPD aumentou ACP, GST e tirosinas. Elevação acentuada de LPO, histamina na pele após a exposição a PPD. Aumento de ACP, LPO e histamina nos dias 15 e 30. GST e tirosinase foram elevadas no dia 30. Sem alteração de GSH após a exposição. Aumento de ACP pode estar relacionado a danos internos generalizados aos lisossomos do tecido inflamado. O aumento de GST e tirosinase pode estar associada às alterações dermatológicas devido ao acúmulo de PPD. O aumento de LPO sugere a possibilidade de formação de radicais livres, levando a danos no tecido. A elevação de histamina indica a possibilidade do envolvimento de células inflamatórias (mastócitos) e indução de DAC, que pode causar aumento da permeabilidade devido ao aumento da vasodilatação	PPD tem a capacidade de penetrar no eixo do cabelo e da pele, causando alterações histopatológicas que resulta na irritação da pele
Kumar et al., 2020 ⁵³ Índia	Avaliação do potencial anti-genotóxicos da BRE induzida pela PPD	PBLs	Duas concentrações de PPD, ambas dissolvidas no meio cultura. 1. PPD (33,33 µg/mL) + RES (33,33 µg/mL) + HO (1,028 µg/mL); 2. PPD (200 µg/mL) + RES (200 µg/mL) + HO (6,17 µg/mL)	SCE	BRE reduz significativamente a frequência de SCE de forma dose-dependente, enquanto a PPD aumenta a frequência de SCE, também de maneira dose-dependente	Efeito anti-genotóxicos da BRE e indução da genotoxicidade por PPD
Lloyo et al., 1977 ¹³⁵ Inglaterra	Avaliação dos efeitos irritantes na pele e mucosa do olho. Avaliação da toxicidade oral, de 12 compostos presentes em tinturas de cabelo	Coelhos albinos da Nova Zelândia e ratos da linhagem CFY. Peso variando de 90-122g	Aplicação dérmica e ocular (coelhos). Aplicação oral (ratos). Sem especificação da concentração de PPD	Avaliação de efeitos irritantes e testes oculares (coelhos). Avaliação da toxicidade oral (ratos)	Pele: Levemente irritante, casando eritema com melhora em 72 horas. O índice de irritação primária foi de 0-3. Toxicidade oral: letargia e piloereção; Reações comuns: aumento da salivação, ataxia, tremores corporais finos, alterações na frequência respiratória, diurese e diarreia; Resultados da autópsia: escurecimento do fígado e rins, escurecimento ou palidez do baço, hemorragias nos pulmões e intestinos, e injeção dos vasos sanguíneos intestinais e mesentéricos	A variabilidade nas toxicidades agudas ressalta a necessidade de avaliações específicas das substância.

Legenda: ACP - fostase ácida. LPO - peroxidação lipídica. GSH – glutatona. PPD – paraifenilenodiamina. DAC – dermatite de contato. PBLs – linfócitos do sangue periférico humano. RES – resorcinol. HO – peróxido de hidrogênio. SCE – Ensaio de Troca de Cromátides irmãs. BRE – raízes de beterraba.

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
Munday et al., 1999 ⁴⁷ Nova Zelândia	Comparação da miotoxicidade de 2-metoxi-p-PD e PPD	Ratos da colônia Ruakura, derivado de Sprague Dawley. Fêmeas de 12 semanas de idade	Aplicação subcutânea diária de PPD (100 e 200 mmol/Kg) e 2-metoxi-p-PD (25, 50, 75 e 100 mmol/Kg)	Análise cromatográfica, histológica e análise das lesões musculares	2-metoxi-p-PD foi mais miotóxica. Sem efeitos de PPD a 100 mmol/Kg. Presença de lesões de gravidade variável na histologia. Presença de necrose no gastrocnêmio, diafragma e língua com PPD a 200 mmol/Kg	Indicação de seletividade de resposta em músculos esqueléticos
Stenbäck et al., 1976 ¹³⁷ Estado Unidos	Avaliação dos efeitos da aplicação percutânea de PPD, p-aminonitrofenol e tioglicolato de sódio	Camundongos (50 animais) da linhagem Swiss da colônia Eppléy. Coelho (40F)	Aplicação tópica, duas vezes ao dia, de PPD e p-aminonitrofenol (0 e 5%) e tioglicolato (1 e 2%) em acetona	Análise histológica (pele e tumores de tecidos). Análise hematológica e química (sangue e urina). Análise estatística	Camundongos tratados apresentaram tumores, principalmente linfomas de tipos mistos em vários órgãos, adenomas pulmonares benignos, dermatofibromas, hemangiomas hepáticos, uterinos e subcutâneo e neoplasma ovariano. O grupo controle apresentou 67 tumores, (papilomas, ceratoacantomas e carcinomas de células escamosas). Os coelhos não mostraram alterações no local de aplicação	Presença de efeitos de carcinogênicos em camundongos
Mosley-Foreman et al., 2008 ³⁰ Estados Unidos	Avaliação dos efeitos citotóxicos após exposição de: 1,2-,1,3- e 1,4-PD; 4-cloro-1,2-PD, 4-cloro-1,3-PD e 4,5-dicloro-1,2-PD	HaCaT (10 ⁵ células/ mL)	PPD dissolvido em DMSO foi adicionado ao meio de cultura	Estudo citotoxicidade (HaCaT)	Sem irradiação luminosa, PPD não apresenta citotoxicidade em HaCaT a até 1000 µM. Entretanto, sob irradiação luminosa, PPD causou diminuição significativa na viabilidade celular a 1000 µM	Correlação a PPD e a luminosidade podem influenciar viabilidade celular
Kalish et al., 1995 ¹⁷⁷ Estados Unidos	Desenvolvimento de protocolos de sensibilização em ratos para alérgenos de contato	Camundongos fêmeas da cepa CBA/J e Balb/c com 6 semanas de idade	Aplicação tópica 5 vezes na semana por 3 semanas; aplicação tópica (abdômen e costas) por 5 dias consecutivos; injeção intraperitoneal de células esplênicas sensibilizadas a PPD por 7 dias, camundongos suplementados com vit. A; aplicação tópica na orelha por 10 dias com PPD a 0,1%. Sem menção à concentração de PPD	Avaliação do inchaço da orelha e proliferação de células do linfonodo e baço	Presença de sensibilização após uso pela via tópica e intraperitoneal. Vit. A aumentou a resposta da PPD. A sensibilização nas costas é mais eficaz que a no abdômen para sensibilizadores fracos. Células do linfonodo e baço foram capazes de proliferar em resposta a PPD	Presença de sensibilização por duas vias. Células de baço e linfonodo indicam resposta imunológica específica

Legenda: 2-metoxi-p-PD - 2-metoxi-p-fenilenodiamina PD – fenilenodiamina. PPD – parafenilenodiamina. HaCaT – queratinócitos humanos da pele. DMSO - dimetilsulfóxido. Vit. A – vitamina A.

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para a revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
Chye et al., 2008 ⁶⁴ Taiwan	Análise do potencial de indução de quebras de fitas simples de DNA em linfócitos humanos por PPD e seus derivados: 2-cloro-p-PD, 4-cloro-o-PD, 2-nitro-p-PD e 4-nitro-o-PD	Linfócitos Humanos	Os compostos foram aplicados no meio celular, dissolvidos em DMSO (1%), em concentrações de 50 a 500 µM por 2 horas	Ensaio Cometa, teste de viabilidade celular e correlação de Kendall	PPD nas doses de 100 a 500 µM induziu genotoxicidade em linfócitos humanos de forma dependente da dose	Presença da quebra de fitas simples de DNA
Lee et al., 2008 ⁵⁴ Correia do Sul	Investigação da toxicidade cutânea da aplicação de PPD em ratos com deficiência de XO induzida por tungstato	Ratos machos Sprague-Dawley (24M), com peso corporal médio de 230,10g. Divididos em 4 grupos (6/grupo): alimentados com SD, TD, PSD e PTD	Uso tópico de PPD (2,5% em 2% de NH ₄ OH). Durante as aplicações, foi administrada uma dieta suplementada com TD (0,72 g/Kg) ou SD por 10 dias	Avaliação da ACP, GPX, GST, SOD e XO; determinação do teor de proteínas, do conteúdo de GSH e do nível de LPO; análise histológica e estatística	Os grupos sem PPD não apresentaram danos significativos. O PTD exibiu queratina granular mais irregular e formação de queratina imatura em comparação ao PSD. A atividade de ACP foi maior no PTD. A atividade de XO no grupo PSD foi mais elevada do que nos grupos SD. A eliminação de ROS no grupo PTD foi reduzida, e o LPO aumentou em comparação ao grupo PSD	A toxicidade cutânea da PPD é maior em animais suplementados. O aumento da atividade de XO no PSD está associado à toxicidade provocada pela PPD. Evidências de aumento de ROS por outros sistemas geradores, além de XO, influenciaram a toxicidade da PPD
Coulter et al., 2006 ⁷⁹ Inglaterra	Avaliação da relação entre a oxidação da PPD e a maturação funcional de CD	CD derivadas de monócitos humanos. Doadores (4M e 4H) saudáveis, sem histórico de exposição a tintura de cabelo, idade variando entre 24 e 35	CD foram incubadas com PPD e BB por 16 horas nas concentrações 1, 5, 20, 30, 50 e 100µM	Teste de viabilidade celular. Avaliação dos de GPX. Contagem radioativa em contador de cintilação. Cromatografia de LC-MS	PPD resultou em aumento da expressão de CD40, MHCII e na proliferação de linfócitos halogênicos. Concentrações de PPD acima de 250 µM causaram morte celular, sendo a concentração letal acima de 100 µM. Nem a PPD nem a BB alteraram a expressão de CD80, CD83 ou CD86. Foi confirmada a oxidação da PPD em BB no meio celular	PPD, não a BB, realiza ativação seletiva das CD. GPX inibe a formação de BB mas não a ligação de PPD às proteínas

Legenda: PPD- parafenilenodiamina. PD – fenilenodiamina. DNA - ácido desoxirribonucleico. PPD – parafenilenodiamina. DMSO - dimetilsulfóxido. CP – Células pré-tratadas. XO – Xantina oxidase. SD – Dieta padrão. TD – Dieta suplementada com tungstato. PSD – dieta padrão com PPD. PTD – dieta padrão aplicada com tungstato. NH₄OH - hidróxido de amônio. ACP – fostase ácida. GPH – glutatona. GST – glutatona S-transferase. SOD – superóxido dismutase. XO – Xantina oxidase do tipo O. GSH – glutatona reduzida. ROS – espécies reativas de oxigênio. CD – Células dendríticas. BB - Base de Bandrowski. LC-MS - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa. CD-40 - Cluster de diferenciação 40. MHC II - complexo principal de histocompatibilidade II. CD-83 Cluster de diferenciação 83. CD-80 Cluster de diferenciação 80. CD-86 - Cluster de diferenciação 86.

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para a revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
El-Amin et al., 2014 ⁴⁰ Árabia Saudita	Avaliação da toxicidade de tintura de cabelo para verificar anormalidades bioquímicas, hematológicas e disfunção hepática	Ratos (48 animais) da espécie Albino Wistar, com 11 semanas de idade, variação de peso 140-160g	Exposição oral e subcutânea, com doses de 10 mg/Kg (G2), 20 mg/Kg (G3) e 30 mg/Kg (G4)	Testes hematológicos, espectrometria, contagem de plaquetas, linfócitos, basófilos e neutrófilos	G2 apresentou leve fraqueza. G3 apresentou edema na cabeça, pescoço e faringe. G4 apresentou fraquezas severas nos membros anteriores, alopecia, tremores em todo o corpo, convulsão e dificuldade respiratória perto da morte. Aumento da atividade enzimas hepáticas (TGO, ALT, ACP) e diminuição dos níveis de proteínas plasmáticas (total, albumina e colesterol) de forma dose-dependente. Aumentou da glicose sanguínea (dose-dependente). Redução de Hb, RBCs, PCV, TWBCs, CHCM e MCV. Aumento de plaquetas e linfócitos. Indicação de sinais de anemia	Presença de toxicidade hepática, metabólica e anemia com alterações no sistema imunológico e possíveis efeitos na medula óssea
Rojanapo et al., 1986 ³⁷ Tailândia	Avaliação da mutagenicidade de PPD antes e após a oxidação por H ₂ O ₂ , (<i>Salmonella typhimurium</i> TA98). Avaliação da mutagenicidade da PPD (fração S-9 hepáticas de ratos). Investigação do potencial carcinogênico da PPD oxidada por H ₂ O ₂ (ratos Wistar)	Ratos - Wistar machos (40F), pesando entre 120 e 140g; <i>Salmonella typhimurium</i> cepa TA98; Fração S-9 foram usados ratos machos pesando entre 250 e 300 g	Ensaio de mutagenicidade: 0,1 mL da solução de teste, 0,5 mL de mistura S-9 ou 0,5 mL de tampão fosfato (teste da ausência de S-9), 0,1 mL da cultura de caldo nutriente da cepa bacteriana de teste e 2 mL de ágar contendo 50 µM de histidina e 50 µM de biotina. Ensaio de carcinogenicidade, de forma tópica e subcutânea. G1: 0,5mL da mistura 1:1 PPD (5%) em NHOH (2%) semanal por 18 meses. G2: 0,1mL de uma mistura de 1:1 PPD (5%), NH ₄ OH (2%) NaCl (1,8%) e H ₂ O ₂ (6%) a cada 2 semanas por 18 semanas. G3: do veículo de G1. G4: veículo do G2	Ensaio de mutagenicidade Análise histológica (bexiga, rim, fígado, pulmão, glândula mamária, salivar, tireoide) e análise estatística	PPD demonstrou ser fracamente mutagênica na presença da fração S-9. No entanto, sua mutagenicidade aumentou significativamente após oxidação com H ₂ O ₂ e na presença de NH ₄ OH, com resultados mais acentuados após reação com S-9. A adição de H ₂ O ₂ elevou a mutagenicidade da PPD em 500 vezes. A aplicação tópica de PPD mostrou uma incidência significativa de tumores na glândula mamária e induziu fibromatose de tecidos moles em fêmeas. Em machos, foram observados tumores em múltiplos órgãos, incluindo fígado (colangiocarcinoma e adenoma de células hepáticas), rim (nefroblastoma com metástases pulmonares e pancreáticas), bexiga urinária (papiloma de células transicionais) e glândula adrenal (adenoma cortical). A aplicação tópica de PPD oxidada foi altamente eficaz na indução de tumores na glândula mamária de ratas, com 6 de 7 ratas sobreviventes desenvolvendo tumores em três órgãos (glândula mamária, tecidos moles e útero)	PPD apresentou mutagenicidade elevada, possivelmente devido à formação significativa de BB durante sua oxidação. PPD oxidada demonstrou ser cancerígena em ratos Wistar, com maior incidência em fêmeas

Legenda: Hb – hemoglobina. PCV - volume globular. RBC – contagem de glóbulos vermelhos. TWBC – contagem total de glóbulos vermelhos. VCM- volume corpuscular médio. CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média. TGO- transaminase oxalacética. ALT - Alanina Aminotransferase. H₂O₂ – peróxido de hidrogênio. NH₄OH - hidróxido de amônio. NaCl – hidróxido de sódio. BB - base de Bandrowski.

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
Bonefeld et al., 2009 ¹¹² Dinamarca	Potencial sensibilizant e cutâneo de tinturas capilares permanentes em camundongos	Camundongos (32F) CBA/Ca. Ao todo 8 grupos com 4 animais	Sensibilização por contato, por via tópica (parte dorsal das orelhas): PPD (25 µL a 0,1%); PPD (0,25%); PPD (1% em acetona /óleo de oliva, 4:1); 25 µL da mistura de tintura de cabelo composta por gel de cor e oxidante (1:1); e 12,5 µL do oxidante ou do gel de cor	Ensaio LLNA, imuno-histoquímica, ELISA. Citometria de fluxo. Expressão de marcadores de superfície celular de linfonodos após a aplicação de anti-CD4	PPD demonstrou ser um potente indutor de inflamação cutânea. A mistura de tintura provocou inflamação profunda, infiltração neutrofílica e necrose em algumas áreas. Após a aplicação do corante ou da mistura, foram detectados níveis elevados de TNF-α, IL-1β e IL-6, diferentemente do oxidante isolado. A mistura de tintura resultou em aumento das citocinas, com produção persistente mesmo após a lavagem. Tanto o corante quanto a mistura elevaram os níveis sistêmicos de IL-6. A infiltração de células B foi observada com 1% de PPD, gel colorido e mistura. A mistura induziu a proliferação de células TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺	PPD é um potente indutor de inflamação cutânea. As tinturas de cabelo mostraram ser fortes sensibilizantes, induzindo inflamações, produção de citocinas e infiltração de células B e T nos linfonodos drenantes
Burnett et al., 1977 ²¹ Estados Unidos	Mutagenicidade letal dominante por compostos químicos usados para tingir o cabelo	Teste de letalidade dominante: Ratos Charles River CD, (20M, 40 do grupo controle), peso variando entre 205 e 225g. Teste de toxicidade oral: Ratos Charles River CD, (5M e 5F), peso variando entre 200 e 300g. Toxicidade percutânea: Coelhos da Nova Zelandia, grupos com 4 a 8 animais, peso variando entre 1,7-2,5Kg	Teste de letalidade dominante: Utilizou-se uma concentração de 20 mg/Kg. A solução aquosa a 0,2% foi administrada em um volume de dose de 1 mL/100 g de peso corporal. Estudo de toxicidade aguda: emulsão de O:A	Teste de letalidade dominante e análise estatística	Machos tratados ganharam 15% de peso comparado com os controles. Nos estudos tópicos apenas o orto, meta e PPD levaram a mortes na dose de 5g/Kg de peso corporal	O LD50 para os compostos é de cerca de 28mg/Kg, dessa forma a dose de 20mg/Kg pode ter levado a uma toxicidade sistêmica e ter resultado na redução da fertilidade e aumento das perdas pré-implantação. Os compostos não causariam mutações letais dominantes nas condições de uso normal do produto

Legenda: PPD – parafenilenodiamina. LLNA – Ensaio do Linfonodo Local. ELISA – ensaio Imunoenzimático. TNF-α - Fator de Necrose Tumoral alfa. IL-1β – interleucina 1 beta. IL-6 – interleucina 6. TCD4+ - células T positivas para cluster de diferenciação 4. TCD8+ - células T positivas para cluster de diferenciação 8. DMSO - dimetilsulfóxido. O:A – emulsão óleo em água. LD50 – dose letal mediana.

