

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

Ana Cláudia de Andrade Pepato

**Testes *in vitro* como alternativa aos testes *in vivo* de Draize, para
avaliação de irritação/corrosão cutânea e ocular.**

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade
de São Paulo.

Orientadora:
Profa. Dra Silvy Maria-Engler

São Paulo
2022

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	2
RESUMO	3
1. INTRODUÇÃO	4
2. OBJETIVOS	6
2.1 OBJETIVO GERAL.....	6
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
3. MATERIAIS E MÉTODOS	7
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	8
4.1 ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	8
4.1.1 Irritação e Corrosão Cutânea	9
4.1.2. Irritação e Corrosão Ocular	10
4.2 CLASSIFICAÇÃO TOXICOLÓGICA SEGUNDO GHS.....	12
4.3 METODOLOGIA ALTERNATIVA: ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	14
4.3.1 Estudo de Irritação Cutânea	14
4.3.2 Estudo de Corrosão Cutânea	17
4.3.3 Permeabilidade e Opacidade da Córnea Bovina	19
4.3.4. Exposição de Curta Duração	22
4.3.5. RhCE	24
4.4 LIMITAÇÕES DOS MÉTODOS <i>IN VITRO</i>	27
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
6. BIBLIOGRAFIA	28

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, meu pai e minha irmã por acreditarem em mim e por valorizarem a educação acima de tudo.

Agradeço à minha avó Evangelina e à minha avó Ruth por todo o carinho recebido e apesar de não estarem mais presentes, suas histórias seguem em mim.

Agradeço aos meus amigos Andressa, Louise, Rafaela e Rafael por compartilharem todos os momentos da graduação comigo.

Agradeço ao meu companheiro Yago por estar sempre ao meu lado, me apoiando e ajudando.

Por último, agradeço à minha orientadora Silvy pelo auxílio e pela paciência.

RESUMO

PEPATO, Ana Cláudia de Andrade. **Testes *in vitro* como alternativa aos testes *in vivo* de Draize, para avaliação de irritação/corrosão cutânea e ocular.** 29 f. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Palavras-chave: Testes *in vivo* de Draize. Irritação e corrosão cutânea e ocular. Metodologias alternativas *in vitro*.

Os testes *in vivo* de Draize foram desenvolvidos em 1944 e ainda são utilizados por vários países com a finalidade de avaliar irritação e corrosão cutânea e ocular. Esses testes são considerados como de alto grau de crueldade com os animais, pela opinião pública, mesmo após modificações realizadas no protocolo original. As metodologias alternativas *in vitro* substituem os testes *in vivo* de Draize, evitando uso e posterior morte dos animais e trazendo a possibilidade de obtenção de resultados mais eficientes e relevantes, segundo conceitos da toxicologia moderna. Os protocolos discutidos são o guideline da OECD, referente ao estudo de irritação e corrosão cutânea, 404 de 2002; o guideline da OECD referente ao estudo de irritação e corrosão ocular, 405 de 2015; o guideline da OECD referente ao estudo de irritação cutânea, 439; o guideline referente ao estudo de corrosão cutânea, o 431; o guideline referente ao estudo de permeabilidade e opacidade da córnea bovina (BCOP); o 437; o guideline referente a exposição de curta duração, o 491; e por último, o guideline referente ao estudo RhCE, o 492. A demonstração da eficácia e segurança dos métodos *in vitro* são essenciais para que cada vez mais as agências reguladoras possam aceitar e validar esses estudos, sem a necessidade da realização de estudos *in vivo* para confirmação do resultado de irritação e corrosão ocular e cutânea.

1. INTRODUÇÃO

Os testes in vivo de Draize foram desenvolvidos em 1944 e ainda são utilizados por vários países com a finalidade de avaliar irritação e corrosão cutânea e ocular. Esses testes são considerados como de alto grau de crueldade com os animais, pela opinião pública, mesmo após modificações realizadas no protocolo original, seguindo o princípio dos 3Rs, como diminuição do número de animais, uso de anestésicos e diminuição da quantidade de produto ou substância a ser aplicada nos olhos dos animais. (CRUZ; BARBOSA, PINTO, 2004)

O desenvolvimento e a utilização de metodologias alternativas aos estudos realizados com animais de laboratório é meta de longa data dentro da comunidade científica. Data de 1876, na Grã-Bretanha, a primeira legislação criada especificamente para regulamentar a utilização de animais em experimentos. (Cazarin et al., 2004)

Porém, houve um marco importante em 1954, num projeto iniciado pela Federação das Universidades para o Bem Estar Animal (The Universities Federation for Animal Welfare – UFAW's), que resultou na publicação dos Princípios das Técnicas Experimentais Humanas (The principles of Humane Experimental Technique) em 1959, por Willian Russell e Rex Burch, considerados os iniciadores desta filosofia. (Cazarin et al., 2004)

O questionamento quanto ao uso de animais de laboratório, na avaliação de risco dos produtos de uso humano, resultou em vários estudos a partir da década de 60, direcionados a metodologias que utilizam tecidos e células vivas de mamíferos, organismos inferiores e substratos inertes. (CRUZ; BARBOSA, PINTO, 2004)

Bancos de dados informatizados e programas que avaliam a toxicidade pela determinação de relação estrutura-atividade, também foram desenvolvidos, por exemplo o Quantitation Structure Activity Relationship (QSAR), cujo protocolo relaciona a estrutura físico-química de um componente com sua toxicidade. Estes estudos têm por finalidade principal obter metodologias rápidas, acessíveis, de fácil execução e reprodutibilidade que possam ser padronizadas e validadas, situação imprescindível para que os métodos in vitro alcancem a aceitação científica internacional. (CRUZ; BARBOSA, PINTO, 2004)

Diversos países, tais como os Estados Unidos e membros da comunidade europeia (ex: Reino Unido, Alemanha e a maior parte dos países membros) já aprovaram a utilização de métodos alternativos no processo de registro de novas substâncias, assim como a substituição de alguns métodos clássicos por outros que se enquadrem na proposta dos 3Rs. (Cazarin et al., 2004)

Para que um novo método seja aceito, este deve passar por avaliação a fim de estabelecer sua relevância para implementação e sua confiabilidade (Stokes, 2002). Para que isso seja possível, faz-se necessária a harmonização dos processos de validação, por intermédio de Comitês Internacionais. (Cazarin et al., 2004)

Depois de finalizada a fase de validação, o método proposto passa por uma avaliação independente, ou seja, por instituições que não estiveram envolvidas durante todo o processo de pesquisa, de desenvolvimento e da validação do método, para emissão de um parecer. Quando este é favorável, o método proposto é publicado e enviado para os órgãos competentes para implementação regulatória. Ressalta-se que durante todo o processo (desenvolvimento, pré-validação, validação, revisão, aceitação regulatória e implementação) deve ser mantido envolvimento consistente e comunicação apropriada entre todos os interessados (pesquisadores, usuários, reguladores e público), a fim de facilitar a validação e a aceitação dos novos métodos propostos. Da mesma forma, a aceitação regulatória de um novo método deve ser amplamente divulgada aos cientistas e às diversas organizações nacionais e internacionais por intermédio de artigos publicados em jornais e revistas, realização de workshops e outros meios. A comunicação atualizada e correta dos acontecimentos é um passo de extrema importância para tornar válida as determinações adotadas e para facilitar a harmonização dos novos métodos desenvolvidos, sendo que esta também é impulsionada pela publicação de protocolos por organizações internacionais, tais como a OECD, sendo indispensável a interação entre as Agências de diferentes nacionalidades, sempre com o objetivo de encorajar o processo de harmonização internacional. (Cazarin et al., 2004)