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
Bharali et al., 2012 ³⁹ Índia	Analisar o perfil hematológico o pós uso tópico de PPD em solução aquosa	Ratos Sprague-Dawley, 20 animais, divididos em 4 grupos (5 por grupo)	Exposição tópica no dorso. Concentração de 0, 1, 2 e 3 mg/Kg/dia por 90 dias	Avaliação hematológica (TEC, CPT, Hb, PCV e reticulócitos), avaliação histológica (baço) e análise estatística	PPD a 3 mg/Kg causou retardamento no crescimento dos animais. Houve anemia grave, com redução significativa na contagem de hemácias (59%), hematócrito (50%) e hemoglobina (70%). Observou-se linfocitose, maior porcentagem de blastócitos, manchas, e células pilosas no sangue periférico. Alterações morfológicas graves nos eritrócitos foram identificadas, e o PCV reduziu após o tratamento com PPD. Baço apresentou hipertrofia, congestão, pigmentos na polpa vermelha, expansão do tecido germinativo e extensos depósitos de hemossiderina, indicando acúmulo de ferro no tecido esplênico.	PPD é capaz de destruir muitos glóbulos vermelhos por meio de alterações em suas morfologias. Ela é conhecida por induzir estresse oxidativo no organismo, ao qual os eritrócitos são extremamente sensíveis devido à sua alta concentração de oxigênio. A linfocitose e a leucocitose observadas refletem uma resposta inflamatória, e a análise da circulação periférica revelou possíveis sinais de malignidade hematopoiética. O aumento dos centros germinativos nos folículos esplênicos indica que a PPD estimulou a hiperproliferação de linfócitos B, correlacionando-se com a linfocitose e a leucocitose identificadas
Li et al., 1995 ¹¹⁹ Japão	Avaliação da sensibilidade cruzada entre PPD e PAP ou MPD	Porquinho-da-índia - fêmeas com peso entre 300 e 400g. Dívidas em 9 grupos experimentais e 5 de controle	1º tratamento - G1: PPD (0,1mL a 0,1% em água destilada). G2: FCA (0,1mL). G3: PPD (0,1mL) emulsionado em FAC (0,1%). 2º tratamento: PPD (0,5mL em 5% de água destilada). 3º tratamento - PPD (0,025mL), PAP (1%) e MPD (5% em água destilada)	Avaliação do grau de sensibilidade. Análise das células linfonodais. Teste de viabilidade celular, citotoxicidade inespecífica contra LNC. Contador de cintilação líquida. Análise estatística	PPD foi determinado como um sensibilizador forte e causou pigmentação na pele dos animais. Houve aumento da blastogênese de linfócitos quando cultivados com PPD, MPD e PAP, com ou sem a presença de EC, de forma dependente da dose. A extensão da resposta a PPD foi maior do que a observada com PAP e MPD	Foi observada sensibilização cruzada entre PPD e PAP ou MPD. A extensão da blastogênese por PAP foi maior do que a observada com MPD, sugerindo que há maior sensibilização cruzada entre PPD e PAP do que entre PPD e MPD

Legenda: PPD - parafenilenodiamina. TEC - Tempo de Coagulação. CPT - Contagem de Plaqueta. Hb – hemoglobina. PCV- volume globular. MPD – meta-fenilenodiamina. PAP- para-aminofenol. FCA - Adjuvante completo de Freund. EC – células epidérmicas.

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
Xie et al., 2000 ¹⁴⁰ Japão	Avaliação do potencial de sensibilização cutânea de 5 produtos químicos e as reatividades cruzadas entre eles	Porquinho-da-índia - fêmeas da linhagem Hartley. Peso variando entre 300 e 350g.	Intradérmico: 0,1% de PPD e pTD em salina e 0,1% de PAP e PAB em aceite de oliva. Dérmico: PPD, pTD, PAB e PAB diluídos em 1% de petrolato	Teste de GPMT, avaliação do potencial de sensibilização e a reatividade cruzada	PD é um forte sensibilizador, e, quando sensibilizados por ela, há uma grande possibilidade de reação cruzada. Reações começaram a aparecer em 24 horas e aumentaram em 48 horas (pico de resposta). Todos os animais dos grupos PPD, pTD, PAB e PAP apresentaram reação positiva (0,1%). A reatividade cruzada à PPD foi confirmada nos desafios com pTD, PAP e PAB na concentração de 0,1% PPD torna o meio celular citotóxico. Taxa de decomposição da PPD foi maior nas suas concentrações iniciais. PPD (5-10 µg/mL por 30 minutos) aumentou a incorporação de 3H-timidina. Concentrações mais elevadas tiveram o efeito citotóxico menor e incorporação de 3H-timidina. Exposição por período mais longo (3-24 horas) geraram mais morte celular. A citotoxicidade de PPD conseguiu reduzir a atividade de superóxido dismutase e catalase. Expressão de ICAM-1 teve um aumento significativo da aderência após 24 horas de tratamento	A PPD foi confirmada como a mais suscetível a causar reações cruzadas. Dessa forma, propõe-se que a sensibilização cruzada ocorre pela formação de haptenos comuns ou semelhantes
Picardo et al., 1992 ¹¹⁸ Inglaterra	Investigação dos efeitos da PPD em queratinócitos humanos	Cultura de queratinócitos humanos, derivados de prepúcio neonatal. Cultivados em fibroblastos de camundongos irradiados	PPD (1-20µg/mL) diluída em PBS e adicionada ao meio de cultura de queratinócitos	Determinação da decomposição espontânea de PPD, teste de viabilidade e crescimento celular. Avaliação do dano lipoperoxidativo, da expressão de ICAM-1, análise de FACs, ensaio de aderência de T-blast e análise estatística	PPD realiza a auto-oxidação, levando à produção de radicais livres e ROS de forma dose-dependente. A expressão de ICAM-1 foi induzida pela PPD, sugerindo uma correlação com o estresse oxidativo gerado pela auto-oxidação da substância. Este estresse oxidativo desempenha um papel crucial na indução de DAC ocupacional. A inflamação resultante desse estresse oxidativo pode ser fundamental para o desenvolvimento de uma resposta imune	
Viswanathan et al., 1985 ⁶⁸ Índia	Avaliação dos efeitos de PPD na produção de radicais livres, atividade de SOD e níveis de histamina	Porquinhos-da-índia peso variando de 200 a 300g	Aplicação no teste de contato dérmico de PPD (0,9%) diluído em etanol (25%), solução de PPD + etanol (0,1 mL) e etanol	Avaliação de LPO e SOD, análise da influência de suplementos	Presença de hiperqueratose após 24 horas do uso de PPD. O conteúdo de histamina aumentou até 48 horas e diminuiu após 72 horas de exposição a PPD	O aumento do conteúdo de histamina pode estar vinculado a uma reação de hipersensibilidade temporária.

Legenda: PPD – parafenilenodiamina. pTD – para-toluenodiamina. PAP – para-aminofenol. PAB – para-aminobenzeno. GPMT - Teste de Sensibilização Máxima em porquinhos-da-índia. LPO - peroxidação lipídica. PBS - Solução Salina Tamponada com Fosfato. HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Performance. SOD- Superóxido Dismutase. CAT – Catalase. GSH - glutationa. ICAM-1 - molécula de adesão intercelular 1. FACS – citometria de fluxo. 3H-timidina - Trítio-timidina. ROS – espécies reativas de oxigênio. DAC – dermatite de contato aguda. SOD – superóxido dismutase.

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
Chen et al., 2010 ¹⁶ Taiwan	Avaliação dos mecanismos de citotoxicidade e genotoxicidade induzidos pela PPD em células MDCK, incluindo os efeitos na viabilidade celular, danos ao DNA e indução de apoptose. Investigação da influência de antioxidantes na redução da citotoxicidade causada pela PPD e vias de sinalização da apoptogênese.	MDCK	A solução estoque de PPD (100 mg/mL) foi dissolvida em DMSO, e diferentes concentrações (12,5; 25; 37,5; ou 50 µg/mL) foram adicionados ao meio de cultura	Teste de viabilidade celular, ensaio cometa e TUNEL. Medição de ROS e das atividades caspases (8, 9 e 3/7)	Redução da viabilidade de forma tempo-dependente. Aumento da viabilidade celular com vit. C e E, inibidor de caspase (8 e 9). PPD gerou dano ao DNA e produção de ROS. PPD (37,5µg/mL), aumentou a condensação da cromatina e a fragmentação nuclear. PPD aumentou a atividade de caspase (8, 9 e 3/7) de maneira dependente do tempo	A presença de inibidores de caspases e vit. C e E, aumentam a viabilidade celular. PPD induz a produção de ROS em células MDCK, que é inibido na presença de antioxidantes. A ativação das caspases ocorre de forma dependente do tempo, culminando em apoptose. O pré-tratamento com inibidores de caspases (exceto caspases 3/7) impede a ocorrência da apoptose
Soler-Niedziela et al., 1991 ¹⁰⁴ Estados Unidos	Avaliação da genotoxicidade dos compostos COP, NOP e PPD em micronúcleos de camundongos	Camundongos da linhagem CD-1, com 5 animais por dose. Foram sacrificados após 24, 48 e 72 horas de tratamento. peso corporal variando entre 25 e 30 g	Injeção intraperitoneal de COP (400mg/Kg), NOP (500mg/Kg) e PPD (25, 50 e 100mg/Kg). Seguida da coleta de MO do fêmur dos animais, nos períodos de 24, 48 e 72 horas	Ensaio de micronúcleos da MO e análise estatística	PPD reduziu significativamente a razão PCE/NCE, nas seguintes situações: 100mg/Kg (24 e 72 horas), 25mg/Kg (48 horas) e 50mg/Kg (72 horas)	PPD não apresentam resultando carcinogênicos, mas apresentou sinais de genotoxicidade a curto prazo em micronúcleos na MO
de Boeck et al., 2015 ¹⁷² Bélgica	Avaliação dos danos ao DNA após tratamentos com PPD, OPP e 2,4-DAT	Ratos machos da linhagem Sprague-Dawley, idade variando entre 7-9 semanas	Via oral, 1 vez ao dia, por 3 dias consecutivos de: PPD (2,5, 5,0 e 10,0 mg/mL) dissolvido em solução salina fisiológica (0,9%), OPP (250, 500 e 1000 mg/Kg/dia) e 2,4-DAT (3,75, 7,5 e 15,0 mg/mL)	Ensaio Cometa, análise histopatológica (fígado e estomago) e RT-PCR	2,4-DAT leva a danos em células hepáticas e maior migração do DNA no ensaio cometa. OPP e PPD não levaram a danos significativos	Genotoxicidade de 2,4-DAT em células hepáticas.

Legenda: MDCK- Células renais de cães Mardin-Darby. TUNEL - Marcação de Extremidades de Fragmentos de DNA por Terminal Desoxinucleotidil Transferase e dUTP. Vit. – vitamina. COP - 4-cloro-o-fenilenodiamina. NOP - 4-nitro-o-fenilenodiamina. MO – medula óssea. MPCE - eritrócitos policromáticos com micronúcleos. PCE - valor de eritrócitos policromáticos. NCE - eritrócitos normocromáticos. OPP – orto-fenilfenol. 2,4-DAT - 2,4-diaminotolueno. TBA – ácido tiobarbitúrico. RT-PCR - Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para a revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
Srhayri et al., 2016 ⁷³ Marrocos	Explorar as ações moleculares da PPD em RBCs em ambiente hipotônico	RBCs doados por voluntários com idade variando entre 25 -35 anos	Teste de osmoticidade dos RBCs: PPD (5µg/mL) em soluções hipotônicas de NaCl. Teste de solubilização com antioxidantes: PPD (5µg/mL) em soluções contendo NaCl (4,5 e 5g/L), GSH (1mM), BME (1mM). Teste de estabilidade osmótica com RBC: PPD foi solubilizado e adicionado a soluções hipotônicas de NaCl. Teste de solubilização de PPD com antioxidante: PPD foi solubilizado e adicionado as soluções contendo NaCl (4,5 e 5 g/L). Teste de efeito da PPD polimerizado em um eletrodo: PPD foi polimerizado em eletrodo de platina	Teste biológico de resistência osmótica, solubilização da PPD com antioxidantes. Avaliação dos efeitos da PPD polimerizado em um eletrodo, teste físico-químicos e análise estatística	PPD leva a efeitos de resistência temporária de hemólise em RBC, e isso foi afetado quando colocado para reagir com antioxidantes (GSH e BME). PPD é oxidado e consegue realizar a formação de polímeros (poli-PPD). A resposta foi maior na PPD polimerizado do que solubilizado. poli-PPD pode contribuir na proteção contra a hemólise, pela redução de permeabilidade água em RBC. Antioxidantes (GSH e BME) inibem a formação da poli-PPD após a oxidação	E os resultados apresentados na atividade de proteção hemólise, na presença e na ausência de antioxidantes, foi similar a resposta do poli-PPD
Chen et al., 2006 ³⁴ Taiwan	Avaliação do mecanismo de apoptose, induzida pela PPD em MDCK	MDCK com densidade celular de 1x10 ⁵ células/poço	PPD (12,5, 25, 37,5 ou 50 µg/mL) adicionado ao meio de cultura	Teste de viabilidade celular, análise morfológica e apoptótica. Avaliação do potencial transmembrana mitocondrial, eletroforese e Western Blot	PPD em concentrações crescente gerou a perda típica da morfologia, aumento celular, condensação nuclear, vacuolização do citoplasma e encolhimento celular. PPD reduz a viabilidade celular de forma dose dependente, a presença de H ₂ O ₂ intensifica o efeito. PPD provoca apoptose e fragmentação do DNA de MDCK. Após o tratamento de 24 horas da PPD ocorreu, de forma dose-dependente, o aumento de células na subfase G1. PPD reduz a integridade da membrana celular com a diminuição do potencial de transmembrana mitocondrial. PPD aumenta a atividade de p53, de forma dose dependente	Indicativo de que a apoptose é mediada pelo aumento da p53

Legenda: PPD- parafenilenodiamina. RBCs –contagem de glóbulos vermelhos. NaCl – cloreto de sódio. GSH – glutatona. BME - beta-mercaptoetanol. Poli-PPD – Poli-parafenilenodiamina. MDCK – células renais de cães Mardin-Darby. H₂O₂ - peróxido de hidrogênio. P53 -proteína 53. Subfase G1 – Fase de intervalo/ GAP 1. DNA - Ácido Desoxirribonucleico.

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para a revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
Rubin et al., 2010 ⁶⁵ Dinamarca	Analisar como a exposição regular a tinturas de cabelo permanentes afeta as respostas imunológicas pró e anti-inflamatórias	Camundongos C57BL/6 fêmeas. Foram usados 4 animais por grupo experimental (grupo exposto a tintura de cabelo e grupo controle exposto a óleo de oliva-acetona (1:4)	Aplicação tópica na parte dorsal da orelha de PPD (0,1, 0,5 ou 3%)	Imuno-histoquímica e análise histológica: avaliação da inflamação cutânea, determinação de marcadores BrdU+, CD4+, CD8+, IFN- γ +, IL-17 e IL-10. Análise da distribuição de células B e T, identificação de células T e realização de análise estatística	A resposta imunológica indicou o desenvolvimento de uma inflamação significativa na pele dos animais, caracterizada por inchaço nas orelhas e infiltração celular. PPD resultou no aumento na proliferação de células TCD4+ e TCD8+. Observou-se que, até a quarta exposição, houve um aumento gradual na expressão de CD4+, CD8+, Foxp3+ e células Tr1 CD4+BrdU+IL-10+. Além disso, a quarta exposição foi marcada por um aumento significativo na proliferação de células T, com a proporção de células T inflamatórias atingindo cerca de 14%.	A presença de Treg evidência que o sistema imunológico dos animais buscou controlar a resposta causada pela exposição a tinturas de cabelo
Bharali et al., 2012 ⁷⁴ Índia	Investigar a relação entre a aplicação tópica subcrônica de PPD e alterações na estrutura dos rins	Ratos da linhagem Sprague-Dawley (20M), com peso variando entre 120 e 140g	Aplicação tópica na parte dorsal, sem pelo de PPD (1, 2 e 3mg/Kg, correspondendo, respectivamente, a G1, G2 e G3) por 60 dias	Histologia renal e análise hematológica e bioquímica do soro	Redução significativa dos números de glóbulos vermelhos (G3), volume corpuscular médio aumentado (G3), hemoglobina menor G2) e aumento de reticulócitos (G2 e 3). Necrose tubular extensa e vacuolização citoplasmática em todos os grupos tratados. Em G3 foi observado a inflamação tubular intersticial e infiltração de leucócitos hipertônicos, aumento da creatinina sérica. Em todos os grupos a creatina fosfoquinase estava aumentada. Presença de deposição de pigmentos de ferro nos rins	Os marcadores renais alterados são um grande indicativo de rabdomiólise
Abd-Elzaher et al., 2012 ³⁸ Egito	Testar os riscos atribuíveis a aplicação tópica, repetida de PPD, e avaliação dos efeitos em órgãos e biomarcadores sanguíneos	Ratos machos albinos (40 animais, divididos em 4 grupos), com peso variando entre 185 e 210g	Aplicação tópica de PPD (1, 2 e 3 mg/Kg) uma vez ao dia por 30 dias. Grupo controle foi pitando com água destilada	Exames histopatológicos e bioquímicos dos marcadores hepáticos, cardíacos, renais e pancreáticos	PPD elevou os níveis de marcadores hepáticos (ALT, AST e ALP). No rim elevou os níveis de creatinina e ureia, principalmente nas doses mais altas, e levou a inflamação crônica intersticial e fibrose de forma dose-dependente. O fígado, o pâncreas e o coração apresentaram inflamação crônica dose-dependente	Necessidade de encontrar novos substitutos menos prejudiciais à saúde que apresentem mais segurança à população

Legenda: PPD – parafenilenodiamina. BrdU+ - bromodeoxiuridina. CD4+ - Cluster de diferenciação 4. CD8+ - Cluster de diferenciação 8. IFN- γ - interferon-gama. IL-17 – interleucina 17. CD25+ - Clust5er de diferenciação 25. Foxp3+ - fator de transcrição P3. IL-10 – Interleucina 10. Treg- células T reguladoras. G1, G2, e G3 – grupo 1, 2 e 3. AST – Aspartato Aminotransferase. ALT – Alanina Aminotransferase. ALP- Fosfatase Alcalina.