Observa-se imenso avanço científico, tecnológico e ético quanto ao tema e inclusive intensa discussão em vista das futuras mudanças na condução da avaliação da toxicidade de determinada substância. Atualmente, já existe consenso de que os estudos com animais devem ser conduzidos somente quando: 1) o objetivo é de importância justificável; 2) não existem métodos alternativos válidos; 3)

todas as estratégias relevantes de redução e refinamento já foram identificadas e implementadas; 4) o desenho e a condução do estudo minimizem o prejuízo causado ao bem estar animal, não somente com relação ao número de animais utilizados, mas também em relação à dor e ao sofrimento causado e 5) exista benefício científico máximo. (Cazarin et al., 2004)

Com base neste conceito e na tendência de harmonização internacional, a validação e a implementação de métodos alternativos necessitam do envolvimento de diversas agências, assim como das áreas científica, econômica e política. (Cazarin et al., 2004)

Em relação aos métodos *in vitro* para observação de irritação/corrosão ocular e cutânea, serão analisados neste presente trabalho estudos de irritação cutânea, corrosão cutânea, irritação ocular e corrosão ocular, todos *in vitro*.

A escolha do tema do trabalho a ser apresentado baseia-se no fato de que as metodologias alternativas *in vitro* substituem os testes *in vivo* de Draize, evitando uso e posterior morte dos animais e trazendo a possibilidade de obtenção de resultados mais eficientes e relevantes, segundo conceitos da toxicologia moderna. (SANTOS et al., 2019)

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Apresentar, comparar e discutir metodologias alternativas ao uso de animais com os testes *in vivo* de Draize.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar a comparação com base nos protocolos de estudo de substâncias químicas da OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico); apontar vantagens e desvantagens dos métodos *in vivo* e *in vitro* de irritação/corrosão ocular e cutânea com base nos respectivos protocolos; explicar como os testes *in vivo* e *in vitro* são realizados.

Os protocolos a serem discutidos são o guideline da OECD referente ao estudo de irritação e corrosão cutânea, 404 de 2002; o guideline da OECD referente ao estudo de irritação e corrosão ocular, 405 de 2015; o guideline da OECD referente ao estudo de irritação cutânea, 439; o guideline referente ao estudo de corrosão cutânea, o 431; o guideline referente ao estudo de permeabilidade e opacidade da córnea bovina (BCOP); o 437; o guideline referente a exposição de curta duração, o 491; e por último, o guideline referente ao estudo RhCE, o 492.

Tem-se como objetivo através destes guidelines demonstrar a eficácia e segurança dos métodos alternativos, e sua capacidade de substituição de métodos que utilizam animais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada é a qualitativa. Não traduzida em números, pretende verificar a relação da realidade com o objetivo de estudo, obtendo várias interpretações de uma análise indutiva por parte do pesquisador. Inclui foco na interpretação, ênfase na subjetividade, preocupação com o contexto na formação da experiência. (DALFOVO; LANA; SILVEIRA, 2008)

A pesquisa está conceituada como descritiva, já que há descrição de um fenômeno através das características do objeto de estudo e deverá ter registro da maneira como ocorre esse fenômeno ocorre. (DE OLIVEIRA, 2011)

A coleta de dados é baseada na pesquisa bibliográfica. A pesquisa bibliográfica é desenvolvida a partir de material já elaborado, constituído, principalmente, de livros e artigos científicos e é importante para o levantamento de informações básicas sobre os aspectos direta e indiretamente ligados à temática. A principal vantagem da pesquisa bibliográfica reside no fato de fornecer ao investigador um instrumental analítico para qualquer outro tipo de pesquisa, mas também pode esgotar-se em si mesma. (DE OLIVEIRA, 2011)

A revisão bibliográfica é importante para definir a linha limítrofe da pesquisa que se deseja desenvolver, considerando uma perspectiva científica. Ainda segundo o autor, é preciso definir os tópicos chave, autores, palavras, periódicos e fontes de dados preliminares. Nesse sentido, a revisão bibliográfica é considerada um passo inicial para qualquer pesquisa científica. Desenvolvida com base em material já

elaborado como livros, artigos e teses, a pesquisa bibliográfica possui caráter exploratório, pois permite maior familiaridade com o problema, aprimoramento de ideias ou descoberta de intuições. (BOTELHO, 2011)

No caso específico de pesquisas avançadas, onde exige-se certo ineditismo e originalidade na contribuição, a revisão bibliográfica desempenha um papel preponderante. Por isso, conduzi-la de forma sistemática e rigorosa, contribui para o desenvolvimento de uma base sólida de conhecimento, facilitando o desenvolvimento da teoria em áreas onde já existem pesquisas, e também, identificando áreas onde há oportunidades para novas pesquisas. Um dos principais problemas de trabalhos que descrevem revisões da literatura sem o devido rigor, é a ênfase apenas na interpretação pessoal dos textos em linguagem narrativa, porém com pouca análise crítica. Por isso, o rigor e a relevância da revisão bibliográfica como embasamento de um trabalho de pesquisa não deve ser subestimado. (BOTELHO, 2011)

A pesquisa baseia-se principalmente nos protocolos OCDE 404/405, que são os estudos de irritação e corrosão ocular e cutânea de Draize (*in vivo*). Já os protocolos dos métodos alternativos *in vitro* escolhidos para o trabalho são: OCDE 431/439, estudos de irritação e corrosão cutânea *in vitro*; OCDE 437 (BCOP)- método da Permeabilidade e Opacidade da Córnea Bovina; OCDE (STE)- exposição de curta duração e OCDE 492 (RhCE), todos com a finalidade de observar irritação e/ou corrosão ocular.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTUDOS *IN VIVO*

Os estudos *in vivo* são realizados segundo as diretrizes da OECD. Essas diretrizes são na perspectiva de governo para empresas que operam em 33 países que aderem à OECD. A ideia central é que as empresas atuem em harmonia com as políticas dos países em que operam e com as expectativas da sociedade. Os guidelines são importantes nesse contexto pois os estudos são realizados seguindo o protocolo, trazendo previsibilidade ao procedimento e confiabilidade aos resultados. O guideline da OECD referente ao estudo de irritação e corrosão

cutânea é o 404 de 2002 e o guideline da OECD referente ao estudo de irritação e corrosão ocular é o 405 de 2015. (GORDON, 2001)