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para a revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
Garrigue et al., 1993 ¹⁷⁶ França	Desenvolver um teste sensível para detectar sensibilizadores de contato em camundongos	<i>In vivo</i> : Camundongos Balb/c (24F), com idade variando entre 6 e 8 semanas <i>In vitro</i> : LN e de LNT enriquecidas, com densidade respectiva de 5×10^5 ou $2,5 \times 10^5$ células por poço	<i>In vivo</i> : No primeiro teste (teste Mest original) foi aplicado na pele 50 µL de PPD (5%). Após 5 dias, ocorreu o desafio com a aplicação de 25 µL do hapteno em ambos os lados de uma orelha e 25 µL de uma mistura de acetona e azeite nos dois lados da outra orelha. A espessura das orelhas foi avaliada após 6, 12, 24, 48 e 72 horas. No segundo teste (teste variante) ocorreu a aplicação tópica de 50 µL do hapteno por 3 dias consecutivos. Os animais foram desafiados 5 dias após a aplicação de sensibilização. <i>In vitro</i> : Administração epicutânea de PPD (3% x 3 dias) em veículo acetona:azeite. Os animais foram sacrificados após 5 dias da última aplicação	Avaliação do inchaço da orelha por meio e viabilidade celular	<i>In vivo</i> : PPD apenas levou a sensibilização após três doses. As concentrações ideais foram de 1-3%, sendo o tempo inchaço máximo em 24 horas. <i>In vitro</i> : presença de resposta ótima de TLN sensibilizadas por PPD foi na concentração de 2,5µg/mL	Teste de inchaço da orelha do camundongo pode ser um modelo experimental útil para estudar diferentes sensibilizadores de contato
Hagiwara et al., 1990 ¹³² Japão	Investigação dos efeitos da PPD na carcinogênese hepática em ratos após o tratamento inicial com DEN	Ratos F344/DuCrj (150M) com cerca de seis semanas de idade	G1: Uso intraperitoneal de DEN (1 dose de 200 mg/Kg), seguido da suplementação oral de PPD (1000, 330 e 110 ppm). G2: Uso intraperitoneal de DEN (1 dose de 200 mg/Kg). G3: Uso intraperitoneal de salina, seguido suplementação oral de PPD (1000, 330 e 110 ppm). SG (1-4) (grupo controle): suplementação oral de 3'-Me-DAB (600 ppm), DEN foi administrado via intraperitoneal e PPD por via oral	Hepatectomia parcial, exame histológico, quantificação de focos positivos para y-GT, análise estatística	Ligeiro retardamento de peso corporal no grupo de PPD. PPD (1000 ppm) aumentou o peso relativo do fígado	Risco carcinogênico da PPD para o homem pode ser mínimo
Sassa et al., 2021 ¹⁷¹ Japão	Avaliação do potencial genotóxico de quatro substâncias utilizando um ensaio aprimorado de mutação gênica do gene TK em células XRCC1-/-/XPA-/-	Células TK6 de linfoblastoides humanos e células XRCC1-/-/XP A-/- a uma concentração de 500.000 células/mL	Aplicação no meio de cultura NEDA (50 a 200 µg/mL), PPD (100 a 1000 µg/mL), auramina (10 a 70 ou 20 a 80 µg/mL) e MG (sem relato da concentração). Os tratamentos foram realizados com ou sem a adição de uma mistura de fígado de rato S9 (4,5%)	Teste de Ames e ensaio de mutação gênica do gene da timidina	PPD (100–1000 µg/mL) levou a uma redução da viabilidade celular de TK6 e XRCC1-/-/XPA-/-	PPD não induz lesões de bases de DNA ou adutos volumosos em condições fisiológicas

Legenda: LN - Células linfonodais. LNT - Células linfonodais com células T de camundongos. PPD – parafenilenodiamina. DEN – N-nitrosodietilamina. 3'-Me-DAB - metil-4-dimetilaminobenzeno. G1, 2 e 3 – grupo 1, 2 e 3. SG – subgrupo. y-GT - gama-glutamil transferase. NEDA - N-(1-naftil)etilenodiamina di-hidrocloreto.

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para a revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
To-o et al., 2010 ¹³⁹ Japão	Avaliação da reatividade cruzada da α -arbutina com a PPD ou HQ usando o teste de maximização	Porquinhos-da-índia albinas da cepa Hartley, fêmeas pesando aproximadamente 400 g	Indução pela via intradérmica (PPD a 0,1%) e tópica (PPD a 1%). Em seguida, foram desafiados com α -arbutina, HQ ou PPD em diferentes concentrações (0,01, 0,05% e 0,1%). As reações foram lidas em 24, 48 e 72 horas após as aplicações de desafio	Avaliação da reatividade cruzada	Animais desafiados com HQ, apresentaram reatividade cruzada com PPD, mas apenas na concentração de 0,1% (0,03 mg) de HQ. Já a potência de sensibilização da PPD foi evidenciada em todos os animais quando desafiados com PPD, mesmo na concentração mais baixa de desafio, 0,01% (0,003 mg) de PPD. A α -arbutina não apresentou aparente reatividade cruzada com a PPD ou HQ	PPD demonstrou uma sensibilização potente já na segunda exposição. A glicosilação da HQ reduziu significativamente a reatividade cruzada com PPD
Chung et al., 1996 ¹⁴⁴ Estados Unidos	Investigar o efeito da presença do grupo nitro em compostos aromáticos na mutagenicidade e citotoxicidade	Culturas bacterianas de <i>Salmonella typhimurium</i> e células CHO-K1 (3×10^5 células/mL)	Uso de diversos produtos, e todos dissolvidos em DMSO, incluindo a PPD. No teste de Ames foi usada cultura bacteriana (0,1 mL), amostra (0,5 mL) e uma mistura de tampão fosfato, solução de glicose, solução de histidina (2 mL). No teste de citotoxicidade com células CHO-k1 foram tratadas com várias concentrações do composto	Ensaio de Ames, ensaio de citotoxicidade, determinação Cab, e análise do meio do potencial de oxidação	PPD e não foi mutagênica nas cepas TA98 e TA100, com ou na ausência de S9. PPD apresentou TC50 de 0,7 μ mol/mL e na presença do grupo nitro foi de 0,4 μ mol/mL. PPD foi capaz de induzir o aumento das aberrações em CHO-k1. E seu potencial de oxidação foi superior a +1,0 V	A mutagenicidade e a citotoxicidade dependem do número e da posição dos substituintes no anel de benzeno, sendo que a presença do grupo nitro foi crucial para conferir mutagenicidade aos compostos
Sonnenburg et al., 2012 ¹⁴⁵ Alemanha	Desenvolvimento de um ensaio <i>in vitro</i> baseado em coculturas para a identificação do potencial de sensibilização e irritação	HaCaT e PBMC nas respectivas densidades, 6×10^4 e 3×10^6 células/cm ²	HaCaT foi semeada em placas de 12 poços. Em seguida, os PBMC foram semeados sobre os queratinócitos e adicionadas IL-4, GM-CSF e TGF- β 1 nas concentrações de 100, 100 e 10 ng/mL, respectivamente. Foram usadas diversas substâncias no estudo, entre elas a PPD. Todas foram dissolvidas em DMSO (concentração final de 0,1%) e adicionadas no meio cultura em concentrações crescentes até a citotoxicidade	Categorização do potencial de sensibilização, irritativo e EC50	PPD, classificada como irritativo e sensibilizante forte. O EC50 foi 42 μ mol/L	Sensibilizadores fortes ou extremos tendem a ser irritantes

Legenda: PPD – parafenilenodiamina. HQ – Hidroquinona. CHO-k1 – células de ovário de hamster chinês. DMSO – dimetilsulfóxido. Cab - aberrações cromossômicas. TC50 – concentração tóxica de 50%. HaCaT - queratinócitos humanos. DCrc - Células relacionadas às células dendríticas. PBMC - células mononucleares do sangue periférico. IL-4 – interleucina 4. GM-CSF - Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos. TGF- β 1 – fator de transformação do crescimento β 1. PPD - parafenilenodiamina. EC50 – metade do efeito máximo citotóxico.

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para a revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
Coulter et al., 2007 ⁶⁹ Inglaterra	Determinar se a PPD e BB estimulam as células T de pacientes alérgicos ou não, e explorar a relação entre imunogenicidade de células T e alergia	Linfócitos humanos doados de pacientes alérgicos (8) ou saudáveis (16) e do cordão umbilical	Diversas concentrações foram utilizadas tanto de PPD quando de BB. Linfócitos de pacientes e voluntários foram cultivados e estimulados com diferentes concentrações de PPD e BB	Ensaio de proliferação, contagem de células T, análise de citocinas e quimiotoxinas e ensaio de ligação irreversível	Linfócitos de pacientes alérgicos proliferaram com PPD e BB (8). Linfócitos de não alérgicos proliferaram apenas com BB (14). A glutatona impediu a formação de BB, mas não a ligação de PPD nas células e no soro, e não inibiu sua estimulação específica dos linfócitos. A análise dos clones de células T de pacientes alérgicos revelou secreção de IL-4, 5 e 13, TNF- α , MIP-1 α e β e RANTES. A proliferação de linfócitos associada à exposição a PPD e BB é dose-dependente, apresentando resposta proliferativa (0,1 e 50 mM) e inibidoras (100 mM)	A ativação de linfócitos T em indivíduos alérgicos com PPD representa uma importante discriminação entre indivíduos alérgicos e saudáveis. A diferença de relação da concentração e efeitos de PPD e BB pode estar associado à citotoxicidade de seus efeitos. Ambas estimulam a resposta mediada por TCD4 ⁺
Ade et al., 2006 ¹⁴⁶ França	Investigar a relação da expressão de CD86 e a citotoxicidade induzida por sensibilizadores	U937 a uma densidade de 1×10^6 células/mL	Os sensibilizadores, incluindo a PPD, foram dissolvidos em meio de cultura, sem menção a concentração utilizada	Expressão de CD86, detecção da apoptose avaliação quantitativa de caspase-3 ativa e inibição da apoptose dependente de caspase	PPD aumentou a expressão de CD86 de forma dose-dependente. Na presença de PPD o CD86-SI não excedeu 200 a 250 e a viabilidade celular não foi afetada. PPD apresentou uma regulação positiva da expressão CD86 na ausência de citotoxicidade significativa	A expressão aumentada de CD86 em resposta a PPD não está diretamente ligada à citotoxicidade ou apoptose resultante da exposição ao sensibilizador
Schreiner et al., 2007 ¹⁴⁷ Alemanha	Desenvolvimento e validação de um ensaio <i>in vitro</i> para avaliar o potencial de sensibilização	Cocultura de HaCaT e monócitos a uma densidade de 6×10^6 e $2-3 \times 10^7$ células/mL, respectivamente	HaCaT foram criopreservadas em FCS com DMSO (10%), em seguida os monócitos foram semeados sobre os queratinócitos. PPD (31,25, 62,5, 125 e 250 μ M) foi dissolvida em etanol absoluto e adicionada ao meio de cultura	Ensaio de sensibilização, análise FACS e ELISA	PPD induziu citotoxicidade na cocultura. A aplicação de PPD (31,25 μ M) gerou uma regulação positiva de CD86. Concentrações acima de 125 μ M não forneceram células vitais suficientes para o cálculos de CD86	A inovação do teste testado no estudo permitiu identificar a sensibilidade às alergias de contato

Legenda: BB – Base de Bandrowski.. IL-4, 5 e 13 – interleucina 4, 5 e 13. TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa. MIP-1 α - Proteína Inflamatória de Macrófagos-1 alfa. MIP-1 β - Proteína Inflamatória de Macrófagos-1 beta. RANTES - Regulado após Ativação, Expresso e Secretado Normalmente por Linfócitos T. TCD4⁺ - linfócitos T com cluster de diferenciação 4. U937 - Células mieloides humanas. NiSO₄ - Sulfato de níquel . CD86-SI - Índice de Estimulação de CD86. ELISA - Ensaio Imunoenzimático. Ensaio de FACS - citometria de fluxo.

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para a revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
dos Santos et al., 2010 ¹⁴⁸ Países Baixos	Descrição de um método potencial para classificação de sensibilizadores de acordo com sua potência irritante usando EE	Queratinócitos de prepúcio neonatal e EE	Cocultura: queratinócitos foram cultivados, por 4 dias. Em seguida, foi adicionado ao meio ácido ascórbico e os EE, e cultivados por 10 dias, seguido pelo tratamento com PPD (10, 30, 100 e 300 mM). Células reconstruídas: células epidérmicas foram mantidas em especial* por 24 horas, depois foram expostas a PPD dissolvida em DMSO (0,1% v/v para queratinócitos submersos e 1% v/v para EE)	Ensaio de MTT, e ELISA e IL-1a Cálculo do EE-EC50 (concentração química efetiva necessário para reduzir a viabilidade celular em 50%) e o valor EE-IL-1a10 (concentração química aumentada da secreção de IL-1a em 10 vezes)	Valores encontrados para a PPD foram: EE-EC50 (0,16 - sensibilizador cutâneo forte), HRIPT (6,9) e RE-IL-1a10 (3,08). A PPD não conseguiu reduzir a atividade metabólica do EE na concentração solúvel mais alta testada, devido à sua interferência no ensaio com MTT	A irritabilidade pode ser, em parte, um fator determinante da potência do sensibilizador
Katsumi et al., 1982 ¹⁰⁰ Japão	Investigar os efeitos da PPD em ratos F344	Toxicidade aguda: ratos F344, de ambos os sexos, com 6 semanas de vida, foram divididos em 5 grupos, contendo de 10 a 11 ratos cada. Toxicidade crônica e carcinogenicidade: ratos F344, de ambos os sexos, foram divididos em 3 grupos	Toxicidade aguda: foram alimentados com dieta em pó contendo PPD (0,4, 0,2, 0,1 e 0,05%) e o grupo controle recebeu dieta normal. Toxicidade crônica: G1 e 2, com 63 a 69 ratos de cada sexo, foram alimentados com dieta contendo PPD (0,1 e 0,05%). G3, com 24 a 25 ratos de cada sexo, foi alimentado apenas com a dieta normal	Teste de carcinogenicidade e de toxicidade aguda e crônica	Toxicidade aguda: PPD (0,4%) , na semana 12, levou a um retardamento de peso corporal, o peso desse grupo era metade do grupo controle. PPD (0,4%) levou ao aumento da porcentagem do peso do fígado e dos rins. Não ocorreu alterações histopatológicas do fígado e rim, apenas uma degeneração gordurosa no fígado quando tratados com as doses elevadas. Toxicidade crônica: fêmeas do que receberam 0,1% tiveram os pesos médios do corpo e do baço foram menores. As fêmeas do que receberam 0,05% tiveram o peso médio do baço menor. Ambos os sexos, apresentaram lesões neoplásicas. Essas lesões foram observadas em 10 (27,8%) de 36M que receberam 0,1%, 8 (22,9%) de 35M que receberam 0,05% e 6 (31,6%) de 19 M no grupo controle	PPD não apresentou efeitos carcinogênicos, quando comparado ao grupo controle

Legenda: PPD – parafenilenodiamina. EST1000™ - Pele Epitelial Reconstruída 1000. RHE™ - Epiderme Reconstruída Humana. HRIPT - Teste de Patch de Reação Cutânea Máxima Observada Humana. MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio. IL-1a10 - Interleucina 1 alfa 10. LLNA-EC (%) - Ensaio Local no Linfonodo Efetivo (%). EE-EC50 (%) - Concentração Eficaz de Equivalente Epidérmico 50 (%). EE-IL-1a10 - Interleucina-1 alfa 10 de Equivalente Epidérmico. *Meio de Manutenção EST1000™ ou RHE™

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para a revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
Buzzella et al., 2019 ¹⁴⁹ Itália	Uso do protocolo h-CLAT em ingredientes e produtos cosméticos	THP-1	Diversos produtos foram utilizados no estudo, incluído a PPD. PPD (5000 µg/mL ou na concentração máxima solúvel) foi solubilizada em salina, em seguida adicionada ao meio de cultura. No teste de citotoxicidade modificado as células foram expostas aos produtos químicos, sendo a PPD usada a na concentração final no poço de 1000 µg/mL	Teste de viabilidade celular, citotoxicidade modificado e análise estatística	PPD (31 µg/mL) gerou uma viabilidade de 75% nas células	Na análise de citometria de fluxo, foi possível observar que as células tratadas com PPD da pele apresentaram uma distribuição característica, com uma segunda subpopulação evidente, caracterizada por uma diminuição consistente de FSC e um aumento de SSC
Kumar et al., 2020 ¹⁴² Índia	Determinação da genotoxicidade dos compostos presentes na tintura de cabelo e da capacidade protetora anticancerígena do EGCG	PBLs	Diferentes concentrações dos ingredientes da tintura de cabelo foram utilizadas. PPD + RES + H ₂ O ₂ (33,33 µg/mL + 33,33 µg/mL + 1,028 µg/mL até 200 µg/mL + 200 µg/mL + 6,17 µg/mL) foram adicionadas ao meio de cultura. A tintura de cabelo foi preparada utilizando uma proporção igual de volume de PPD, RES e 3% de H ₂ O ₂	Ensaio de cometa, SCE e análise estatística	Concentração dos ingredientes da tintura de cabelo (PPD, RES e H ₂ O ₂) foi genotóxica, como evidenciado pelo aumento do valor do momento da cauda e da frequência de SCE nas células tratadas. Quando a tintura de cabelo foi combinada com EGCG, houve uma diminuição no valor do momento da cauda e na frequência de SCE, de forma dose-dependente	EGCG reduz significativamente a genotoxicidade provocada por tinturas de cabelo

Legenda: h-CLAT - Teste de Ativação de Linhagem Celular Humana. THP-1 – linhagem celular monocítica. PPD – parafenilenodiamina. FSC - espalhamento direito. SSC - espalhamento lateral. RES – resorcinol. H₂O₂ – peróxido de hidrogênio. EGCG - epigallocatequina galato. PBLs – linfócitos do sangue periférico humano. SCE - troca de cromátides irmãs.