4.1.1 Irritação e Corrosão Cutânea

No teste de Draize de irritação e corrosão cutânea são utilizados coelhos albinos. Geralmente o teste é realizado primeiramente com um animal e se não houver efeito de corrosão, utiliza-se mais dois animais para verificar se a substância causa ou não irritação. Se for observado efeito irritante no teste inicial, o teste de confirmação pode ser realizado de forma sequencial ou com dois animais simultaneamente. A substância teste deve ser aplicada na pele do animal (pelos retirados 24 horas antes da realização do teste) e deve ser coberta com gaze semi-oclusiva. O período de exposição geralmente é de 4 horas e após esse período os resíduos de substância teste são removidos com água ou outro solvente apropriado. A observação de sinais clínicos possui duração de 14 dias. Se houver reversão dos sinais antes deste período, o teste pode ser encerrado. (OECD 404, 2015)

São avaliadas pontuações para eritema/escara e formação de edema. Essas avaliações devem ser realizadas juntamente com a natureza e gravidade das lesões e tempo de reversibilidade ou a falta de reversibilidade. Nesse sentido, as avaliações de cada animal devem ser valores de referência combinados com outras observações do estudo. A avaliação de sinais clínicos também inclui alopecia, hiperplasia, descamação e hiperqueratose. (OECD 404, 2015)

Na tabela abaixo é possível observar que as pontuações são 0, 1, 2, 3 e 4. Sendo 0 a não observação de sinais clínicos (eritema/edema); 1 para sinais muito leves; 2 para sinais bem definidos; 3 para sinais moderados e 4 para sinais severos. (OECD 404, 2015)

Tabela 1. Formação de Eritema, Escara e Edema

Formação de Eritema e Escara	
Sem eritema	0
Eritema muito leve (pouco perceptível)	1
Eritema bem definido	2
Eritema moderado à severo	3
Eritema severo (vermelhidão do tecido) até formação de escara impedindo graduação do eritema	4

Pontuação máxima possível: 4	
Formação de edema	
Sem edema	0
Edema muito leve (pouco perceptível)	1
Edema leve (bordas da área bem definidas)	2
Edema moderado (aumentado aproximadamente 1 mm)	3
Edema severo (aumentado mais de 1 mm e estendido para além da área de exposição)	4
Pontuação máxima possível: 4	

Fonte: OECD 404, 2015

4.1.2 Irritação e Corrosão Ocular

No teste de Draize de irritação e corrosão ocular, são utilizados coelhos albinos. O item teste deve ser aplicado no saco conjuntival de um olho de cada animal. Após 24 horas da aplicação, deve-se lavar o olho onde ocorreu a aplicação. (OECD 405, 2002)

Geralmente o teste é realizado primeiramente com um animal e se não houver efeito de corrosão, utiliza-se mais dois animais para verificar se a substância causa ou não irritação. Se for observado efeito irritante no teste inicial, o teste de confirmação pode ser realizado de forma sequencial ou com dois animais simultaneamente. A observação de sinais clínicos geralmente é de 21 dias, porém o teste pode ser encerrado antes desse período se houver reversibilidade dos sinais clínicos. (OECD 405, 2002)

São avaliadas pontuações para os sinais clínicos na córnea, íris, conjuntiva e quemose (referente à pálpebra), como demonstrado na tabela abaixo. As pontuações são 0, 1, 2, 3 ou 4. (OECD 405, 2002)

Para córnea, 0 é normal (sem opacidade ou ulceração); 1 é para casos de opacidade da córnea difusa e detalhes da íris claramente visíveis; 2 é para casos de área translúcida claramente visível e detalhes da íris ligeiramente obscurecidos; 3 é para casos onde a área está perolada, nenhum detalhe da íris visível e tamanho da pupila quase imperceptível; 4 é para casos severos (pontuação máxima), córnea opaca e íris não discernível. (OECD 405, 2002)

Para íris 0 é normal; 1 é para dobras acentuadamente profundas, congestão, edema, hiperemia, circuncorneana (úlceras) moderada, íris reativa à luz; 2 para casos

severos (pontuação máxima) hemorragia, destruição total do tecido, nenhuma reação à luz. (OECD 405, 2002)

Para a conjuntiva 0 é normal; 1 é para alguns vasos sanguíneos hiperêmicos; 2 é para conjuntiva difusa de cor carmesim e vasos não facilmente discerníveis; 3 para casos severos (pontuação máxima) de vermelhidão difusa. (OECD 405, 2002)

Por último, para quemose ou edema, 0 é normal; 1 inchaço pouco acima do normal; 2 é para inchaço bem visível com eversão parcial das pálpebras; 3 é para inchaço com as pálpebras meio fechadas e 4 é para casos severos (pontuação máxima) inchaço com as pálpebras quase fechadas. (OECD 405, 2002)

Tabela 2. Efeitos na córnea, íris, conjuntiva e edema

Córnea	Pontuação
Opacidade: grau de densidade (leituras deve ser realizadas nas áreas mais densas)*	
Sem ulceração ou opacidade	0
Opacidade da córnea difusa (além do leve embotamento do brilho normal); Detalhes da íris claramente visíveis	1
Área translúcida claramente visível; detalhes da íris ligeiramente obscurecidos	2
Área perolada, nenhum detalhe da íris visível e tamanho da pupila quase imperceptível;	3
Córnea opaca e íris não discernível através da opacidade	4
Pontuação máxima possível: 4	
* A área de opacidade da córnea deve ser observada	
Íris	Pontuação
Normal	0
Dobras acentuadamente profundas, congestão, edema, hiperemia, circuncorneana (úlceras) moderada, íris reativa à luz	1
Hemorragia, destruição total do tecido ou não reação à luz	2
Pontuação máxima possível: 2	
Conjuntiva	Pontuação
Vermelhidão (refere-se à conjuntiva, excluindo córnea e íris)	
Normal	0
Alguns vasos sanguíneos hiperêmicos (injetados)	1

Conjuntiva	Pontuação
Conjuntiva difusa de cor carmesim e vasos não facilmente discerníveis	2
Vermelhidão difusa	3
Pontuação máxima possível: 3	
Edema	Pontuação
Inchaço (refere-se à pálpebras e/ou membranas nictitantes)	
Normal	0
Inchaço pouco acima do normal	1
Inchaço bem visível com eversão parcial das pálpebras	2
Inchaço com as pálpebras meio fechadas	3
Inchaço com as pálpebras quase fechadas	4
Pontuação máxima possível: 4	

Fonte: OECD 405, 2002

Ambos os testes *in vivo* citados acima são eficazes comprovadamente. Contudo, causam muito sofrimento aos animais que são utilizados no teste e muitos laboratórios aplicam anestesia ou analgesia apenas nas primeiras horas de observação e se o animal não apresenta irritação ou corrosão, a analgesia é retirada. Um fato importante é que sinais clínicos não observados não significam necessariamente que o animal está sem dor ou sofrimento.

Por esses motivos, os testes *in vitro* demonstram ser tão importantes.