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para a revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
Qin et al., 2018 ¹⁸⁰ China	Avaliação do potencial genotóxicos da PPD	Cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> (A97a, TA98, 100 e 102). CHL (23.000 células por poço). Para o teste de micronúcleo: camundongos (25M, distribuídos em 5 grupos). Para o ensaio Pig-a: camundongos Sprague-Dawley (25M)	Ensaio de mutação reversa bacteriana: PPD (0,312, 0,625, 1,25, 2,5 e 5 mg/placa), dissolvido em água deionizada esterilizada, foi utilizado no meio de cultura. Ensaio de aberração cromossômica em células de mamíferos: Após o crescimento celular, as células foram tratadas com colchicina (4µg/mL) por 4 horas e solução hipotônica. PPD (312, 156 e 78µg/mL) foi preparado em PBS com ou sem a mistura de S9. Teste de micronúcleos em eritrócitos de mamíferos: Os animais foram expostos a PPD (25, 50 ou 100 mg/Kg, duas vezes ao dia) por gavagem oral, sendo a ciclofosfamida (40mg/Kg) usada no grupo positivo. Após 6 horas do segundo tratamento, os animais foram sacrificados, e as células ósseas foram extraídas do esterno. Ensaio Pig-a: PPD foi administrado oralmente (12,5, 25 e 50mg/Kg/dia) por 28 dias consecutivos, em três doses diárias	Ensaio de mutação reversa bacteriana, aberração cromossômica em células de mamíferos. Teste de micronúcleos em eritrócitos de mamíferos e ensaio de mutação Pig-a	PPD mostrou um aumento significativo na formação de colônias revertentes na cepa TA98 com a mistura de S9, indicando capacidade mutagênica. PPD (0,156, 0,312 e 0,625 mg/placa) apresentou efeito inibitório bacteriano nessas doses. PPD (78, 156 e 312 µg/mL) causou um aumento significativo de aberrações cromossômicas em CHL, na presença ou ausência da mistura S9, com uma resposta não linear. PPD (50 e 100 mg/Kg) aumentou MN-PCE em camundongos NIH, indicando efeito genotóxico, com uma resposta não linear. No dia 8, PPD (25 e 50 mg/Kg/dia) aumentou, de forma dose-dependente, o valor de RETCD59- em relação aos controles, alcançando o valor máximo no dia 15, e depois diminuindo até o dia 29	PPD apresentam efeitos mutagênico e genotóxicos
Lauenstein et al., 2014 ¹⁵⁰ Alemanha	Analisar os efeitos após a exposição aguda a produtos químicos	PCLS foram doadas por pacientes com idade variando entre 50 e 70 anos e 80% deles eram fumantes	PCLS foram incubadas com diversos produtos químicos, entre eles a PPD, que foi dissolvida em DMSO até a concentração final desejada. Foi testada em pelo menos 3 doadores biológicos, e após 24 horas ocorreu a análise do sobrenadante da cultura celular e do PCLS	Ensaio de proliferação WST-1, ELISA, ensaios MESO Scale, determinação de proteínas, análise estatística	PPD afeta a viabilidade celular em diferentes concentrações, apresenta capacidade de induzir resposta inflamatória nas PLCS por aumento de citocinas pró-inflamatórias (IL-1a e TNF-α) e afeta a produção de citocinas associadas as respostas imunes tipo TH1 e 2	Citocinas foram induzidas por alérgenos, mas não podem ser consideradas como biomarcadores

Legenda: CHL - células pulmonares de hamster chins. MN-PCE - taxa de micronúcleos em eritrócitos policromáticos. RETCD59- reticulócitos defeituosos negativos para CD59. RBCCD59- eritrócitos defeituosos negativos para CD59. PCLS – fatia de pulmão humano de precisão. EC25 e 50 (concentração efetiva que reduz a viabilidade celular em 25 e 50%). THP-1 EC25: Concentração Efetiva 25 (EC25) usando a linha celular THP-1. NCTC EC25: Concentração Efetiva 25 (EC25) usando a linha celular NCTC. RAT inhal LD50: Dose Letal Média (LD50) por inalação em ratos. Rat linha deposited dose: Dose administrada de uma substância em ratos durante um estudo. IL-1a – interleucina 1a. TNF-α – fator de necrose alfa.

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para a revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
Funch et al., 2023 ¹⁷³ Dinamarca	Investigar a resposta imune a alérgenos de contato relevantes clinicamente, com foco no papel das células T residentes na inflamação desencadeada por esses alérgenos e no potencial envolvimento dos mecanismos imunopatogênicos do processo	Camundongos fêmeas C57BL/6, com idades entre 6 e 8 semanas, foram utilizados. A depleção de células TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺ foi realizada com anticorpos InVivoPlus IgG2b-κ anti-mouse CD8α e CD4	Diversos alérgenos foram usados no teste, inclusive a PPD. Modelo de hipersensibilidade de contato: camundongos foram tratados por pintura epicutânea com PPD (0,48%) diluída em uma solução veicular de OOA na proporção de 1:4 ou apenas OOA nos grupos de controle. A sensibilização ocorreu após 3 dias, e foi usado 25 µL de PPD no dorso de ambas as orelhas ou com 50 µL de solução alergênica no abdômen raspado. Os camundongos foram desafiados por 21 dias, sendo a resposta medida pela espessura da orelha às 24, 48, 72 e 96 horas após o desafio. Depleção de células TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺ : injeções intravenosas na cauda, de anticorpo diluído (200 µg) diluído em PBS, durante a sensibilização e por injeções intraperitoneais logo antes do primeiro e do segundo desafio (dia 21 e 42)	ELISA, citometria de fluxo, análise de microscopia de fluorescência e protocolos de depleção celular	PPD tem a capacidade de induzir inflamação na pele e aumento da espessura da orelha. PPD induz o influxo local de TRM, o que foi observado pelo aumento do acúmulo de TCD8 ⁺ nas orelhas tratadas. PPD induz o influxo de neutrófilos, correlacionando-se com o número de células TRM. PPD também aumentou os níveis de CXCL1 e CXCL2, o que está correlacionado com o recrutamento de neutrófilos. A depleção de TCD4 ⁺ intensifica a resposta de TRM e a resposta inflamatória durante o tratamento com PPD	PPD têm a capacidade de gerar TRM, que recrutam neutrófilos após a reexposição ao alérgeno. No entanto, isso geralmente é contrabalançado pela indução simultânea de células TCD4 ⁺ anti-inflamatórias
Del Bufalo et al., 2011 ¹⁵¹ França	Investigação dos efeitos de 6 sensibilizadores de e 3 não sensibilizadores na produção de citocinas pró-inflamatórias e no perfil metabólico do ácido araquidônico após estimulação por LPS	Cultura: U-937 (0,5x10 ⁵ células/mL) Estudo do metabolismo do AA: U-937 (1x10 ⁶ células/mL com 1 µCi [3H]AA	Diversos produtos foram utilizados, entre eles a PPD. A PPD foi dissolvida em DMSO (concentração final inferior a 0,4%)	Estudo de viabilidade, RT-PCR análise dos metabólitos de ácido araquidônico [3H]AA e metabólitos intracelulares. Avaliação da expressão proteica intracelular de COX-2, ensaio de atividade de COX-2 e EIA	PPD foi classificada como um sensibilizador forte, no entanto, os resultados foram inconclusivos, pois o composto não demonstrou capacidade de oxidar TMPD. Não foi observada nenhuma inibição da atividade da COX-2 pela PPD, embora essa propriedade não possa ser completamente excluída devido à interferência da PPD no sistema de leitura	Não foi possível identificar o mecanismo de inibição do PGH2, uma vez que a OOD não afetou a mobilização de AA pela PLA2, nem a expressão de COX-2

Legenda: TRM - células T residentes na epiderme CD8⁺ de memória. PPD – parafenilenodiamina, OOA- óleo de oliva: acetona. TCD4⁺ - Linfócitos T auxiliares CD4⁺ TCD8⁺ - Linfócitos T citotóxicos CD8⁺. PBS - Solução Salina Tamponada com Fosfato. U-937 - Linha celular monocítica humana. [3H]AA - ácido araquidônico marcado com trítio. AA – ácido araquidônico. DMSO - dimetilsulfóxido. EIA - Ensaio Imunoenzimático. TMPD - (N,N,N',N'-Tetrametil-paraifenilenodiamina). PG – prostaglandina. COX-2 - Ciclo-Oxygenase-2.

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para a revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
Hu et al., 2009 ¹⁵² Estados Unidos	Avaliação da penetração dérmica e do metabolismo de dois ingredientes de tintura de cabelo, PAP e PPD	EpiDerm™ tecidos construídos possuem 0,64 cm ² e apresentam semelhança com a epiderme humana normal	EpiDerm™ foi em NMM. Soluções estoque de aminas aromáticas não marcadas e marcadas com deutério (PAP, d4-PAP, PPD e d4-PPD) foram preparadas frescamente em acetônitrila antes do uso. Para os testes de exposição de 24 horas PAP ou PPD foram reconstituídos com DMSO e, em seguida, diluídos com NMM. Para os estudos de exposição de 30 minutos, PAP ou PPD foram reconstituídos com DPBS aquecido e, em seguida, diluídos com NMM para obter as concentrações desejadas	Ensaio de citotoxicidade	PPD apresentou citotoxicidade leve quando exposta por 24 horas. Aproximadamente 50-70% de PPD foram metabolizados em produtos acetilados dentro de 24 h, sendo a proporção de MAPPD:DAPPD de 1:3 a 1:6. DAPPD foi estabelecida como o metabolito principal e MAPPD secundário, ambos os metabolitos foram encontrados em NMM. PPD é saturável, e à medida que a concentração aumentava a proporção recuperada em NMM aumentava, e a proporção recuperada como DAPPD diminuía, e MAPPD permaneceu constante	PPD foi metabolizada em MAPPD e DAPPD. MAPPD foi considerado metabolito intermediário e DAPPD o principal metabolito recuperado
Yasunaga et al., 2006 ¹⁵³ Japão	Uso do teste Umu para detecção da genotoxicidade de derivados de fenilenodiamina e comparação com o teste de Ames	Cepa bacteriana <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535/pSK1002 com/sem mistura S9. Para a produção da fração S9, foram utilizados ratos <i>Sprague-Dawley</i> machos de 7 semanas	Diversas substâncias foram utilizadas, incluindo derivados de OPD, MPD e PPD. Os produtos apresentaram dose máxima de 5mg/mL, e foram solubilizados em DMSO. Teste de Umu: solução química (100µL) foi adicionada a suspensão bacteriana (400µL). Em seguida, foram adicionados 500 µL de mistura de S9 ou tampão de fosfato de sódio. Teste de ativação metabólica: adicionados 100 µL de 2,4-diaminotolueno (500 µg/mL) ou 2,5-diaminotolueno (500 µg/mL), e então foram adicionados 500 µL de cada concentração de mistura de S9	Teste de Umu, teste de ativação metabólica, teste de medição da atividade da beta-galactosidase	PPD apresentou resultados positivos com e sem mistura S9	PPD é genotóxica na presença ou ausência de S9

Legenda: PAP – aminofenol. PPD – parafenilenodiamina. EpiDerm™ – pele humana reconstruída. NMM - New Maintenance Medium. d4-PAP - p-aminofenol deuterado. d4-PPD – parafenilenodiamina deuterado. DMSO – dimetilsulfóxido. DPBS - solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco. DAPPD - N,N-diacetil-p-fenilenodiamina. MAPPD - N-monoacetil-p-fenilenodiamina. pSK1002 - vetor de DNA plasmídico. OPD – orto-fenilenodiamina. MPD – meta-fenilenodiamina.

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para a revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
Neves et al., 2007 ¹⁵⁴ Portugal	Avaliação da FSDC como modelo para discriminação entre sensibilizadores e irritantes por meio da análise de seus efeitos na expressão das proteínas CD40 e CXCR4	PBMCs obtidas de doadores humanos saudáveis. Monócitos CD14+ cultivados até a atingir 70–80% de confluência. Para o teste de viabilidade celular a densidade foi de 2×10^7 células/poço. MODCs foram semeadas a 3×10^7 células/poço. FSDC a uma densidade de 2×10^6 ou 125×10^3 células/cm ²	PBMCs foram ressuspensas e incubadas com anticorpos CD14 por 20 minutos. Monócitos CD14+ foram cultivados em meio suplementado com PBS, antibióticos, GM-CSF e IL-4. No teste de viabilidade, as células foram semeadas, e soluções estoque dos produtos foram adicionadas. FSDCs foram preparadas para análise por Western blot e Imunocitoquímica. Diversos sensibilizadores (cutâneos ou não) e irritantes foram usados, inclusive a PPD (50µg/mL) dissolvida em PBS	Teste de viabilidade de celular, avaliação do nível de proteína e Imunocitoquímica	PPD (50 µg/mL) aparentou causar um aumento na viabilidade celular; no entanto, esse efeito ocorreu devido a uma interação direta com o reagente MTT, resultando em um aumento da absorbância. PPD elevou os níveis de expressão das proteínas CD40 e CXCR4. Em MoDC e FSDC, a PPD intensificou os níveis de CXCR4	PPD exposta as células FSDC e MoDC levou a um aumento nos níveis de CXCR4 e CD40
Kobets et al., 2019 ¹⁵⁵ Alemanha	Avaliação das atividades de dano ao DNA de compostos cíclicos, incluindo compostos não substituídos e substituídos	Fígado embriofetal de galinha	Diversas substâncias foram utilizadas no estudo. PPD (1,2; 2,5 e 5 mg/ovo) foi dissolvida em Solutol HS15, preparado como uma solução aquosa a 20%. A aplicação foi realizada em doses de três injeções diárias, com veículos ou substâncias de teste administradas na bolsa de ar, entre os dias 9 e 11 de incubação	Ensaio Cometa e NPL	Foi possível detectar adutos de DNA induzidos pela PPD, indicando a ocorrência de danos ao DNA	Danos ao DNA são diretamente relacionadas com a estrutura química e substituição do anel aromático
Jen et al., 2023 ³³ Nigéria	Determinar os efeitos da mistura de LI e PPD na histologia da pele, fígado e tecido renal	Ratos albino Wistar. Uso de 30 ratos agrupados em 5 grupos, com peso médio de 135g	Aplicações na lombar raspada dos animais. G1: nenhuma aplicação na pele. G2: aplicação da pasta de LI (100mg) 1 vez por semana durante duas semanas. G3: aplicação da pasta de LI (100 mg) 1 vez por semana durante 4 semanas. G4: aplicação da pasta de LI (100g) + PPD 1 vez por semana durante 2 semanas. G5: aplicação da pasta de LI (100g) + PPD 1 vez por semana durante 4 semanas	Análise histológica e morfológica	LI sozinha não levou a alterações histológicas. LI + PPD levou ao afinamento do epitélio da pele, redução da quantidade de fibras de colágeno na derme, distorção no arranjo dos hepatócitos, infiltração de células inflamatórias no tecido hepático e distorção no arranjo das células epiteliais tubulares renais	Administração de LI + PPD leva a notáveis efeitos adversos

Legenda: FSDC - células dendríticas derivadas da pele fetal de camundongo. CDXCR4 - Receptor de Quimiocina tipo 4 do tipo C-X-C. PBMC - Células mononucleares do sangue periférico. MoDC - Linha de células dendríticas derivadas de monócitos periféricos. PBS – Solução Salina Tamponada com Fosfato. IL-14 – interleucina 14. GM-CSF - fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos. NPL - Marcação pós-laboratório com nucleotídeo 32P. LI - *Lwasonia inermis*. G1, 2, 3, 4 e 5: grupos 1, 2, 3, 4 e 5.

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para a revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
de Ávila et al., 2019 ¹⁵⁶ Brasil	Desenvolvimento de um teste que abordam eventos-chave dentro da via de resultados adversos de sensibilização cutânea, para avaliar o potencial alergênico de HPs	HaCaT, U937 e MUTZ-3	Avaliação da produção de IL-18: HaCaT ($1,5 \times 10^5$ células/mL) foram expostas ao meio de cultura, controles de veículo (0,4% de DMSO) ou concentração CV80 de controles de referência e materiais de teste por 24 horas. Ativação das células U937 e IL-8 foram realizados nas concentrações CV70 dos materiais. Para a expressão de CD86, as células foram expostas a 5 diferentes concentrações $< CV70$ ou $\leq 200 \mu\text{g/mL}$. Após 45 horas, foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-CD86 humano conjugado com FITC, ou IgG1 de controle isótopo conjugado com FITC. Avaliação de IL-8: U937 foram expostas a EC150 ou $200 \mu\text{g/mL}$ de cada material de teste. Para o teste de GARD Skin, as células (2×10^5 células/mL) foram expostas a diferentes concentrações dos materiais de teste, controles (água deionizada ou DMSO 0,1%) ou apenas meio de cultura. Para a análise da integridade e concentração do RNA total, as células (2×10^5 células/mL) foram expostas a cada material de teste por 24 horas	mDPRA, ensaio de IL-18, teste de USENS e detecção GARD skin	PPD é um sensibilizador forte para animais e apresenta reação positiva para humanos. As predições <i>in vitro</i> foram positivas para mDPRA, IL-18, USENS, IL-8-intra e GARD Skin. Na avaliação da expressão de CD86, o CV70 foi de 26,9 e o EC150 foi de 5,90. Os resultados da expressão de CD86 em PBMDC mostraram que o CV70 foi de 16,2	Os produtos de hena contendo PPD parecem estar associados a um maior risco de sensibilização cutânea quando comparados aos ingredientes de tintura capilar testados isoladamente
Kashima et al., 1996 ¹⁷⁸ Japão	Desenvolvimento de um sistema de triagem simples e eficiente para alérgenos de contato como uma alternativa aos testes animais convencionais	Porquinhos-da-índia albinos Hartley, fêmeas (5 animais por grupo), com peso médio de 250g, com 6 semanas de idade. Células linfocitárias sensibilizadas	Os animais foram sensibilização na região escapular, por meio do método de oclusão por 24 horas para a aplicação dos produtos. Após 5 dias da sensibilização, os linfonodos subescapulares, cervicais, auriculares, submandibulares e axilares foram coletados. Diversos produtos foram utilizados, incluindo a PPD (3% em água destilada). As células foram semeadas em placas de microtitulação e pulsadas com 74 kBq/poço de 3H-TdR	Ensaio de Proliferação de LNC. Marcação de BrdU e Coloração de Pironina. Teste de proliferação de linfócitos e análise estatística	SI encontrado para a PPD foi de 2,8. Indicando uma proliferação significativa das células dos linfonodos	Os resultados também mostraram uma correlação positiva entre a proliferação de LNC e o potencial de sensibilização de vários alérgenos de contato testados

Legenda: HPs - coloração capilar a base de hena. HaCaT - Queratinócitos humanos imortalizados. U937 - células de linfoma hisitocítico humano. MUTZ-3 - linha de células humanas imortalizada derivada de células progenitoras de sangue umbilical. IL-18 – interleucina 18. mDPRA - Ensaio de reatividade de peptídeo micro direto. FITC - fluoresceína isotiocianato. IgG1 - imunoglobulina G1. GARD Skin - Detecção rápida de alergia genômica. SI – índice de estimulação . kBq - kilobecquerel. 3H-TdR - 3H-timidina metilada. LNC - Células linfocitárias sensibilizadas. BrdU – Bromodeoxiuridina.