4.2 CLASSIFICAÇÃO TOXICOLÓGICA SEGUNDO GHS

A resolução da diretoria colegiada, RDC N° 294, DE 29 DE JULHO DE 2019, dispõe sobre os critérios para avaliação e classificação toxicológica, priorização da análise e comparação da ação toxicológica de agrotóxicos, componentes, afins e preservativos de madeira, e dá outras providências. Considerada um marco regulatório, já que no Art.37 são adotados critérios baseados no Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS).

Na seção 7 é descrito que em relação à irritação e corrosão cutânea, os produtos devem ser classificados na categoria 1, 2 ou 3. Produtos que se encaixam na categoria 1 são aqueles que possuem o potencial de provocar corrosão cutânea. Essa classificação é baseada em destruição do tecido cutâneo, originando uma

necrose visível em toda a epiderme e atingindo a derme, em pelo menos 1 animal submetido a ensaio após exposição por até 4 horas. (RDC 294, 2019)

Produtos que se encaixam na categoria 2 são aqueles que possuem potencial de provocar irritação cutânea. Essa classificação é baseada em pelo menos 2 de 3 animais testados, com pontuação média para eritema/escara ou para edema $\geq 2,3$ e ≤ 4 determinada na leitura das reações cutâneas observadas em 24, 48 e 72 horas após a remoção dos emplastos ou, no caso de reações tardias, leitura por 3 dias consecutivos após o início das reações cutâneas; ou pelo menos 2 animais testados, com inflamação persistente durante o período de observação de normalmente 14 dias, considerando a alopecia (área limitada), a hiperqueratose, a hiperplasia e a descamação; ou casos onde há uma variabilidade pronunciada de respostas entre os animais, com efeitos positivos bem definidos em um único animal relacionados à exposição do produto, mas que não atingem os critérios acima definidos para esta categoria. (RDC 294, 2019)

Produtos que se encaixam na categoria 3 são aqueles que possuem potencial de provocar leve irritação cutânea. Essa classificação é baseada em pelo menos 2 de 3 animais testados, com pontuação média para eritema/escara ou para edema $\geq 1,5$ e $< 2,3$ determinada na leitura das reações cutâneas observadas em 24, 48 e 72 horas após a remoção dos emplastos ou, no caso de reações tardias, leitura por 3 dias consecutivos após o início das reações cutâneas. (RDC 294, 2019)

Os produtos que não se enquadram em nenhuma das categorias são “não classificados” em relação à irritação e corrosão cutânea. (RDC 294, 2019)

Na seção 8 é descrito que em relação à irritação ou corrosão ocular, os produtos podem ser classificados na categoria 1 ou 2. (RDC 294, 2019)

Produtos que se encaixam na categoria 1 são aqueles que possuem potencial de provocar sérios danos nos olhos/efeitos irreversíveis nos olhos. Essa classificação é baseada em pelo menos 1 dos animais testados com efeitos na córnea, íris ou conjuntiva que não foram revertidos ou que se espera que não haveria reversão total dentro de um período de observação de 21 dias; ou pelo menos 2 de 3 animais testados, com pontuação média para opacidade na córnea ≥ 3 ou para irite $> 1,5$, determinada na leitura das lesões oculares observadas em 24, 48 e 72 horas após a instilação do produto. (RDC 294, 2019)

Os produtos que se encaixam na categoria 2 são aqueles que possuem potencial de induzir irritação nos olhos e efeitos reversíveis nos olhos. Essa

classificação é baseada em pelo menos 2 de 3 animais testados, com pontuação média para opacidade na córnea ≥ 1 , ou para irite ≥ 1 , ou para vermelhidão na conjuntiva ≥ 2 , ou para edema (quemose) na conjuntiva ≥ 2 , determinada na leitura das lesões oculares observadas em 24, 48 e 72 horas após a instilação do produto e com reversão total destas lesões oculares dentro de um período de observação de 21 dias. (RDC 294, 2019)

Os produtos que não se enquadram em nenhuma das categorias são “não classificados” em relação à irritação e corrosão ocular. (RDC 294, 2019)

4.3 METODOLOGIA ALTERNATIVA: ESTUDOS *IN VITRO*

O guideline da OECD referente ao estudo de irritação cutânea é o 439 e o guideline referente ao estudo de corrosão cutânea é o 431. O guideline referente ao estudo de permeabilidade e opacidade da córnea bovina (BCOP) é o 437. O guideline referente a exposição de curta duração é o 491. O guideline referente ao estudo RhCE é o 492.

4.3.1 Estudo de Irritação Cutânea

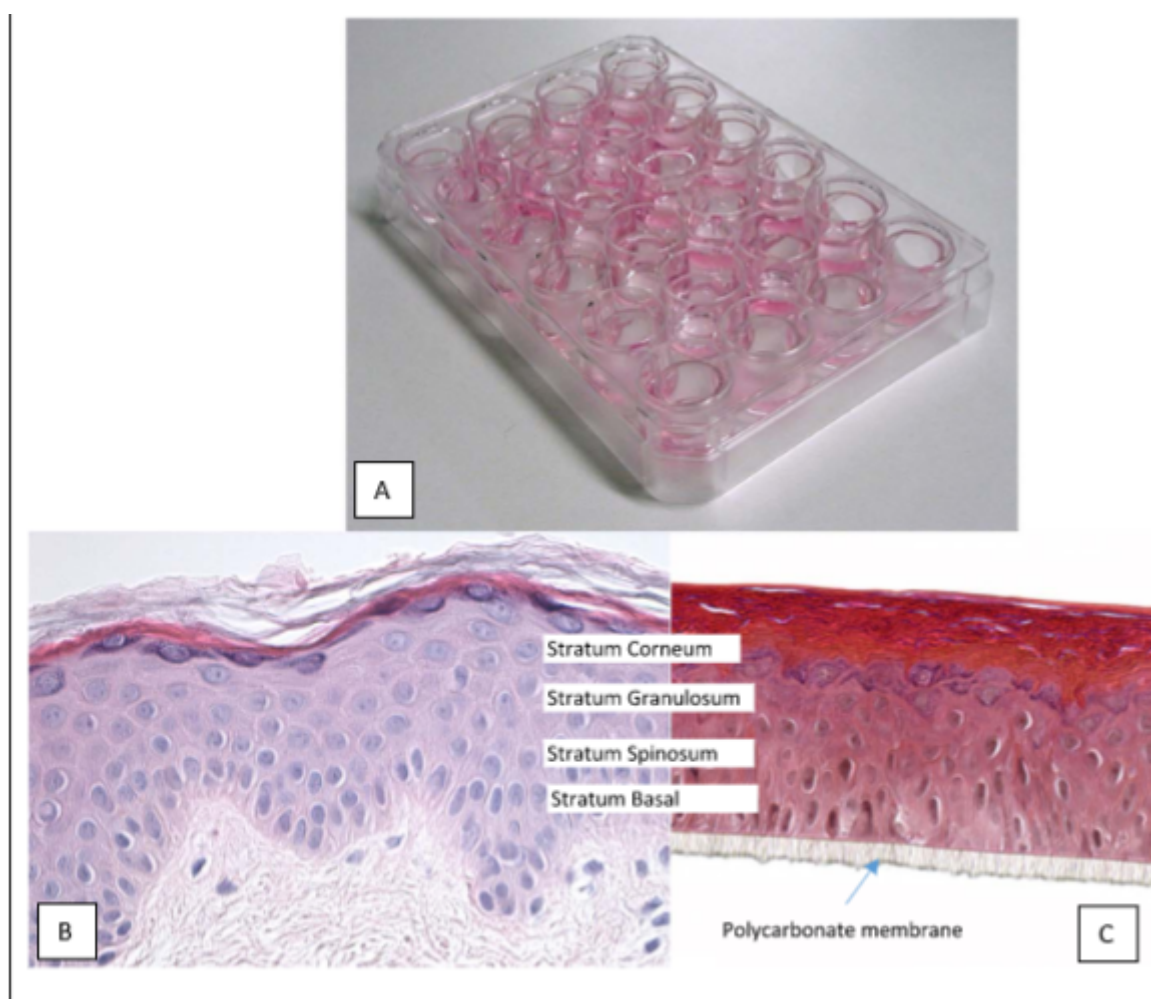
O teste de irritação cutânea consiste na aplicação da substância teste topicamente a um modelo tridimensional de RhE, composto por queratinócitos epidérmicos não transformados (de origem humana), que foram cultivados para formar um modelo de multicamadas e altamente diferenciado. (MINI, 2020)

Os modelos de pele humana 3D *in vitro* mais comumente utilizados são EpiDerm®, EpiSkin® e SkinEthic®. Todos os 3 são modelos de epiderme humana reconstituída (RHE), compostos de essencialmente, queratinócitos, melanócitos e células imunes, incluindo as estratificações dos queratinócitos. São eles: estrato basal (germinativo) que é a interface entre a derme e a epiderme, composta de células cubóides, onde são encontrados os queratinócitos e melanócitos; estrato espinhoso, que é considerado o local de transição, onde as células começam a migrar para o ápice da epiderme. É composto por células poliédricas com filamentos que se estendem para as células vizinhas; estrato granuloso, apresenta células em formato de diamantes e as células contêm grânulos de queratohialina; estrato córneo, é composto por células que perderam o núcleo e formaram escamas compostas por filamentos de queratina. (MINI, 2020)

Na figura abaixo, é possível observar as camadas citadas neste parágrafo.

Todos os modelos são metabolicamente e mitoticamente ativos, têm um perfil lipídico e ceramida muito semelhante à epiderme humana e expressam marcadores de diferenciação epidérmica normal, como queratina, profilagrina e involucrina. São todos cultivados em sistema de meio sem soro e são altamente reprodutíveis lote a lote. (DANILENKO, et al.,2016.)

Figura 1- SkinEthic™ RHE model



Fonte: PELLEVOISIN et al., 2018

Na figura acima em (A) está uma representação do modelo SkinEthic™ RHE , em (B) representação de RHE e em (C) a representação das camadas da pele humana.

O ensaio utilizado para quantificar a viabilidade é o ensaio MTT. As células do tecido RhE podem reduzir o corante MTT em um precipitado de formazan que é então extraído do tecido usando isopropanol (ou um solvente similar). A densidade óptica (OD) do solvente de extração sozinho deve ser suficientemente pequena, ou

seja, $DO < 0,1$. O MTT extraído pode ser quantificado usando uma medição de absorbância padrão (OD) ou um procedimento de espectrofotometria HPLC. (OECD 439, 2019)

Todos os modelos devem garantir que cada lote do RhE usado atenda aos critérios definidos para o controle negativo. Uma faixa de aceitabilidade (limite superior e inferior) para os valores de OD de controle negativo é estabelecida pelo desenvolvedor/fornecedor do modelo RhE. (OECD 439, 2019)

Deve ser documentado que os tecidos tratados com o controle negativo são estáveis em cultura (medições similares de viabilidade) durante o período de exposição do ensaio. (OECD 439, 2019)

Em relação aos critérios de aceitabilidade do teste, para cada método de teste usando lotes de modelo RhE válidos, tecidos tratados com o controle negativo devem apresentar DO refletindo a qualidade dos tecidos da remessa, das etapas de recebimento e todos os processos de protocolo. Os valores de OD de controle não devem estar abaixo dos limites historicamente estabelecidos. Da mesma forma, os tecidos tratados com controle positivo, como por exemplo SDS aquoso a 5%, deve refletir sua capacidade de responder a um produto químico irritante sob as condições do método de ensaio. O desvio padrão (SD) também deve estar dentro dos limites de aceitação estabelecidos para o método de teste usado. (OECD 439, 2019)

Os valores de DO obtidos podem ser usados para calcular a porcentagem de viabilidade normalizada para o controle negativo, que é ajustada para 100%. Caso a espectrofotometria HPLC for utilizada, a porcentagem de viabilidade do tecido é calculada como a porcentagem de área do pico de MTT formazan obtida com tecidos vivos expostos ao produto químico em estudo em relação ao pico MTT formazan obtido com o controle negativo simultâneo. (OECD 439, 2019)

Em relação à classificação e predição de resultados, a substância em estudo é identificada como exigindo classificação e rotulagem de acordo com GHS (Categoria 2 ou Categoria 1) se a média da viabilidade do tecido após a exposição e a incubação pós-tratamento é menor do que ou igual (\leq) a 50%. Caso a substância em estudo não seja corrosiva e demonstre viabilidade do tecido após exposição e incubação pós-tratamento menor ou igual (\leq) a 50%, é considerada irritante para a pele de acordo com GHS (Categoria 2). (OECD 439, 2019)

Dependendo da estrutura regulatória nos países membros (por exemplo, no caso de não adoção da categoria 3 do GHS da ONU facultativa), o produto químico em estudo pode ser considerado como não irritante para a pele de acordo com GHS (Não Classificado) se a viabilidade do tecido após exposição e incubação pós-tratamento for superior a (>) 50%. (OECD 439, 2019)

As vantagens do teste são: é realizado de forma mais rápida, fácil e reproduzível. Além disso, a avaliação histológica de seções de RHE, incluindo quantificação por meio de análise de imagem, é feita prontamente. O uso de análise e quantificação de imagens automatizadas permite uma triagem ainda mais rápida e de alto rendimento. (DANILENKO, et al.,2016.)

4.3.2 Estudo de Corrosão Cutânea

O estudo de corrosão cutânea possui procedimento, critérios de aceitabilidade do teste e vantagens semelhantes ao estudo de irritação cutânea. As diferenças principais são em relação a predição e análise dos resultados.