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para a revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
Bharali et al., 2009 ²⁶ Índia	Avaliação da hepatotoxicidade da PPD	Ratos Sprague-Dawley (20 animais, divididos em 4 grupos de 5), com peso variando entre 120 e 140g	Aplicação tópica (lado dorsal e livre de pelos) de PPD (0, 1, 2 e 3 mg/Kg), dissolvido em água bidestilada, por 30 dias	Análise bioquímicas, histológicas, da hemoglobina tecidual e estatísticas	PPD não afetou o peso corporal; no entanto, o peso do fígado apresentou um aumento significativo de forma dose-dependente. PPD levou ao aumento de ALT, AST e ALP e de lesão hepática de forma dose-dependente. Presença de necrose coagulativa centrolobular, inflamação periportal, deposição fibrinosa, hemorragias e aumento do acúmulo de neutrófilos no parênquima hepático. PPD (1mg/Kg) causou necrose periportal grave e inflamação, infiltração leucocitária através do trato portal. PPD (3mg/Kg) causou necrose centrolobular grave e dilatação da veia central. Todos os animais tratados com PPD apresentaram necrose maciça de hepatócitos centrolobulares e periportais, característica de necrose coagulativa e isquêmica, hemorragia extensa no tecido hepático e degeneração hidrópica de hepatócitos. Aumento da concentração de Hb, de maneira dose-dependente, sendo mais pronunciada em doses elevadas (3 mg/Kg)	Hepatotoxicidade mediada pela PPD parece ser aumentada pelo maior acúmulo de neutrófilos
Karri et al., 2021 ¹⁵⁷ Suécia	Comparação do perfil de citocinas após exposição das células HaCaT e THP-1, bem como de uma cocultura dessas células, a sensibilizadores cutâneos	HaCaT a uma densidade de $1,2 \times 10^4$ células/poço. THP-1 a uma densidade de 4×10^4 células/poço	Para a cocultura HaCaT ($1,2 \times 10^4$ células/poço) foram semeadas. No dia 2, THP-1 (4×10^4 células) foram adicionadas aos poço sobre HaCaT. Foram utilizados três compostos, no estudo incluindo a PPD. PPD (0, 10, 25, 50, 100, 250, 500 mg/mL) foi adicionada após 24 horas da incubação de HaCaT. THP-1 foi tratado com 80 µL de meio contendo o produto químico de teste ou controle veicular (volume total de 160 µL/poço). Para a cocultura: após 1-2 horas após a adição de THP-1 em HaCaT foi adicionado 80 µL do produto químico a cada poço	Medição da viabilidade celular, ensaio de citocinas multiplex/medições de citocinas, análise estatística e cálculo de SI	PPD causou liberação de IL-1b nos três modelos, e na cocultura a liberação de IL-18	O perfil de citocinas únicos dependem do tipo de hapteno e do modelo celular utilizado

Legenda: PPD – parafenilenodiamina. ALT - Alanina Aminotransferase. AST - Aspartato Aminotransferase. ALP - Fosfatase Alcalina. Hb – hemoglobina. HaCaT – queratinócitos humanos. THP-1 – linhagem celular derivada de um paciente com leucemia monocítica aguda. SI – índice de estimulação.

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para a revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
Lee et al., 2015 ¹⁸⁴ Coreia do Sul	Avaliação dos efeitos da PPD no crescimento, morte celular e senescência usando ensaios celulares e microarranjos de microRNA em nHHDPCs	nHHDPCs em diferentes densidades foram avaliadas quanto à viabilidade celular (5×10^3) e, para senescência, produção de ROS e perfil de expressão de miRNA, (2×10^6)	Teste de viabilidade celular: as células foram tratadas com PPD (0, 100, 200, 300, 400, 500 e 600 μ M) por 24 h. Análise do ciclo celular: as células foram tratadas com PPD (0, 200, 400 e 600 μ M) por 24 h. Detecção da senescência: as células foram tratadas com PPD (0 ou 400 μ M). Detecção de ROS: as células foram tratadas com PPD (sem menção a concentrações) por 24 horas. Expressão de miRNA: as células foram tratadas com PPD (400 μ M) por 24 horas, e após isso o RNA total foi purificado. RNA total foi desfosforilado e marcado com pCp-Cy3	Ensaio de viabilidade celular, análise do ciclo celular, detecção de senescência celular (atividade de SA- β -gal), detecção de ROS, avaliação da expressão de miRNA e análise estatística	PPD exibiu um efeito citotóxico, induzindo morte celular e arresto do ciclo celular na fase G2 de maneira dose-dependente. Ocorreu a indução da senescência celular ao promover estresse oxidativo. PPD levou a alteração dos perfis de expressão de miRNA	PPD é capaz de induzir vários efeitos citotóxicos através da alteração dos níveis de expressão de miRNA em nHHDPCs
Babich et al., 1992 ⁵² Nova Zelândia	Avaliação da citotoxicidade aguda das PD metiladas	Fibroblastos de camundongos BALB/c 3T3, com densidade de celular de $1,2 \times 10^4$ células/poço	Após a incubação da placa por 24 h, as células foram 'realimentadas' com meio não alterado (controle) ou com meio alterado (contendo diferentes concentrações de PDs). Após mais 24 h de incubação, os poços lavados foram inoculados com DMEM contendo NR	Ensaio vermelho neutro	PDs N-metilados, especialmente os tetra-, tri- e dimetilados N,N, apresentaram altas taxas de autoxidação e causaram significativo dano muscular em ratos. O p-PD 2,3,5,6-tetrametilado foi o mais autoxidante e miotóxico. O p-PD 2,5-dimetilado teve uma taxa de autoxidação duas vezes maior que o p-PD 2,6-dimetilado e causou mais dano muscular. O p-PD 2-metilado foi o menos miotóxico. Em termos de citotoxicidade <i>in vitro</i> , a potência aumentou com o grau de metilação, exceto para as formas tetrametiladas, que foram menos citotóxicas do que o esperado	Os isômeros o-PD e m-PD são menos tóxicos do que os isômeros p-PD. Os p-PD, o-PD e m-PD não causam necrose muscular

Legenda: nHHDPCs - células normais da papila dérmica do cabelo humano. ROS - espécies reativas de oxigênios intracelular. pCp-Cy3 - ondas de ácido nucleico marcadas com corantes fluorescentes a fosforotioato de 3' de fita dupla. SA- β -gal - β -galactosidase associada à senescência. PD- fenilenodiaminas. BALB/c 3T3 - linha celular derivada de fibroblastos de embriões de camundongos da linhagem BALB/c. DMEM - Meio Essencial Mínimo Modificado de Dulbecco. PBS - Solução Salina Tamponada com Fosfato. NR - neutral red.

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para a revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
Garrigue et al., 2006 ⁵⁶ França	Investigação das propriedades genotóxicas da PPD, MAPPD e DAPPD	Teste de Ames: cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98, 100, 1535, 1537 e 102. Ensaio Hprt do linfoma de camundongos foram utilizadas células L5178Y heterozigotas (tk+/tk-) com 10 ⁷ células em 20 mL de RPMI. Para a determinação da resistência à 6-TG as células foram semeadas a uma estimativa de 2×10 ⁴ células/poço	No teste de Ames, as cepas foram expostas ao veículo, controle ou PPD (dissolvido em DMSO 1%) por 3 horas, na presença ou ausência de S-9. No ensaio de viabilidade celular, dois experimentos independentes foram realizados. No primeiro, o tratamento iniciou 24h após estimulação com PHA, com 20h de exposição na ausência de S-9 e 3 h na presença de S-9, seguidos de períodos de recuperação de 28 e 45h, respectivamente. No segundo experimento, o tratamento começou 48h após a estimulação com PHA, com a mesma duração de tratamento e recuperação	Teste de Ames, Hprt, MNT e análise estatística	No teste de Ames, a PPD foi ligeiramente mutagênica na cepa TA98 na presença de S-9. Em doses tóxicas, a PPD não induziu mutação no locus Hprt, tanto na ausência quanto na presença de S-9, sugerindo que a PPD não é mutagênica em células de mamíferos. No teste de MNT, a PPD induziu MN em linfócitos periféricos de sangue humano em cultura na presença de S-9, quando testada após estimulação com PHA (24h). A PPD induziu MN tanto na ausência quanto na presença de ativação metabólica, quando testada após estimulação com PHA (48 h)	PPD tem um potencial genotóxico leve <i>in vitro</i> , embora seja não mutagênico em células de mamíferos. MAPPD e DAPPD são biologicamente menos reativos que a PPD
Gibson et al., 2015 ¹⁵⁸ Inglaterra	Uso de um ensaio de priming de células T para avaliar a ativação de células T de memória e imaturas	PBMC (1,5×10 ⁷) foram isoladas tanto do sangue periférico de pacientes com alergia a tinturas capilares quanto de doadores saudáveis. Ensaio de priming de células T: monócitos CD14 ⁺ foram cultivados com GM-CSF e IL-4 para geração de CD. O cultivo ocorreu com CD (8×10 ⁶ células/poço) e células TCD3 ⁺ imaturas ou de memória (2,5×10 ⁶ células/poço)	Teste de transformação linfocitária: as PBMC foram cultivadas com PPD ou BB (2-10 µM) por 5 dias. Ensaio de priming de células T: as células dendríticas (CD) e células TCD3 ⁺ foram cultivadas com PPD ou BB (5 µM). Geração de clones de células T e medidas de clonagem: após as duas etapas acima, por 2 semanas, ocorreu a geração dos clones de células T específicos para o antígeno. Os clones (5×10 ⁴ células/poço; 200 µL) foram cultivados com APC irradiadas (1×10 ⁴ células/poço)	Teste de transformação linfocitária, ensaio de priming, geração de clones de células T, medidas de clonagem e análise estatística	Clones responsivos à BB era CD4 ⁺ e não reagia a PPD. Clones CD4 ⁺ e CD8 ⁺ com reatividade a PPD foram detectados, sendo que 25% deles apresentaram baixa reatividade à BB. Clones de pacientes alérgicos secretaram citocinas como IFN-γ, IL-13 e IL-22. Em doadores saudáveis, respostas proliferativas e secreção de citocinas específicas para a BB foram observadas tanto em células T de memória quanto imaturas. Clones de células T gerados a partir das culturas responsivas à BB reagiram à BB, mas não a PPD. Não foram detectadas respostas específicas para PPD em células T de memória ou imaturas de doadores saudáveis	BB estimula células T de memória em doadores saudáveis e faz priming de células T imaturas quando ligado a CD autólogas. O priming de células T imaturas contra a PPD falhou, sugerindo que um fator de susceptibilidade individual

Legenda: MAPPD - N-monoacetilado. DAPPD - N,N-diacetilado. MNT - Teste de Micronúcleos. MN - micronúcleos Mutagênicos. Hprt - Hipoanxantina-guanina fosforribosiltransferase. L5178Y - linhagem de células de linfoma de camundongo. 6-TG - 6-tioguanina. PHA - fito-hemaglutinina. BB - base de Bandrowski. PBMC - células mononucleares do sangue periférico. CD14⁺ - cluster de diferenciação 14. APC - células apresentadoras de antígeno. IL-13, 14 e 22 – interleucina 13, 14 e 22. CD – células dendríticas. IFN-γ – interferon γ.

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para a revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
Farrell et al., 2008 ¹⁷⁵ Inglaterra	Explorar o potencial imunogênico de PPD e BB por meio da avaliação de proliferação após reestímulo antigênico	Camundongo BALB/c, fêmeas, com idade variando entre 8 e 12 semanas. CD (densidade de 3×10^6) foram geradas a partir da medula óssea de fêmur e tibia. CE (densidade de $1,5 \times 10^5$) foram obtidas da fração linfocitária	A imunização por PPD e BB (5–25 mg/Kg, 25% (v/v) de DMSO em PBS) foi realizada na presença ou ausência de adjuvante completo de Freund, por meio de uma única injeção subcutânea. CD foram geradas, cultivadas e utilizadas como APC no ensaio de proliferação. Para a determinação da resposta proliferativa, as células foram incubadas com PPD ou BB (0,01–10 µg/mL), seguida pela adição de [3H]timidina. As células foram colhidas e a radioatividade incorporada foi medida. Supernatantes dos linfócitos foram coletados antes da adição de [3H]timidina para análise da secreção de citocinas/quimiocinas. CE e CD foram pulsadas com BB e usadas como fonte de APC	Protocolo de sensibilização, geração de CD, medição da secreção de citocinas e quimiocinas, avaliação do conteúdo de proteínas, determinação do mecanismo de APC, avaliação da ligação irreversível da BB, determinação do destino de BB na presença e ausência de glutatona	Células do baço de camundongos expostos à BB proliferaram. As células proliferantes secretaram altos níveis de IFN- γ, GM-CSF e IL-2. CD irradiadas, mas não fixadas, pulsadas com BB estimularam a proliferação, indicando um mecanismo clássico de hapteno envolvendo ligação irreversível da BB a proteínas e processamento. A degradação da BB na presença de glutatona foi associada a uma estimulação mais forte de células T específicas em concentrações mais altas de BB	BB é um imunógeno potente em BALB/c
Goyal et al., 2015 ¹⁵⁹ Índia	Avaliação do potencial fototóxico da PPD sob radiação ultravioleta ambiente	Para o ensaio de viabilidade, HaCaT foi usada a uma densidade de 2×10^4 células/poço. Para o ensaio de micronúcleo HaCaT foi usada a uma confluência de 70%	Ensaio de viabilidade e determinação de ROS foram realizados com PPD (5-100µg/mL). Ensaio de micronúcleo, as células foram tratadas com PPD (25 µg/mL), com ou sem UV A. No ensaio EB/AO, as células foram irradiadas e expostas ou não a PPD (25µg/mL). Para análise do ciclo celular, MTP, Western Blot e TEM, as células tratadas com PPD (25µg/mL) foram mantidas no escuro e expostas ao UV A. No ensaio de imunofluorescência, as células foram tratadas com PPD (25µg/mL) e irradiadas com UV B	Ensaio fotoquímico. MTT, NRU, SCGE, micronúcleo fotomicroscópico, LPO, EB/AO e imunofluorescência. Determinação da geração de ROS intracelular, medição do MTP, RT-PCR, análise do ciclo celular, Western Blot e TEM	A degradação e a redução da viabilidade celular pela PPD são tempo dependente. PPD induziu uma redução de 55% sob irradiação UVA e 75% sob UVB. PPD diminuiu o número de células na fase S e aumento do pico sub-G1. PPD fotossensibilizada (25 µg/mL) causou perda do potencial de membrana mitocondrial e danos oxidativos ao DNA	PPD gera radicais livres, causando danos ao DNA e levando à apoptose. A desestabilização lisossomal e a liberação de cathepsina B indicam o envolvimento das mitocôndrias e lisossomos no processo apoptótico

Legenda: CD – células dendríticas. APC - células apresentadoras de antígenos. CE - Células esplênicas. [14C]BB – base de Bandrowski marcada com carbono 14. IFN-γ - Interferon Gama, GM-CSF - Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos. IL-2 – interleucina 2. HaCaT - células de queratinócitos humanos. ROS - Espécies Reativas de Oxigênio. UVA e B - radiação ultravioleta A e B. NRU - Ensaios de Captação de Vermelho Neutro. LPO - peroxidação lipídica. TEM - Microscopia Eletrônica de transmissão. SCGE - Ensaio de eletroforese em gel de célula única. EB/AO - brometo de etídio/acridina laranja. MTP - potencial transmembrana mitocondrial. RT-PCR - Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real.

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para a revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
Frombach et al., 2018 ¹⁶⁰ Alemanha	Desenvolvimento de um ensaio de sensibilização que utilize biomarcadores linfocitários para a identificação de alérgenos de contato	CMSPs foram enriquecidas e preparadas a partir de tubos de coleta de sangue. QCs (densidade de $5 \times 10^5/\text{cm}^2$) foram isolados da pele humana como material residual de cirurgias plásticas	CMSPs recém-isoladas foram semeadas sobre os QCs (3×10^6 células/ cm^2). IL-4, GM-CSF e TGF- β 1 foram adicionados às coculturas em concentrações finais de 100, 100 e 10 ng/mL, respectivamente. Para estimular os linfócitos entre as células T, foram adicionados CD3/CD28-dinobeads (8×10^4). A PPD (15,6–125 $\mu\text{mol/L}$), dissolvida em acetona, foi adicionada ao meio	Ensaio de sensibilização, LCSA-ly, ELISA e análise estatística	PPD aumentou as subpopulações de linfócitos IL23R+/CD119+ ou CD124+, de forma dose dependente. PPD aumentou a expressão de CD44 em linfócitos. PPD induziu a migração da população CD44dim para a população CD44bright de maneira dependente da concentração. As concentrações de IL-4 aumentaram, enquanto as concentrações de IFN- γ diminuíram na cocultura após o tratamento com PPD	Possibilidade da adequação de marcadores de superfície de linfócitos para testes de sensibilização e avaliação de potência
Zeller et al., 2013 ¹⁶¹ Suiça	Investigação do potencial genotóxico de aminas aromáticas utilizadas em formulações de tinturas de capilares oxidativas e comparar os perfis de genotoxicidade do compostos e seus metabolitos acetilados	Cepa de <i>Salmonella typhimurium</i> (TA98, 100, 1535, 1537 e 102), V79 e HaCaT	Para a PPD, as soluções estoquem foram preparadas em DMSO (1% v/v) no meio para o tratamento. As cepas foram expostas aos compostos com e sem ativação metabólica (fração S-9). No ensaio Cometa, as células foram tratadas durante a fase de crescimento logarítmico, exceto nos experimentos de 48 horas. No ensaio de micronúcleo, os produtos de teste foram adicionados 24 horas após o início da cultura, com exposição das células por 20 horas sem S-9 e 3 horas com S-9, seguidas de períodos de recuperação de 28 e 45 horas, respectivamente	Ensaio cometa, micronúcleo e aberração cromossômica	Em concentrações mais altas, a PPD foi tóxica para as bactérias, resultando em uma diminuição nas contagens de colônias revertidas. A PPD (100 $\mu\text{g/mL}$) apresentou um forte efeito genotóxico em células V79 após 3 horas de exposição. A PPD (900 a 1200 $\mu\text{g/mL}$) em células HaCaT aumentou de forma moderada os efeitos genotóxicos	N-acetilação é uma reação de desintoxicação para PPD. A monoacetilação é suficiente para abolir completamente o potencial genotóxico

Legenda: CMSPs - Células Mononucleares de Sangue Periférico. QCs – Queratinócitos. LCSA-ly - Ensaio de sensibilização baseado em cocultura flexível com ponto final em linfócitos. IL-4 – interleucina 4. GM-CSF - fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócito. TGF- β 1 - fator de crescimento transformador beta 1. CD3/CD28- Dynabeads conjugados com anticorpos contra CD3 e CD28. V79 - linhagem celular de fibroblastos de pulmão de hamster chinês. HaCaT - linhagem celular de queratinócitos humanos imortalizados

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para a revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
Reena et al., 2015 ¹⁶² Malásia	Investigação dos efeitos da PPD e o envolvimento na apoptose de UROtsa	UROtsa foi gerada por isolamento do epitélio da bexiga humana primária e imortalizada com o antígeno T do SV-40	Teste de viabilidade celular, as células foram tratadas com PPD (12,5, 25, 37,5, 50, 100 e 200 µg/mL) ou DMSO (0,1%). Análise do ciclo celular e apoptose, foram expostas a PPD (12,5, 25, 37,5, 50 e 100 µg/mL). Detecção de ROS, o tratamento foi realizado com PPD (50 µg/mL) ou DMSO. Potencial de membrana mitocondrial, caspase-3 e Western Blot, as células foram tratadas com PPD (12,5, 25, 37,5, 50 e 100 µg/mL)	Teste de viabilidade celular, potencial de membrana mitocondrial, caspase-3, detecção de ROS intracelular, análise do ciclo celular e Western Blot	PPD diminuiu a viabilidade celular e aumentou o número de células hipodiploides sub-G1. Gerou ROS, induziu disfunção mitocondrial através da perda de potencial de membrana mitocondrial e aumentou o nível de caspase-3. Presença de regulação negativa de proteínas fosforiladas das vias NF-kB, mTOR e Wnt	PPD induziu apoptose através da ativação da via mitocondrial mediada por ROS, e possivelmente através da inibição das vias NF-KB, mTOR e Wnt
Lee et al., 2014 ¹⁶⁵ Estados Unidos	Desenvolvimento de um sistema de teste utilizando um <i>RealSkin</i> , e cocultura com MUTZ-3	<i>RealSkin</i> , e cocultura com MUTZ-3 (5x10 ⁴)	PPD (185 e 92,5µM), dissolvido em DMSO, foi aplicada topicamente no <i>RealSkin</i> sozinho ou em uma co-cultura com células de Langherans derivadas de MUTZ-3 por 48 horas.	Determinação do fenótipo das células de Langherans e ensaio de migração <i>Trans-well</i> com CCL19	PPD induziu em MUTZ-3 uma elevação nos níveis de secreção de IL-8. PPD (185µM) proporcionou a maior estimulação para CD86 e CD54	Método alternativo ao uso de animais com pele co-cultivada e células de Langerhans.
Huang et al., 2011 ¹⁶³ Taiwan	Investigação do mecanismo de autofagia induzida por PPD em SV-HUC-1	SV-HUC-1 com densidade de 2x10 ⁵ células/poço	SV-HUC-1 foram pré-tratadas com 5 µM de U0126 por 24 horas e estimuladas com PPD (0,018, 0,046 e 0,37 mM) por 24 horas. Para TEM, as células foram pré-tratadas ou incubadas com PPD (5 µM) de U0126 por 24 horas	Imunocitoquímica, Western Blot e TEM	PPD aumentou os autofagossomos, além das concentrações de Beclin-1 e LC3B. O inibidor de MEK suprimiu a autofagia e os efeitos da PPD sobre ERK1/2, Beclin-1 e LC3B, mas não sobre o p53 mutante	PPD promove a autofagia em células SV-HUC-1

Legenda: UROtsa - células uroteliais humanas. SV-40 - Vírus Simian 40. DMSO - Dimetilsulfóxido. ROS - espécies reativas de oxigênio. NF-Kb - fator nuclear kappa B. mTOR - Alvo da rapamicina em mamíferos. MUTZ-3 - linha celular derivada de células progenitoras hematopoéticas humanas. CCL19 - ligante 19 de quimiocina C-C. IL-8 - interleucina 8. CD86 e 54 - cluster de diferenciação 86 e 54. SV-HUC-1 - células uroepiteliais humanas imortalizadas. TEM - microscopia eletrônica de transmissão. LC3B - Cadeia leve 3B de proteínas associadas a microtúbulos. U0126 - 1,4-Diamino-2,3-diciano-1,4-bis(fenilmetiltio)butadieno. MEK - Quinase ativada por mitógenos. RK1/2 - Quinase regulada por sinal extracelular 1/2. p53 - Proteína tumoral p53

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para a revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
Chung et al., 1995 ¹⁸ Estados Unidos	Determinar se a atividade mutagênica da PPD e de seus derivados está relacionada à capacidade de induzir aberrações cromossômicas	Cepas de <i>Salmonella</i> /microsoma de Ames (TA98 e 100) e CHO-k1	Diversas substâncias foram utilizadas no estudo, incluindo a PPD (1, 30, 100, 300, 1000 e 3000ug) dissolvida em DMSO. O teste de mutagenicidade foi realizado na presença ou ausência da mistura de fígado S9. Para a determinação Cab, CHO-k1 foi incubada com controles ou compostos de teste em doses equivalentes a 1/2x, 1x, 2x e 3x TC50 na ausência de S9	Teste de mutagenicidade e citotoxicidade. Análise morfológica, determinação de Cab e medição do potencial de oxidação	PPD foi fracamente mutagênica para a linhagem TA98 na presença de ativação metabólica. PPD é mais tóxica do que a OPD, que, por sua vez, é mais tóxica do que a MPD. A adição de um grupo metil à PPD não afeta significativamente sua toxicidade, mas a adição de um grupo nitro ou sulfo reduz sua toxicidade. A PPD induziu um aumento relacionado à dose em aberrações cromossômicas em células CHO-K1 na ausência da mistura S9	Atividades mutagênicas e toxicidades. não se correlacionam com o potencial de oxidação ou quaisquer outras propriedades físico-químicas examinadas
Lee et al., 2013 ¹⁶⁴ Correia do Sul	Desenvolvimento e avaliação da nanopartícula incorporada com PPD utilizando HA como uma alternativa para corantes capilares	HaCaT	As nanopartículas de HA (60–90mg) foram dissolvidas em água deionizada e adicionadas à solução de PPD (10–40mg). Para o teste de viabilidade celular, HaCaT foi semeada a uma densidade de 3×10^4 células/poço. Após a incubação, foram tratadas com PPD e nanopartículas incorporadas com PPD dissolvidas em água deionizada e diluídas em DMEM sem soro. No ensaio cometa, HaCaT (3×10^4) foi exposta a PPD, nanopartículas incorporadas com PPD e nanopartículas vazias	Estudo de liberação do fármaco, teste de citotoxicidade, viabilidade celular, ensaio cometa e análise estatística	PPD apresentou citotoxicidade intrínseca e reduziu a viabilidade celular de forma dose-dependente	As nanopartículas incorporadas com PPD são candidatas promissoras para um novo corante capilar permanente
Kitchin et al., 1993 ¹³⁴ Estados Unidos	Encontrar, de forma experimental, preditores individuais de câncer com alta especificidade	Ratas Sprague-Dawley, fêmeas, com 90 dias de idade	Para a PPD (48 mg/Kg), a primeira dose oral foi administrada 21 horas antes do sacrifício das ratas, enquanto a segunda dose foi administrada 4 horas antes do sacrifício	Ensaio bioquímicos, atividade da ODC, ALT e conteúdo de citocromo P-450	A fração de DD foi de $0,099 \pm 0,02$; o ODC foi de $7,86 \pm 3,3$; a ALT (IU/L) foi de $14,1 \pm 1,9$; e o P450 (nmoles/g) foi de $2,16 \pm 0,21$	Teste de Ames apresenta limitações, especialmente em relação aos falsos positivos e negativos

Legenda: PPD – parafenilenodiamina. CHO-k1 - linhagem celular derivada do ovário do hamster chinês. DMSO - Dimetilsulfóxido. TC50 concentração tóxica para 50% das células. Cab - aberrações cromossômicas. OPD - orto-fenilenodiamina. MPD – meta-fenilenodiamina. HA - ácido hialurônico. HaCaT - Linha celular de queratinócitos humanos. PBS - Solução Salina Tamponada com Fosfato. DMEM - Meio Essencial de Eagle Modificado de Dulbecco. ODC - ornitina descarboxilase hepática. ALT - alanina aminotransferase sérica. DD - DNA eluído

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para a revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
Meisser et al., 2019 ¹⁸² Dinamarca	Investigação dos feitos da exposição a PPD na pele de indivíduos expostos ocupacional-mente expostos com presença ou ausência de sintomas clínicos por acompanhamento da expressão de proteínas SC e TJ	Foram utilizados dois grupos de pacientes, $18 \leq \text{idade} \leq 60$. 1º eram pacientes com DAC a PPD (10) e um grupo de cabeleireiros expostos a PPD sem DAC (11). 2º eram pacientes diagnosticados com DAC a PPD nos últimos 5 anos. e um grupo de cabeleireiros expostos a PPD (pelo menos por 5 anos) sem DAC. Cultura de pele 3D foram realizadas por meio do uso de epidermes humanas reconstituídas cultivadas por 13 dias	Para o teste de contato pacientes com DCA e cabeleireiros sem DCA foram submetidos ao teste de contato com 20 mg de 1% de PPD em VAS e um controle VAS de veículo aplicado nas nádegas, por oclusão de 48 horas. O sequenciamento de RNA foi feito por meio do uso de 9 biópsias de pacientes com DCA a PPD e 7 biópsias de não respondedores a PPD. A microscopia confocal foi realizada por meio de biópsias que foram coletadas no dia 4 de 4 cabeleireiros não respondedores e 1 paciente com DCA a PPD	Teste de contato e coleta de biópsias. Sequenciamento de RNA. Microscopia confocal. Análises estatísticas, de expressão diferencial e de enriquecimento de termos de ontologia genética. Quantificação de expressão gênica	RNA-seq demonstrou a redução de proteínas de JS e da SC na pele de pacientes com DCA grave. Expressão de CLDN (1, 8 e 11) CLMP, ocludina, MAGI (1 e 2) foi reduzida em pacientes com DAC grave. Expressão de CLDN1 e CLMP foram reduzidas em cabeleireiros não responsivos e pacientes com DAC leve. Expressão de FLG (1 e 2) foi reduzida em paciente com DAC. Pacientes com DAC apresentaram leve inchaço e vermelhidão a formação de bolhas severas (+++) seguida por necrose, eritema, espessamento da pele e pápulas inflamatórias	Regulação negativa de CLDN1 e CLMP ocorre pela exposição a PPD, e a desregulação das proteínas de TJ ocorrem devido a resposta a inflamação subsequente
Skazik et al., 2008 ¹⁸³ Alemanha	Estudo da reatividade cruzada de 8 produtos químicos	13 participantes (10M e 3H), sendo 11 testados com a série padrão de teste de contato alemã e 2 com a série padrão holandesa, os quais apresentaram reações positivas ao teste de contato com PPD. Posteriormente, foram realizadas as coletas de células PBMC, TCL e TCC	A aplicação tópica de PPD a 1% em petrolato foi realizada por dois dias, com leituras nos dias 2, 3 e 7. No ensaio de proliferação, PBMC (2×10^5 células) foram cultivadas sozinhas ou com TCL/TCC (1×10^5 células) e PBMC autólogas irradiadas ($2,5 \times 10^5$ células), na presença ou ausência de antígeno e PHA. Após 2 ou 6 dias, foram pulsadas com [³ H] timidina	Teste de contato, análise de proliferação de PBMC, TCL e TCC	Foram encontradas respostas proliferativas específicas das PBMC a PPD em 11 dos 13 casos, indicando uma forte reatividade imunológica a PPD. PPD também leva a reações cruzadas com outros compostos (AAB, DO3, BB, DDM, DY3, BBY e pTD).	A reatividade cruzada clinicamente observada entre diferentes compostos para-amino pode se basear em um receptor de células T reconhecendo epítomos similares desses compostos com baixa especificidade

Legenda: PPD – parafenilenodiamina. SC – estrato córneo. TJ – junções apertadas. VAS – vaselina. CLDN1, 8 e 11 - claudina-1, 8 e 11. FLG 1 e 2 – filagrina 1 e 2. PBMC - células mononucleares do sangue periférico. TCL - linhas de células T. TCC - clones de células T. PHA - fito-hemaglutinina. AAB - p-aminoazobenzeno. DO3 - Disperso Laranja3 . BB - Base de Bandrowski. DDM – diaminodifenilmetano. DY3 - Disperso Amarelo 3. BBY - Marrom Bismarck Y. pTD - p-toluenodiamina.

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para a revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
Woo et al., 2021 ¹⁶⁶ Correia do Sul	Determinação do efeito citotóxico da PPD e avaliação do efeito protetor de RSE	HaCaT	Para a análise de viabilidade celular, HaCaT (6×10^3) foram tratadas com diluições seriadas de PPD. Para a medição de ROS, HaCaT foram pré-tratadas com RSE e, em seguida, coradas com DCFH-DA ($5 \mu\text{M}$) em meio livre de soro. Após isso, PPD ($200 \mu\text{M}$) foi adicionada. Para avaliação do efeito protetor de SER, HaCaT (4×10^5 células/poço) foi, pré-tratadas com RSE (0, 2,5, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$) e depois tratadas com PPD	Teste de viabilidade celular, determinação de ROS e Western Blot	O pré-tratamento com RSE pode suprimir significativamente os efeitos citotóxicos induzidos pela PPD, incluindo a diminuição da viabilidade celular, o acúmulo na fase subG1 das células e a realocização da fosfatidilserina	A citotoxicidade induzida pela PPD estava associada à perda do potencial da membrana mitocondrial e à subsequente ativação da caspase e degradação da PARP
Tsujita-Inoue et al., 2014 ¹⁶⁷ Japão	Desenvolvimento e avaliação de um modelo de ANN para prever os limiares de sensibilização cutânea	AREc32 (5×10^4 células por poço)	Para o ensaio de citotoxicidade, após o cultivo os produtos químicos de teste foram dissolvidos em meio de cultura DMSO e 6 diluições binárias foram feitas. Em seguida, as células foram tratadas com 20 μL de PPD em várias concentrações	Teste de Ativação h-CLAT, SH, ARE e o coeficiente de partição octanol-água	Dados para LLNA - sensibilizador forte; EC3 (%) 0,16; limiar LLNA (%) 0,16; LogP: -0,39. Dados para h-CLAT - positivo; EC150 ($\mu\text{g/mL}$) 2,09; CV75 ($\mu\text{g/mL}$): 36,7. Teste SH - positivo; RFI (%) 32,3; MAC: 67,7. Dados do ARE: positivo; Imax: 4,72; EC15 ($\mu\text{g/mL}$): <13,4; Cmax ($\mu\text{g/mL}$): 26,875	PPD é um forte sensibilizador e requer concentrações relativamente baixas para induzir efeitos. Ela provoca a ativação das células imunes em baixas concentrações, resultando em uma forte reatividade celular
Blömeke et al., 2008 ¹³¹ Alemanha	Investigação de dois derivados acetilados da PPD como agentes capazes de provocar DAC	455 indivíduos (273M e 182H)	MAPPD e DAPPD foram dissolvidos em 1% em petrolato, e testadas em indivíduos com problemas de pele entre 2000 e 2002. As leituras foram feitas nos dias 2, 3 e 4	Testes epicutâneo e classificação dos resultados por ICDRG	Dos 455 indivíduos testados (182 homens e 273 mulheres), 16 (3,5%) foram positivos no teste de contato para PPD. Ninguém reagiu à MAPPD (0 de 16) e apenas 1 pessoa apresentou uma reação positiva à DAPPD após 2 dias (1 de 455, 0,2%). Esse indivíduo era polissensibilizado (reagiu a 8 outros compostos não relacionados) e teve uma reação ++ à PPD (1 de 16)	A acetilação da PPD pode ser considerada uma reação de desintoxicação

Legenda: HaCaT - Queratinócitos humanos. RSE - *Rhus semilata* M. DCF - 2',7'-dicloro-dihidrofluoresceína. ANN - rede neural artificial. AREc32 - linhagem de fibroblastos embrionários de camundongos. LLNA - Ensaio Local do Linfonodo. h-CLAT - Teste de Ativação de Linha Celular Humana. EC3 - Concentração Efetiva 3%. EC150 - Concentração Efetiva 150% - CV75 - Concentração Viável 75% - RFI - Índice de Fluorescência Relativa - MAC - Concentração Máxima Aceitável - ARE - Elemento de Resposta Antioxidante - Cmax - Concentração Máxima. DAC - dermatite de contato aguda. MAPPD - N-Monoacetil-parafenilenodiamina. DAPPD - N,N'-Diacetil-parafenilenodiamina. ICRGD - *International Contact Dermatitis Research Group*.

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para a revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
Svalgaard et al., 2014 ¹³⁸ Estados Unidos	Investigação de efeitos imunológicos sistêmicos da PPD e DPCP	Camundongo BALB/c (40 animais, divididos em 5 grupos) com 6 semanas de idade	PPD (1 e 0,1%) foi dissolvida no veículo acetona/óleo de oliva (4:1) e aplicada no lado dorsal de ambas as orelhas dos animais. O tratamento ocorreu 1 vez ao dia por 3 dias (período de indução) e, em seguida, 2 vezes por semana durante 8 semanas (período de sensibilização). Para avaliação no citômetro de fluxo, as suspensões de células únicas foram preparadas a partir ALN, PLN, baço e fígado	Medição da espessura da orelha, análise intracelular de citocinas, QPCR, ensaio MSD-ELISA e análise estatística	PPD (1%) causou aumento significativo no inchaço das orelhas, indicando sensibilização e inflamação local. Também levou ao aumento de T CD8+ positivas para IL-17A e IL-10 em ALN, PLN e baço, e elevou os níveis de mRNA de IL-17A no pâncreas e fígado. Os níveis de IL-10 e IFN- γ aumentaram significativamente, enquanto IL-1 β diminuiu. Os níveis de IL-4, 5 e 10 caíram com a PPD (0,1%), e IL-12 diminuiu no soro com a PPD (1%). O tratamento aumentou os níveis de mRNA em tecidos da orelha, pâncreas e fígado, com destaque para o aumento de Foxp3+ no pâncreas e alterações nas células iNKT hepáticas positivas para IFN- γ e IL-4	PPD têm efeitos imunológicos locais e sistêmicos. Demonstrou um potencial em modular respostas imunes específicas, como a ativação de células T e B, a produção de citocinas e a frequência de células T reguladoras e iNKT
Bharali et al., 2012 ²⁵ Índia	Avaliação da toxicidade reprodutiva de PPD em ratos machos	Ratos da linhagem Sprague-Dawley (40H, divididos em 4 grupos: controle e G1-G3, com 10 animais em cada grupo)	Foram aplicados no lado dorsal sem pelos, durante 90 dias, água destilada ou PPD (1, 2 e 3 mg/Kg/dia). A cauda do epidídimo foi removida, pesada e fragmentada em 2,0 mL de solução PBS	Sensibilização o cutânea, contagem total de espermatozoides e morfologia espermática. Análise da LPO histológica e estatística	PPD causou uma redução dependente da dose na concentração de espermatozoides nas caudas dos epidídimos, com aumento significativo na porcentagem de morfologia anormal dos espermatozoides nos grupos tratados com 2 e 3 mg/Kg/dia. Houve um aumento significativo na taxa de peroxidação lipídica no tecido testicular. O epitélio seminífero dos ratos tratados com PPD (2 e 3 mg/Kg/dia) mostrou características morfológicas apoptóticas e perda de células germinativas. O número de células apoptóticas nos túbulos seminíferos aumentou de forma dependente da dose. No grupo tratado com 3 mg/Kg/dia, observou-se descamação das células germinativas no lúmen dos túbulos seminíferos, edema nos tecidos intersticiais, deposição fibrinosa na região basal dos túbulos seminíferos e retenção de espermátides	As concentrações de PPD utilizadas foram selecionadas por imitarem a dosagem real disponível na maioria das formulações de tintura capilar. O estudo demonstrou a capacidade da PPD de interromper o processo normal de espermatogênese por exposição tóxica repetida

Legenda: PPD – parafenilenodiamina. DPCP – difenilciclopropenona. ALN - linfonodos auriculares. PLN – linfonodos pancreáticos. RNA - Ácido Ribonucleico . QPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa . MSD-ELISA- Ensaio Imunoenzimático por Ligação de Anticorpos. T CD8+ - células T CD8 positivas. IL – interleucinas. IFN-c - Interferon-gama. mRNA - RNA mensageiro. Foxp3+ - fator de transcrição P3. iNKT - Células T Natural Killer invariantes. G1-3 – grupos 1-3. PBS - Solução Salina Tamponada com Fosfato. LPO - peroxidação lipídica.