Os valores de DO obtidos para cada produto químico em estudo devem ser usados para calcular o percentual de viabilidade em relação ao controle negativo, que é fixado em 100%. Em caso do uso da espectrofotometria HPLC, a porcentagem de viabilidade do tecido é calculada como porcentagem de área do pico de formazan MTT obtida com tecidos vivos expostos ao produto químico em estudo em relação ao pico MTT formazan obtido com o controle negativo simultâneo. Os valores de viabilidade da célula percentual de corte que distinguem o teste corrosivo do não corrosivo (ou discriminando entre diferentes subcategorias corrosivas) são definidos abaixo. (OECD 431, 2013)

Uma única execução de teste composta por pelo menos duas réplicas de tecido deve ser suficiente para um produto químico em estudo quando a classificação resultante for inequívoca. No entanto, em casos de resultados limítrofes, como medições replicadas não concordantes, uma segunda execução pode ser considerada, bem como uma terceira em caso de resultados discordantes entre as duas primeiras corridas. (OECD 431, 2013)

O modelo de previsão para o método de teste de corrosão da pele EpiSkin™ associado ao sistema de classificação GHS é mostrado na tabela 3.

Tabela 3- Previsão para o método EpiSkin™ associado ao GHS

Medição da viabilidade após certos intervalos de tempo de exposição (t=3, 60 e 240 minutos)	Predição
< 35% após 3 min de exposição	Corrosiva: Subcategoria 1 A (opcional)
≥ 35% após 3 min de exposição E < 35% após 60 min de exposição OU ≥ 35% após 60 min de exposição E < 35% após 240 min de exposição	Corrosiva: Combinação das subcategorias 1B-e-1C (opcionais)
≥ 35% após 240 min de exposição	Não corrosiva

Fonte: OECD 431, 2013

A predição para os modelos EpiDerm™ SCT, the SkinEthic™ RHE, epiCS® e LabCyte EPI-MODEL 24, associada à classificação GHS é mostrado na tabela 4, abaixo. Portanto, cada modelo possui uma predição específica, de acordo com o tempo de exposição e a viabilidade celular.

Tabela 4. A predição para os modelos EpiDerm™ SCT, the SkinEthic™ RHE, epiCS® e LabCyte EPI-MODEL 24, associada ao GHS

Medição da viabilidade após certos intervalos de tempo de exposição (t=3 e 60 minutos)	Predição
Passo 1 para EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE, epiCS® and LabCyte EPI-MODEL24 SCT	
< 50% após 3 min de exposição	Corrosiva
≥ 50% após 3 min de exposição E < 15% após 60 min de exposição	Corrosiva
≥ 50% após 3 min de exposição E ≥ 15% após 60 min de exposição	Não corrosiva
Passo 2 para EpiDerm™ SCT - para substâncias/misturas identificadas como Corrosivas no passo 1	
< 25% após 3 min de exposição	Subcategoria 1A (opcional)
≥ 25% após 3 min de exposição	Combinação das Subcategorias 1B-e-1C (opcionais)
Passo 2 for SkinEthic™ RHE - para substâncias/misturas identificadas como Corrosivas no passo 1	
< 18% após 3 min de exposição	Subcategoria 1A (opcional)
≥ 18% após 3 min de exposição	Combinação das Subcategorias 1B-e-1C (opcionais)
Passo 2 for epiCS® - para substâncias/misturas identificadas como Corrosivas no passo 1	
< 15% após 3 min de exposição	Subcategoria 1A (opcional)
≥ 15% após 3 min de exposição	Combinação das Subcategorias 1B-e-1C (opcionais)

Medição da viabilidade após certos intervalos de tempo de exposição (t=3 e 60 minutos)	Predição
Passo 2 para LabCyte EPI-MODEL24 SCT - para substâncias/misturas identificadas como Corrosivas no passo 1	
< 15% após 3 min de exposição	Subcategoria 1A (opcional)
≥ 15% após 3 min de exposição	Combinação das Subcategorias 1B-e-1C (opcionais)

Fonte: OECD 431, 2013

4.3.3 Permeabilidade e Opacidade da Córnea Bovina

O teste de permeabilidade e opacidade da córnea bovina (BCOP) é um modelo organotípico que fornece manutenção a curto prazo da normalidade da função fisiológica e bioquímica da córnea bovina *in vitro*. Neste método de teste, os danos causados pela substância teste são avaliados por medições quantitativas de alterações na opacidade e permeabilidade da córnea com um opacímetro e um espectrofotômetro de luz visível, respectivamente. Ambas as medidas são usadas para calcular IVIS/LIS, que é usado para atribuir uma categoria de classificação de perigo de irritação *in vitro* para previsão do potencial de irritação ocular *in vivo* de um item em estudo. (OECD 437, 2020)

O método de teste BCOP utiliza córneas isoladas dos olhos de bovinos recém-abatidos. A opacidade da córnea é medida quantitativamente como a transmissão de luz através da córnea. A permeabilidade é medida como a quantidade de corante de fluoresceína de sódio que passa por toda a espessura da córnea. (OECD 437, 2020)

A opacidade da córnea é medida quantitativamente com o auxílio de um opacímetro, resultando em valores de opacidade medidos em uma escala contínua. O opacímetro OP-KIT é o dispositivo padrão que foi utilizado na validação do método de teste BCOP. Outros aparelhos avaliados podem ser utilizados como Duratec, LLBO (Opacímetro à base de luz a laser). A quantidade de fluoresceína sódica é medida quantitativamente com o auxílio de espectrofotometria UV/VIS. Medições espectrofotométricas avaliados a 490 nm são registrados como densidade óptica (OD490) ou valores de absorbância, que são medidos em uma escala contínua. (OECD 437, 2020)

Os valores de permeabilidade à fluoresceína são determinados usando valores de OD490 com base em um espectrofotômetro de luz visível usando um comprimento de caminho padrão de 1 cm. (OECD 437, 2020)

Uma vez que os valores de opacidade e permeabilidade média (OD490) tenham sido corrigidos para o fundo opacidade e os valores de permeabilidade de controle negativo de OD490, os valores OD490 de opacidade média e permeabilidade para cada grupo de tratamento devem ser combinados em uma fórmula derivada empiricamente para calcular o valor *in vitro* de irritação (IVIS). A opacidade média é medida com OP-KIT e os valores médios de permeabilidade para cada grupo de tratamento são combinados em uma única pontuação *in vitro*. (OECD 437, 2020)

O IVIS = valor médio de opacidade (leitura do OP-KIT) + (15 x valor médio de permeabilidade). (OECD 437, 2020)

Para LLBO a unidade de medida é lux. A opacidade é medida com LLBO e os valores médios de permeabilidade para cada grupo de tratamento são combinados em uma pontuação única *in vitro*. O LIS = leitura do valor médio de opacidade do LLBO em lux/7) + (15 x valor médio de permeabilidade). (OECD 437, 2020)

Em relação à aceitabilidade do teste, o mesmo é considerado aceitável se o controle positivo fornecer um valor dentro de dois padrões de desvios da média histórica do IVIS para o dispositivo OP-KIT. Ao usar o dispositivo LLBO, um teste é considerado aceitável se o controle positivo der um valor dentro de dois desvios padrão da média histórica da opacidade (definida por lux/7). O controle positivo deve ser atualizado pelo menos a cada três meses, ou cada vez que um teste aceitável é realizado em laboratórios onde os testes são feitos com baixa frequência (ou seja, menos de uma vez por mês). (OECD 437, 2020)