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para a revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
Seydi et al., 2018 ¹⁶⁸ Irã	Avaliação dos efeitos de PPD nas células de fibroblastos isoladas da pele	Ratos Wistar, machos pesando entre 200 e 250 gramas. Células de fibroblastos de ratos	Para o teste de viabilidade celular, os fibroblastos foram cultivados e tratados com PPD (5-200 µM) por 24 horas. Para avaliar os níveis de ROS, os fibroblastos (1x10 ⁶ células) foram tratados com PPD (50, 100 e 150 µM) por 6, 12 e 18 horas. O colapso da membrana plasmática (PMN) foi avaliado com PPD (50, 100 e 150 µM) em fibroblastos (1x10 ⁶ células). Para medir o dano à membrana lisossomal, os fibroblastos foram expostos a PPD (50, 100 e 150 µM) por 6, 12 e 18 horas	Análise da viabilidade celular, produção de ROS, PMN, LPO, dano ao lisossomos e liberação de citocromo C	PPD, exceto na concentração de 5 µM, reduziu significativamente a viabilidade celular de forma dose-dependente, com IC50 de 100 µM. PPD aumentou significativamente os níveis de ROS em fibroblastos nas concentrações de 50, 100 e 150 µM, em todos os tempos de exposição. Também causou diminuição significativa do PMN de forma dependente de dose e tempo. PPD aumentou os níveis de MDA e a liberação de citocromo C de maneira dependente da concentração e do tempo. A liberação de acridina laranja na fração citosólica, indicando dano à membrana lisossomal, foi observada após 6, 12 e 18 horas de incubação. Além disso, houve aumento significativo na liberação de LDH em todas as concentrações de PPD O inchaço da orelha foi evidente após a exposição final a PPD, indicando que houve uma resposta imune. O aumento na espessura foi observado entre os dias 7 e 10 até o dia 14. Os linfonodos de animais tratados com PPD (0,6%) apresentaram significativamente menos células TCD3 ⁺ e números significativamente maiores de linfócitos B220 ⁺ . Um aumento pequeno, mas significativo, na expressão de mRNA de IFNγ e IL-4 foi observado nos linfonodos de camundongos tratados com PPD	A exposição à PPD aumentou a geração de ROS, PL, PMM e a liberação de citocromo C, sugerindo que a PPD pode induzir danos à membrana lisossomal. Os resultados indicam que a PPD possui uma toxicidade seletiva nas células de fibroblastos da pele, com as mitocôndrias sendo um dos principais alvos dessa toxicidade Não houve evidências de que esses produtos pudessem induzir qualquer tendência para uma resposta imunológica dominante TH2 em uma linhagem de camundongos que é propensa a desenvolver respostas TH2
Rothe et al., 2011 ¹³⁶ Estados Unidos	Avaliação da exposição dérmica repetida de PPD e pTD na indução de respostas imunes do tipo TH2	Camundongos BALB/c fêmeas com idade de 6 e 8 semanas	Uma solução aquosa de PPD foi preparada e diluída em acetona (18,75%) e óleo de oliva (25%). A aplicação ocorreu por via tópica e os animais foram tratados com PPD, pTD ou apenas o veículo 1 vez ao dia, nos dias 0, 5, 10, 11 e 12	Medição da espessura da orelha, análise de IgE sérico, da população de ALN, expressão de mRNA e análise estatística		

Legenda: PPD – parafenilenodiamina. ROS – espécies reativas de oxigênio. PNM - potencial de membrana mitocondrial. LPO – lipoperoxidação. MDA - conteúdo de malonaldeído. LDH - lactato desidrogenase. pTD - para-toluenodiamina. ALN - linfócitos dos linfonodos auriculares. TH2 - T-helper-2. IgE – imunoglobulina E. mRNA – RNA mensageiro. TCD3⁺ - células T que expressam a proteína CD3. B220⁺ - células B que expressam a proteína B220. IFNγ – interferon gama. IL-4 – interleucina 4.

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para a revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
Zanoni et al., 2015 ¹⁶⁹ Brasil	Investigação da toxicidade da PPD e seus subprodutos após auto-oxidação e reação com H ₂ O ₂	HaCaT	Viabilidade celular: HaCaT (5x10 ⁴ células/poço) foi tratada com PPD (5, 15, 25, 35 e 40µg/mL). ROS: HaCaT (3x10 ⁴) foi exposta ao meio sem soro contendo PPD com e sem H ₂ O ₂ . Ensaio cometa: HaCaT (2x10 ⁵) foi tratada com PPD (0, 5, 15, 30, 40 e 100 µg/mL), com ou sem H ₂ O ₂ . MDA: HaCaT (6x10 ⁴) foi tratada com PPD (20, 80 e 100µg/mL) com ou sem H ₂ O ₂ . 8-oxo-dG: HaCaT (15x10 ⁶) foi tratada com PPD (20, 80 e 100µg/mL)	ESR, viabilidade celular, detecção de ROS e MDA, ensaio cometa, ensaio de pós-rotulação de DNA, determinação de 8-oxo-dG e análise estatística	A EC50 da PPD é de 39,37 e 35,63 µg/mL após 24 e 48h, respectivamente, sem adição de H ₂ O ₂ para induzir oxidação. Quando a PPD (10 ou 100 µg/mL) é combinada com H ₂ O ₂ , a produção de ROS, após 1h, foi aumentada e com elevados níveis de dano ao DNA, após 4 horas de exposição. Após 24h de incubação, PPD (20 µg/mL) aumentou o nível de oxidação do DNA em HaCaT	Mecanismo de proposto pela formação de radicais altamente reativos, como o radical HO
Salami et al., 2023 ¹⁷⁰ Irã	Avaliação do mecanismo da toxicidade da PPD	Linfócitos humanos, doados por 20 pessoas saudáveis, na faixa etária de 18-30 anos. Linfócitos (1–1,5×10 ⁶ células por poço)	Para o teste de viabilidade celular, os linfócitos foram tratados com PPD (0,25–1 mM). Para a determinação de parâmetros celulares, os linfócitos foram incubados com ½, IC50 e o dobro (0,4, 0,8 e 1,6 mM) por 2, 4 e 6 horas	Teste de viabilidade celular, medição de ROS, LPO, e Ca ⁺² , potencial de membrana mitocondrial, GSH e GSSG, atividade de caspase-3, determinação de citocinas e apoptose celular	PPD reduziu a viabilidade celular em todas as concentrações testadas. PPD (0,8 e 1,6mM), nos períodos de 4 e 6h, aumentou a formação de A formação de ROS, sendo prevenida pela BHT. PPD (0,8 e 1,6mM) após 6 horas, aumentou os TBARS, sendo prevenida pela BHT. Após 2h de exposição de PPD (1,6mM), o potencial da membrana mitocondrial foi reduzido. Que continuou ao longo de 4 e 6h em todas as concentrações, sendo prevenida pela ciclosporina A. PPD (0,8 e 1,6 mM) causou o vazamento da membrana lisossomal em 4 e 6h após o tratamento, sendo prevenida pela cloroquina. Todas as concentrações de PPD causaram um colapso no GSH em 6h. Os níveis de GSSG foram aumentados em todas as concentrações e intervalos de tempo. O BHT inibiu o colapso no GSH e os aumentos no GSSG produzidos pela PPD. PPD (0,8 mM) aumentou a produção de todas as citocinas 24h após o tratamento. O aumento na geração de IFN-γ ocorreu com 0,4 mM de PPD em 24h. IC50 causou aproximadamente 27% de apoptose e 10% de necrose em linfócitos humanos isolados	Existe uma associação entre a carcinogenicidade da PPD e seus efeitos tóxicos em diferentes compartimentos do sistema imunológico

Legenda: HaCaT- queratinócitos humanos imortalizados. H₂O₂ - peróxido de hidrogênio. ROS – espécies reativas de oxigênio. ESR - Ressonância de Spin Eletrônico. MDA – malonialdeído. 8-oxo-dG - 8-Oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina. EC50 - concentração citotóxica efetiva mediana. ACMS - mecanismos de citotoxicidade acelerada. LPO - peroxidação lipídica. BHT - hidroxitolueno butilado. TBARS - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico. GSH – glutationa. GSSG – glutationa oxidada.

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para a revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
de Mas et al., 2017 ¹⁷⁴ Espanha	Avaliação da toxicidade da PPD como indutor de rabdomiólise	C2C12 e ratos Wistar fêmeas, com peso variando de 160 g ± 20% e idade de 8 semanas	Grupo controle recebeu o veículo e 4 grupos que receberam PPD (10, 20, 40 e 60 mg/Kg) em dose única, diluída em DMSO (300 µL). Os animais foram avaliados antes da administração, e 30 minutos, 1, 2, 4 e 8h após a administração. Todos os animais foram anestesiados, e amostras de sangue foram coletadas da cauda e do seio orbital retroocular. Ovários, rins, fígado, baço, coração e pulmões foram pesados e avaliados microscopicamente. Viabilidade celular e ligação de anexina-V-FITC: C2C12 (3,5×10 ³ células/poço) foi e tratada com PPD (1 a 100 µg/mL). Medição de FACS: C2C12 (4×10 ⁵ células/poço) tratadas com ou sem PPD (IC50 e IC80) por 24h	Ensaio de viabilidade celular, viabilidade reativa, ligação de anexina-V-FITC. Análise do ciclo celular, isolamento e derivação de metabólitos e análise de dados e métodos estatísticos	PPD (10 e 20 mg/Kg), após 10h, gerou uma atividade deprimida de mioglobulinúria. Em todos os momentos, PPD (40 e 60 mg/Kg) aumentou AST e ALT, além de aumento de LDH e CK após 24 h. PPD induziu a parada do ciclo celular na fase S e apoptose (40%) após 24 h de tratamento. PPD inibe a glicólise, a via não oxidativa da pentose fosfato, a renovação de glicogênio e a reação da ATPase, levando a uma redução na síntese de ATP	Os resultados do estudo revelam que houve um colapso no metabolismo da glicose, consistente com a diminuição na viabilidade celular observada em células C2C12 tratadas com PPD, além da mioglobulinúria e outros efeitos observados em ratos
Krasteva et al., 1993 ⁷⁵ França	Obtenção de uma melhor compreensão dos mecanismos de ativação das células T na sensibilização de contato a PPD	16 pacientes com histórico de sensibilidade de contato a PPD, com testes de contato positivos dos últimos 15 anos. O grupo controle foi composto por 4 pacientes com sensibilidade a outros sensibilizadores e 4 voluntários saudáveis	PBMC (2×10 ⁵ células em 200 µL por poço) dos pacientes foram tratadas com PPD, BB e BQ dissolvido em DMSO (0,4%). As concentrações variaram de 0,25 a 10 µg/mL e as culturas foram mantidas por 3 dias, com 1 µCi de [³ H]-timidina nas últimas 16h. Para gerar linhas de células T específicas, PBMC de um paciente alérgico foram cultivadas com PPD (1 µg/mL), BB ou BQ. Após 7 dias, foram cultivadas com IL-2 (20 U/mL) por mais 7 dias, sendo reestimuladas com os antígenos (1-5 µg/mL), na presença de PBMC autólogas irradiadas	Ensaios linfoproliferativos com avaliação da por meio da adição de [³ H]-timidina e contagem de cintilação líquida	PPD não induziu uma proliferação significativa de células T em 9 pacientes. células T específicas para PPD mostrou uma resposta proliferativa modesta (1µg/mL). A maior taxa de proliferação foi observada com BB, sugerindo que é mais específica para BB do que para PPD. A linhagem de células T específicas para BB não respondeu a PPD, mas proliferou fortemente ao BB, indicando que as células T específicas para PPD também são reativas ao BB. As PBMC de 8 indivíduos não alérgicos a PPD não responderam a PPD, BB ou BQ	PPD não é o hapteno imunogênico responsável pela hipersensibilidade, mas sim o BB. A PPD atua como pró-hapteno, sendo metabolizada na pele em produtos como o BB, que são imunogênicos

Legenda: PPD – parafenilenodiamina. C2C12 – linhagem celular de Células Mioblastos de Camundongo C2C12. DMSO - dimetilsulfóxido. FACS – citometria de fluxo. AST- aspartato aminotransferase. ALT - alanina aminotransferase. LDH - lactato desidrogenase. CK- creatina quinase. anexina-V-FITC - anexina-V-isotiocianato de fluoresceína. PBMC - células mononucleares do sangue periférico. BB - base de Bandrowski. BQ – benzoquinona.

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para a revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
Jowsey et al., 2006 ¹²⁸ Inglaterra	Avaliação das características da resposta de elicitación em voluntários alérgicos à PPD	Cada tintura (A e B) tiveram 4 grupos de 15 participantes. Os grupos formados pela classificação de alérgica a PPD. Grupo 1 (+) (9M e 6H), idade $28 \leq \text{idade} \leq 53$. No grupo 2 (++) (11M e 4H), $23 \leq \text{idade} \leq 55$. No grupo 3 (+++) (9M e 6H), idade variando de $29 \leq \text{idade} \leq 53$. No grupo 4 (controle) (12M e 3H), $21 \leq \text{idade} \leq 60$	Tintura A tinha concentração final de PPD de 0,5% e em B não era conhecida a concentração, (sugerida ser maior que A pelo resultado da avaliação). As amostras foram então aplicadas no braço de cada voluntário em Câmaras Finn1 separadas por 30 minutos, 1 e 24 horas	Teste de reação alérgica de elicitación	Reações positivas no teste de alergia em 30 minutos, 1 e 24h em pacientes previamente sensibilizados a PPD (+++). Reações positivas no teste de alergia após 24h em pacientes previamente sensibilizados a PPD (++)	Necessário realizar a avaliação da concentração de PPD nos produtos de tintura capilar, porque ocorre a influência na gravidade das reações alérgicas
Basketter et al., 2016 ¹³⁰ Tailândia	Examinar se a aplicação prévia do antioxidante vitamina C na pele seria capaz de reduzir as respostas alérgicas cutâneas a PPD	28 voluntários com histórico prévio, comprovado, de alergia a PPD	Foram utilizados PPD (1%, 0,5% e 0,1% em petrolato), tintura capilar teste contendo PPD a 1% e base de tintura capilar sem PPD. Foram aplicados simultaneamente em locais adjacentes na pele das costas. Um conjunto foi aplicado em uma área pré-tratada por 10 minutos com a formulação de vitamina C, e o segundo conjunto foi aplicado em uma área sem o antioxidante. Após 48 e 96 horas depois, as áreas foram avaliadas de acordo com as recomendações do ICDRG	Aplicação dos produtos, avaliação de respostas cutâneas e análise estatística	Elicitación da DAC	O tratamento da pele adjacente à área capilar com antioxidante (vitamina C) poderia ser uma estratégia para reduzir o impacto DAC causada pela tintura capilar
Lis et al., 1998 ¹²⁹ Itália	Investigação da sensibilidade a BQ e a derivados de benzeno	138 pacientes. 1º teste as diluições seriadas de BQ foram usados 22 pacientes sensibilizados à PPD (13M e 9H), $19 \leq \text{idade} \leq 72$. Para o controle, foram usados 22 pacientes sem alergia a compostos (12M e 8H), $18 \leq \text{idade} \leq 77$. 2º teste de contato, foram usados 116 pacientes (87M e 29H), $14 \leq \text{idade} \leq 80$, com DAC e histórico positivo de sensibilidade a pelo menos 1 compostos “para”	Para as diluições seriadas de BQ os participantes foram submetidos ao teste de contato com BQ diluído em petrolato branco (1%, 0,5%, 0,2%, 0,1%) e derivados de benzeno. No 2º teste de contato utilizados os derivados de benzeno 1,4-substituídos e a base de PPD (1% pet.). As substâncias foram aplicadas nas costas na parte superior e removidas após 2 dias	Teste de contato com e avaliação de acordo com os critérios do ICDRG	Reações positivas em teste de contato e elicitación da DAC. As reações positivas por derivados de benzeno foram presentes em 56,1%, sendo a PPD responsável por 89 casos	BQ não é o único intermediário na sensibilização cruzada de haptenos, sendo influenciado por outros produtos de oxidação e pela estrutura química dos substituintes na posição 4 do anel de benzeno

Legenda: PPD – parafenilenodiamina. ICRGD - *International Contact Dermatitis Research Group*. DAC – dermatite aguda de contato. BQ – benzoquinona. DAC - dermatite aguda de contato.