As respostas de controle negativo ou solvente/veículo devem resultar em opacidade e valores de permeabilidade inferiores aos limites superiores estabelecidos para opacidade e permeabilidade de valores para córneas bovinas tratadas com o respectivo controle negativo ou solvente/veículo. (OECD 437, 2020)

Uma única execução de teste composto por pelo menos três córneas deve ser suficiente para um produto químico em estudo quando a previsão resultante for inequívoca. No entanto, em casos de resultados limítrofes na primeira execução de teste, uma segunda execução deve ser considerada (mas não necessariamente obrigatória), bem como uma terceira execução em caso de previsões discordantes

entre as duas primeiras execuções de teste. Neste contexto, um resultado no primeiro teste é considerado limítrofe se as previsões das 3 córneas não foram concordantes, de modo que: 2 das 3 córneas deram previsões discordantes da média de todas as 3 córneas; ou 1 das 3 córneas deu uma previsão discordante da média de todas as 3 córneas, e resultado discordante para: OP-KIT >10 unidades IVIS do limite de corte de 55; LLBO: Cat. 1 GHS, previsão com base na opacidade (Lux/7, opacidade média > 145), mas 1 de 3 córneas com opacidade (Lux/7) < 130(12); LLBO: Cat. 1 GHS, previsão baseada em OD (OD média > 2,5), mas 1 de 3 córneas com DO < 2,0 (12) e LLBO: Não Classificado segundo GHS, previsão baseada em LIS (média LIS ≤ 30), mas 1 em cada 3 córneas com LIS > 40 (12). (OECD 437, 2020)

Se a execução de testes repetidos corroborar a previsão da execução de testes iniciais, uma decisão final pode ser tomada sem mais testes. Se a repetição do teste resultar em uma previsão não concordante do teste inicial executado, então um terceiro e último teste deve ser realizado para resolver previsões discordantes e classificar a substância teste. Pode ser permitido dispensar testes adicionais para classificação e rotulagem no caso que qualquer execução de teste não resulte em uma previsão de Categoria 1, segundo o GHS. Os valores de permeabilidade e opacidade devem ser avaliados independentemente corrosividade ou irritação grave induzida pela substância através de apenas um dos dois parâmetros. (OECD 437, 2020)

Em relação aos critérios de classificação, conforme a tabela abaixo, os valores de IVIS ≤ 3 e LIS ≤ 30, a substância não é classificada segundo o GHS; os valores 3 < IVIS ≤ 55 e LIS > 30 and lux/7 ≤ 145 and OD490 ≤ 2.5 não são suficientes para classificar a substância em uma categoria; IVIS > 55, LIS > 30 and lux/7 ≤ 145 and OD490 > 2.5 ou LIS > 30 and lux/7 > 145 categorizam a substância como categoria 1, segundo GHS. (OECD 437, 2020)

Tabela 5. Predição para categorização do teste BCOP

Opacímetro 1	Opacímetro 2	
OP-KIT e Duratec	LLBO	GHS
IVIS ≤ 3	LIS ≤ 30	Não classificado
3 < IVIS ≤ 55	LIS > 30 e lux/7 ≤ 145 e OD490 ≤ 2.5	Nenhuma predição pode ser feita

Opacímetro 1	Opacímetro 2	
OP-KIT e Duratec	LLBO	GHS
IVIS > 55	LIS > 30 e lux/7 ≤ 145 e OD490 ≤ 2.5 ou LIS > 30 e lux/7 > 145	Categoria 1

Fonte: OECD 437, 2020

Algumas vantagens do teste BCOP em relação a outros testes são: redução do tempo de teste e baixo custo; avaliação histológica da córnea, ou seja, é possível realizar análise dos tecidos e quantificação do teste por meio dos resultados de IVIS/LIS. (CAZEDEY, 2009)

4.2.4 Exposição de Curta Duração

O teste de exposição de curta duração (STE) é um teste de irritação ocular *in vitro* fácil que avalia a citotoxicidade em células SIRC (linha de células da córnea de coelho) após um tratamento de dose de 5 minutos. (TAKAHASHI, 2011)

Após cinco minutos de exposição a 5% e 0,05% de concentração de uma substância em estudo, a citotoxicidade é medida quantitativamente como a viabilidade de células SIRC usando o ensaio MTT (colorimétrico). A diminuição da viabilidade celular é usada para prever potenciais efeitos adversos que levam a danos oculares. (OECD 491, 2020)

O valor de densidade óptica é utilizado para o cálculo da viabilidade celular em relação ao controle negativo (concentração de 100% do item teste). A viabilidade celular relativa é expressa em porcentagem e obtida dividindo-se a densidade óptica da substância em estudo pela densidade óptica do controle, após subtrair a OD de ambos os valores. (OECD 491, 2020)

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{(OD_{570} \text{ of test chemical}) - (OD_{570} \text{ of blank})}{(OD_{570} \text{ of solvent control}) - (OD_{570} \text{ of blank})} \times 100$$

Em relação à aceitabilidade, os resultados dos testes são considerados aceitáveis quando todos os critérios a seguir são satisfeitos: a densidade óptica do controle do meio (exposto ao meio de cultura) deve ser 0,3 ou superior após a subtração da densidade óptica em branco; a viabilidade do controle do solvente deve ser de 80% ou mais em relação ao controle médio. Se vários controles de

solvente forem usados em cada repetição, cada um desses controles deve mostrar viabilidade celular superior a 80% para qualificar o teste dos produtos químicos testados com esses solventes. (OECD 491, 2020)

A viabilidade celular obtida com o controle positivo deve estar dentro de dois desvios padrão da média histórica. Os limites superior e inferior de aceitação para o controle positivo devem ser atualizados com frequência, ou seja, a cada três meses, ou cada vez que um teste aceitável é realizado em laboratórios onde os testes são realizados com pouca frequência (ou seja, menos de uma vez por mês). (OECD 491, 2020)

Quando o laboratório não completa um número suficiente de experimentos para estabelecer uma distribuição de controle positivo estatisticamente robusta, é aceitável que os limites superiores e inferiores estabelecidos pelo desenvolvedor do método sejam utilizados, enquanto uma distribuição interna é construída durante os primeiros testes realizados pelo laboratório. (OECD 491, 2020)

Se algum dos critérios acima não for atendido, uma repetição adicional deve ser realizada. (OECD 491, 2020)

Além disso, o desvio padrão da viabilidade celular final derivada de três repetições deve ser inferior a 15% para ambas as concentrações de 5% e 0,05% da substância teste. Se o desvio padrão for maior ou igual a 15%, os resultados não devem ser usados e mais três repetições devem ser realizadas. (OECD 491, 2020)

Em relação à classificação GHS da substância, se a viabilidade celular em ambas as concentrações testadas for maior que 70%, a substância não é classificada. Se a viabilidade celular de ambas as concentrações testadas for menor que 70%, a substância é classificada como categoria 1, segundo GHS. Por outro lado, se a viabilidade celular for menor ou igual a 70% na concentração de 5% e maior de 70% na concentração de 0,05%, não é possível classificar a substância. (OECD 491, 2020)