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para a revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
Wang et al., 2022 ¹⁸¹ China	Investigação sobre como a PPD afeta a qualidade dos oócitos, com foco particular na função mitocondrial e em outros marcadores celulares	Camundongos fêmeas da linhagem ICR. 3 semanas de idade. Oócitos de camundongos	Administração oral de PPD (0, 25 e 50 mg/Kg) durante 10 dias. A PPD foi dissolvida em DMSO	Observação morfológica dos ovários, maturação e fertilização <i>in vitro</i> de oócitos, ensaios de imunofluorescência, análise de intensidade de fluorescência, <i>immunoblotting</i> , detecção de ROS e mitocôndrias	A exposição à PPD não alterou o peso das animais nem o tamanho dos ovários. No entanto, reduziu o número de folículos antrais e aumentou os folículos atresícos. PPD (50 mg/Kg) gerou a redução significativa do GVBD e ausência de corpos polares nos oócitos após 12h. A formação do fuso e a agregação cromossômica foram afetadas, com fusos destruídos, e os oócitos tiveram menor chance de fertilização. A exposição alterou a distribuição dos GCs e da ovastacina, além de modificar a distribuição da proteína JUNO. As mitocôndrias ficaram agrupadas, com distribuição anormal e níveis reduzidos de ATP. Ocorreu o estresse oxidativo e a apoptose nos oócitos	PPD pode afetar diversos aspectos dos oócitos, incluindo o citoesqueleto e a dinâmica cortical, além de induzir estresse oxidativo, apoptose, disfunção mitocondrial e diminuição dos níveis de ATP
Arafa et al., 2020 ¹⁴¹ Emirados Árabes Unidos	Avaliação dos efeitos tóxicos da PPD e o potencial protetor de <i>Cocos nucifera</i>	Ratos albinos Wistar, (42F, divididas em 7 grupos de 6), peso variando de 180 e 230g	PPD foi administrada <i>in vivo</i> por 1 única dose intraperitoneal, nas concentrações de 40 e 60 mg/Kg, para análise de intoxicação. Nos grupos tratados com VCO e PPD, as doses utilizadas foram: PPD 40 mg/Kg com VCO 5 mL/Kg; PPD 40 mg/Kg com VCO 10 mL/Kg; PPD 60 mg/Kg com VCO 5 mL/Kg; e PPD 60 mg/Kg com VCO 10 mL/Kg	Análise bioquímica e histopatologia	PPD causou um aumento nos níveis de AST, ALT e bilirrubina de forma dose-dependente, enquanto o VCO reduziu as enzimas hepáticas. PPD também elevou os níveis séricos de CK e ureia em doses de 40 e 60 mg/Kg, mas o VCO, administrado em 5 ou 10 mL/Kg, conseguiu reduzir esses parâmetros de forma dose-dependente. A atividade de CK e a concentração de CK-MB aumentaram após lesão miocárdica, atingindo pico máximo entre 12 e 24 horas e retornando ao normal após 48 a 72h. A análise histopatológica mostrou que a PPD causou danos dose-dependentes na traqueia e lesões graves nas células alveolares, rins e hepatócitos. Ratos tratados apenas com PPD apresentaram danos celulares extensos, enquanto os grupos tratados com VCO (5 e 10 mL/Kg) exibiram células menos danificadas e morfologia normal. A PPD também aumentou o tamanho dos pulmões e do fígado de forma dose-dependente, além de elevar a taxa de mortalidade. O VCO mostrou-se eficaz em atenuar os danos histológicos e bioquímicos causados pela PPD.	VCO mostrou-se um tratamento eficaz para atenuar os danos causados pela PPD, promovendo a melhoria dos parâmetros bioquímicos e aumentando a taxa de sobrevivência dos animais

Legenda: PPD - Parafenilenodiamina. DMSO – Dimetilsulfóxido. ROS – espécies reativas de oxigênio. GVBD - degradação da vesícula germinativa. GCs - grânulos corticais. VCO - Óleo de Coco Virgem. FTIR - Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier. UV- ultravioleta. AST - aspartato aminotransferase. ALT – alanina aminotransferase. CK – creatinina. CK-MB - creatinofosfoquinase Fração MB.

Tabela A3. Resumo dos principais achados nos artigos selecionados para a revisão - Estudos *in vivo*, *in vitro* e ensaio clínico não randomizado (continuação).

Autores / Ano da publicação / País do estudo	Objetivo	População	Intervenção / Tratamento	Metodologia	Resultado	Conclusão
Oh et al., 2018 ¹⁷⁹ Correia do Sul	Investigação dos efeitos do extrato de <i>Ecklonia cava</i> na citotoxicidade e no estresse oxidativo induzidos por tinturas de cabelo contendo PPD	<i>Zebrafish</i> , HDFs e HaCaT	Tinturas de cabelo contendo 3,5% de PPD (1000 µg/mL, equivalente a 35 µg/mL de PPD) foram enriquecidas com diferentes concentrações de <i>E.cava</i> (5, 7, 9 e 11%). Para a viabilidade celular, HaCaT e HDFs (1×10 ⁴ células/poço) foram expostas a tintura de cabelo (250, 500 e 1.000µg/mL) e <i>E.cava</i> (5 e 7%). Para avaliar o estresse oxidativo, zebrafish foram expostos a tintura de cabelo (250 e 500 µg/mL) e <i>E.cava</i> (5 e 7%)	Teste de viabilidade celular, avaliação da mortalidade embrionária, frequência cardíaca, edema do saco vitelino e nível de ROS e NO	HDFs, o tratamento com 1000 µg/mL de tintura capilar reduziu a viabilidade celular em 0,29 vezes, enquanto em HaCaT, a citotoxicidade foi induzida com 500 µg/mL. <i>E.cava</i> conseguiu recuperar a viabilidade celular em ambos os casos, aumentando para 0,78 e 0,82 vezes, respectivamente. Em zebrafish, a tintura sem o extrato reduziu a sobrevivência em 30% no 1º dpf e em aproximadamente 50% no 7º. A mortalidade com 500µg/mL foi de 100% para concentrações de 0 e 5% de extrato e de 80% com 7% de extrato. A tintura aumentou a frequência cardíaca dos embriões, efeito não mitigado pelo extrato. A exposição à tintura também induziu anormalidades no edema do saco vitelínico. A concentração de 250µg/mL sem o extrato, no 3º dpf, aumentou significativamente a fluorescência de DCF, indicando geração de ROS e estresse oxidativo. Além disso, a tintura aumentou os níveis de NO, conforme determinado pelo aumento da fluorescência DAF-FM	<i>E.cava</i> pode ser usado como aditivo a tinturas de cabelo contendo PPD para reduzir a citotoxicidade e o estresse oxidativo induzidos por elas
Picardo et al., 1995 ¹¹⁷ Itália	Avaliação dos efeitos da PPD sobre o estresse oxidativo, analisando a LPO da membrana e os níveis intracelulares de antioxidantes em HaCaT	HaCaT (2×10 ⁶ células/poço) obtido do prepúcio neonatal	Na análise do padrão de ácidos graxos, foram utilizadas concentrações de 0-5 e 5 µg/mL de PPD, e no efeito sobre a atividade antioxidante, foram usadas concentrações de 0-5 e 2 µg/mL. Em ambos os casos, a PPD foi dissolvida em PBS e adicionada ao meio de cultura	Ensaio antioxidante da glutatona reduzida e oxidada, avaliação de SOD, CAT e GSH. Quantificação de ácidos graxos de membrana celular	A decomposição da PPD no meio é dose dependente. A avaliação na quantificação de ácidos graxos, evidenciou que a PPD (0-5 e 5 µg/mL) não tem efeitos tóxicos. PPD (10 µg/mL por 24h) causou uma leve diminuição da viabilidade celular. PPD reduziu a porcentagem de ácidos graxos poli-insaturados após 1, 5 e 12h. Após 24 horas, PPD (2 µg/mL) levou a um leve aumento, enquanto PPD (5 µg/mL) reduziu os níveis, evidenciando dano lipoperoxidativo. Na atividade antioxidante, a PPD apresentou efeitos dose dependentes em queratinócitos, especialmente nas atividades intracelulares de SOD, CAT e GSH. PPD (0,5 e 2 µg/mL) aumentaram as atividades de SOD e CAT após 1h de tratamento, sendo reduzido após 3 e 12 horas. Após esse período, observou-se uma redução significativa de GSH. Por fim, PPD (5-10 µg/mL) resultou em uma redução da atividade antioxidante, tanto enzimática quanto não enzimática, nos períodos de 1, 3, 12 e 24 h	Estresse oxidativo causado pela PPD gera radicais livres, reduzindo antioxidantes e promovendo lipoperoxidação, sobrecarregando sistema imunológico

Legenda: PPD – Parafenilenodiamina. HaCaT - queratinócitos humanos de linhagem imortalizadas. HDFs- fibroblastos dérmicos humanos. DMEM - Meio Essencial de Eagle Modificado de Dulbecco. MTT - brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio. Dpf - dias pós-fertilização. DCF - 2',7'-dicloro-dihidrofluoresceína. ROS – espécies reativas de oxigênio. NO – óxido nítrico . DAF-FM- 4,5-diaminofluoresceína diacetato. LPO - peroxidação lipídica. SOD - superóxido dismutase. CAT - catalase. GSH – glutatona.

Anexo 4. Ferramenta para análise de risco de viés ROBINS-I – perguntas de cada domínio.

Tabela A4. Perguntas do risco de viés ROBINS-I (continua)¹²⁵.

Domínio 1 Viés de Confundimento	1.1. Existe potencial para confusão do efeito da intervenção neste estudo? 1.2. A análise foi baseada na divisão do tempo de acompanhamento dos participantes de acordo com a intervenção recebida? 1.3. As descontinuações ou mudanças de intervenção provavelmente estão relacionadas a fatores que são prognósticos para o desfecho? 1.4. Os autores usaram um método de análise apropriado que controlou por todos os domínios importantes de confusão? 1.5. Se sim/provavelmente sim para 1.4: Os domínios de confusão controlados foram medidos de forma válida e confiável pelas variáveis disponíveis neste estudo? 1.6. Os autores controlaram para alguma variável pós-intervenção que pudesse ter sido afetada pela intervenção? 1.7. Os autores usaram um método de análise apropriado que ajustou todos os domínios importantes de confusão e para confusão que varia ao longo do tempo? 1.8. Se sim/provavelmente sim para 1.7: Os domínios de confusão ajustados foram medidos de forma válida e confiável pelas variáveis disponíveis neste estudo?
Domínio 2 Viés na seleção de participantes no estudo	2.1. A seleção de participantes no estudo (ou na análise) foi baseada em características dos participantes observadas após o início da intervenção? Se não/provavelmente não para 2.1: vá para 2.4. 2.2. Se sim/provavelmente sim para 2.1: As variáveis pós-intervenção que influenciaram a seleção provavelmente estavam associadas à intervenção? 2.3. Se sim/provavelmente sim para 2.2: As variáveis pós-intervenção que influenciaram a seleção provavelmente foram influenciadas pelo desfecho ou por uma causa do desfecho? 2.4. O início do acompanhamento e o início da intervenção coincidem para a maioria dos participantes? 2.5. Se sim/provavelmente sim para 2.2 e 2.3, ou não/provavelmente não para 2.4: Foram utilizadas técnicas de ajuste que provavelmente corrigem a presença de vieses de seleção?
Domínio 3 Viés na classificação das intervenções	3.1. Os grupos de intervenção foram claramente definidos? 3.2. As informações utilizadas para definir os grupos de intervenção foram registradas no início da intervenção? 3.3. A classificação do status da intervenção poderia ter sido afetada pelo conhecimento do desfecho ou pelo risco do desfecho?

Tabela A4. Perguntas do risco de viés ROBINS-I (continuação)¹²⁵.

Domínio 4 Viés devido a desvios das intervenções planejadas	4.1. Houve desvios da intervenção planejada além do que seria esperado na prática usual? 4.2. Se sim/provavelmente sim para 4.1: Esses desvios da intervenção planejada foram desequilibrados entre os grupos e provavelmente afetaram o desfecho? 4.3. Intervenções concomitantes importantes foram equilibradas entre os grupos de intervenção? 4.4. A intervenção foi implementada com sucesso para a maioria dos participantes? 4.5. Os participantes do estudo aderiram ao regime de intervenção atribuído? 4.6. Se não/provavelmente não para 4.3, 4.4 ou 4.5: Foi utilizada uma análise apropriada para estimar o efeito de iniciar e aderir à intervenção?
Domínio 5 Viés devido a dados ausentes	5.1. Os dados de desfecho estavam disponíveis para todos, ou quase todos, os participantes? 5.2. Participantes foram excluídos devido a dados ausentes sobre o status da intervenção? 5.3. Participantes foram excluídos devido a dados ausentes em outras variáveis necessárias para a análise? 5.4. Se provavelmente não/não para 5.1, ou sim/provavelmente sim para 5.2 ou 5.3: As proporções de participantes e os motivos para os dados ausentes são semelhantes entre as intervenções? 5.5. Se provavelmente não/não para 5.1, ou sim/provavelmente sim para 5.2 ou 5.3: Há evidências de que os resultados foram robustos à presença de dados ausentes?
Domínio 6 Viés da mensuração dos desfechos	6.1. A medida do desfecho poderia ter sido influenciada pelo conhecimento da intervenção recebida? 6.2. Os avaliadores dos desfechos estavam cientes da intervenção recebida pelos participantes do estudo? 6.3. Os métodos de avaliação dos desfechos foram comparáveis entre os grupos de intervenção? 6.4. Houve erros sistemáticos na mensuração do desfecho relacionados à intervenção recebida?
Domínio 7 Viés na seleção do resultado reportado	7.1. ... múltiplas medições de desfechos dentro do domínio do desfecho? 7.2. ... múltiplas análises da relação intervenção-desfecho? 7.3. ... diferentes subgrupos?

Anexo 5. Ferramenta para análise de risco de viés SYRCLE’S TOOL – perguntas de cada domínio.

Tabela A5. Perguntas do risco de viés SYRCLE’S TOOL (continua)¹²⁶.

Viés de seleção	QS1. A sequência de alocação foi gerada e aplicada adequadamente? A. Os investigadores descreveram um componente aleatório no processo de geração de sequência?
	QS2. Os grupos eram semelhantes na linha de base ou foram ajustados para fatores de confusão na análise? A. A distribuição das características relevantes da linha de base foi balanceada para os grupos de intervenção e controle? B. Se relevante, os pesquisadores ajustaram adequadamente para distribuição desigual de algumas características relevantes da linha de base na análise? C. O momento da indução da doença foi adequado?
	QS3. A alocação para os diferentes grupos foi adequadamente ocultada durante? A. O investigador que alocou os animais para grupo de intervenção ou controle não poderia prever a atribuição devido a um dos seguintes métodos ou métodos equivalentes?
Viés de desempenho	QS4. Os animais foram alojados aleatoriamente durante o experimento? A. Os autores colocaram aleatoriamente as gaiolas ou os animais dentro da sala/instalação dos animais?
	QS5. Os cuidadores e/ou investigadores foram cegados do conhecimento de qual intervenção cada animal recebeu durante o experimento? A. O cegamento dos cuidadores e investigadores foi garantido, e era improvável que o cegamento deles pudesse ter sido quebrado?
Viés de detecção	QS6. Os animais foram selecionados aleatoriamente para avaliação de resultados? A. Os pesquisadores escolheram aleatoriamente um animal durante avaliação de resultados ou usaram um componente aleatório na geração de sequência para avaliação de resultados?
	QS7. O avaliador de resultados foi cegado? A. O cegamento do avaliador de resultados foi garantido, e era improvável que o cegamento pudesse ter sido quebrado?
Atrito	QS8. Os dados de resultados incompletos foram abordados adequadamente? A. Todos os animais foram incluídos na análise? B. Os motivos para dados de resultados ausentes provavelmente não estavam relacionados ao resultado verdadeiro? (por exemplo, falha técnica) C. Os dados de resultados ausentes são equilibrados em números entre os grupos de intervenção, com motivos semelhantes para dados ausentes entre os grupos? D. Os dados de resultados ausentes são imputados usando métodos apropriados?

Legenda: QS – Questão de sinalização.

Tabela A5. Perguntas do risco de viés SYRCLE’S TOOL (continuação)¹²⁶.

Relato	QS9. Os relatórios do estudo estão livres de relatórios de resultados seletivos? A. O protocolo do estudo estava disponível e todos os resultados primários e secundários pré-especificados do estudo foram relatados no manuscrito atual? B. O protocolo do estudo não estava disponível, mas estava claro que o relatório publicado incluía todos os resultados esperados (ou seja, métodos de comparação e seção de resultados)?
Outros	QS10. O estudo estava aparentemente livre de outros problemas que poderiam resultar em alto risco de viés? A. O estudo estava livre de contaminação (agrupamento de medicamentos)? B. O estudo estava livre de influência inapropriada de financiadores? C. O estudo estava livre de erros de unidade de análise? D. Os riscos de viés específicos do projeto estavam ausentes? E. Novos animais foram adicionados aos grupos controle e experimental para substituir os desistentes da população original?

Legenda: QS – Questão de sinalização.

Anexo 6. Ferramenta para análise de risco de viés QUIN'S TOOL – perguntas de cada domínio.

Tabela A6. Perguntas do risco de viés QUIN'S TOOL¹²⁷.

Domínio 1 Objetivos claramente declarados	O estudo deve declarar claramente os objetivos, que devem ser seguidos ao longo do estudo.
Domínio 2 Explicação detalhada do cálculo do tamanho da amostra	Os detalhes sobre o método pelo qual o tamanho da amostra foi calculado devem ser claramente declarados. Detalhes sobre o programa de software, fórmula e parâmetros usados para o cálculo do tamanho da amostra também devem ser especificado
Domínio 3 Explicação detalhada da técnica de amostragem	Detalhes sobre a população predefinida da qual a amostra foi selecionada. A técnica de amostragem e os critérios de inclusão e exclusão devem ser claramente declarados.
Domínio 4 Detalhes do grupo de comparação	Os detalhes do grupo de comparação (controle positivo, controle negativo ou padrão) devem ser claramente especificados.
Domínio 5 Explicação detalhada da metodologia	Clareza do procedimento, método de padronização e detalhes de quaisquer normas universais usadas (se aplicável) devem ser claramente declarados.
Domínio 6 Detalhes do operador	O número de operadores e detalhes sobre o treinamento e a calibração dos operadores (confiabilidade inter e intra-operador) devem ser claramente especificados.
Domínio 7 Randomização	Detalhes sobre a geração da sequência e ocultação da alocação devem ser claramente declarados.
Domínio 8 Método de medição dos desfechos	A clareza do procedimento e a justificativa para a escolha do método devem ser declaradas. O método de padronização, juntamente com detalhes de quaisquer normas universais usadas (se aplicável), também deve ser claramente especificado.
Domínio 9 Detalhes do avaliador de desfechos	O número de avaliadores de desfechos e os detalhes sobre o treinamento e a calibração dos avaliadores (confiabilidade inter e intra-avaliador) devem ser claramente especificados.
Domínio 10 Cegamento	Os detalhes sobre o cegamento dos operadores, avaliadores de desfechos e estatísticos devem ser claramente especificados.
Domínio 11 Análise estatística	Os detalhes sobre o programa de software usado e a análise estatística devem ser claramente especificados.
Domínio 12 Apresentação dos resultados	O desfecho deve ser baseado nos objetivos predefinidos. Todos os dados devem ser adequadamente tabulados, com os dados de linha de base claramente especificados (se aplicável).