Tabela 6. Viabilidade celular e GHS

Viabilidade celular		Classificação GHS
5%	0.05%	
> 70%	> 70%	Não classificada
≤ 70%	> 70%	Nenhuma predição pode ser feita

Viabilidade celular		Classificação GHS
5%	0.05%	
≤ 70%	≤ 70%	Categoria 1

Fonte: OECD 491, 2020

As vantagens do teste são: baixo custo em comparação aos testes *in vivo*, simples e rápido de serem realizados, (TAKAHASHI, 2008)

4.2.5 RhCE

Neste teste a substância em estudo é aplicada topicamente no tecido tridimensional, um epitélio corneal humano reconstruído (RhCE) . Os tecidos RhCE são reconstruídos a partir de queratinócitos epidérmicos, células epiteliais humanas da córnea imortalizadas ou cultura primária de células epiteliais da córnea humana, que foram cultivadas por vários dias para formar um epitélio escamoso estratificado, altamente diferenciado morfológicamente semelhante ao encontrado na córnea humana. (OECD 492, 2019)

A construção dos tecidos EpiOcular™, LabCyte CORNEA-MODEL24 e MCTT HCE™ consiste em pelo menos 3 camadas viáveis de células e uma superfície não queratinizada, mostrando uma estrutura semelhante à córnea encontrada *in vivo*. A construção de tecido SkinEthic™ HCE consiste em pelo menos 4 camadas viáveis de células. O guideline cita os quatro métodos acima como viáveis para realização do teste. (OECD 492, 2019)

A construção de tecido RhCE é preparada em inserções com uma camada de membrana porosa sintética através da qual os nutrientes podem passar para as células. Várias camadas de células epiteliais não queratinizadas devem estar presentes no tecido semelhante à córnea reconstruída. (OECD 492, 2019)

A construção de tecido RhCE deve ter a superfície epitelial em contato direto com ar, de modo a permitir a exposição tópica direta da substância em estudo, de forma semelhante à como o epitélio da córnea seria exposto *in vivo*. A construção de tecido RhCE deve formar uma barreira funcional com robustez suficiente para resistir à rápida penetração das substâncias de referência (controle positivo). (OECD 492, 2019)

Os valores de densidade óptica/áreas de pico obtidos com as amostras de cada teste devem ser usados para calcular a porcentagem média de viabilidade do

tecido (média entre o tecido, normalizado para o controle negativo, que é definido em 100. Os resultados deve assim ser interpretados da seguinte forma: a substância em estudo é identificada como não exigindo classificação e rotulagem de acordo com o UN GHS (Sem Categoria) se a porcentagem média de viabilidade do tecido após exposição e incubação pós-exposição for maior que ($>$) a porcentagem estabelecida do valor de corte de viabilidade do tecido, conforme mostrado na tabela abaixo. Neste caso, nenhum teste adicional em outros métodos de teste são necessários. Já se a porcentagem média de viabilidade do tecido após exposição e incubação pós-exposição for menor ou igual (\leq) ao valor de corte de viabilidade de tecido estabelecido, nenhuma previsão pode ser feita a partir deste resultado isoladamente, como mostrado na tabela abaixo. Isso ocorre porque em caso de um verdadeiro positivo, os métodos não são capazes de distinguir entre as Categorias 1 e 2 do GHS. Além disso, os métodos de teste RhCE mostram uma alta porcentagem de resultados falsos positivos. Em ambos os casos, mais informações serão necessárias para fins de classificação. (OECD 492, 2019)

Para os critérios de aceitabilidade, para cada execução usando lotes de tecido RhCE que atenderam ao controle de qualidade, os tecidos tratados com a substância de controle negativo devem apresentar DO refletindo a qualidade dos tecidos do mesmo lote, as etapas de recebimento e todos os processos de protocolo e não deve estar fora dos limites historicamente estabelecidos. (OECD 492, 2019)

Da mesma forma, os tecidos tratados com a substância de controle positivo devem mostrar viabilidade tecidual média menor em relação ao negativo, refletindo assim a capacidade dos tecidos de responder a um produto químico irritante nas condições do método de ensaio. (OECD 492, 2019)

A variabilidade entre as réplicas teciduais dos produtos químicos em estudo e das substâncias de controle devem estar dentro dos limites aceitos (ou seja, a diferença de viabilidade entre duas réplicas de tecido deve ser inferior a 20% ou o desvio padrão (SD) entre três réplicas de tecido não deve exceder 18%). Se o controle negativo ou o controle positivo incluído no teste estiver fora dos intervalos aceitos, a corrida é considerada "não qualificada" e deve ser repetida. Se a variabilidade entre as réplicas teciduais de um produto químico em estudo estiver fora da faixa aceita, o ensaio deve ser considerado "não qualificado" e o produto químico em estudo deve ser testado novamente. (OECD 492, 2019)

Tabela 7. Métodos RhCE e classificação

Método de teste	Não classificado	Nenhuma predição pode ser feita
EpiOcularTMEIT (ambos os protocolos)	Média da viabilidade do tecido > 60%	Média da viabilidade do tecido ≤ 60%
SkinEthicTMHCE EIT (para o protocolo de líquidos)	Média da viabilidade do tecido > 60%	Média da viabilidade do tecido ≤ 60%
SkinEthicTMHCE EIT (para o protocolo de sólidos)	Média da viabilidade do tecido > 50%	Média da viabilidade do tecido ≤ 50%
LabCyteCORNEA-MODEL24ET (para ambos os protocolos)	Média da viabilidade do tecido > 40%	Média da viabilidade do tecido ≤ 40%
MCTT HCETMEIT (para o protocolo de líquidos)	Média da viabilidade do tecido > 35%	Média da viabilidade do tecido ≤ 35%
MCTT HCETMEIT (para o protocolo de sólidos)	Média da viabilidade do tecido > 60%	Média da viabilidade do tecido ≤ 60%

Fonte: OECD 492, 2019

A principal vantagem do método é a possibilidade de testar materiais líquidos ou sólidos puros, o que não é possível com culturas de células bidimensionais. (KALUZHNY, 2015)

4.4 LIMITAÇÕES DOS MÉTODOS *IN VITRO*

Limitações do teste de irritação cutânea *in vitro* inclui principalmente a não possibilidade de distinguir a Categoria 3 de Não Classificação.

Limitações do teste de corrosão cutânea *in vitro* inclui principalmente a não capacidade de distinção entre as subcategorias de corrosão do GHS, 1B e 1C à informações limitadas de substâncias que sejam Categoria 1C. É possível portanto fazer distinção entre Categoria 1A e 1B; ou Categoria 1C e Não Classificado.

Limitações do teste BCOP incluem não capacidade de avaliar resposta tardia; não possui filme lacrimal portanto aumenta a chance de falsos positivos; o sistema de teste é desprovido de vasos sanguíneos, o que impede observação dos efeitos da inflamação na íris. (CAZEDEY, 2009) Além disso, o teste identifica apenas substâncias que causam danos severos ao olho ou substâncias não classificadas para irritação ocular ou danos severos.

Limitações do teste STE incluem não identificação de substâncias nas seguintes categorias do GHS: Categoria 2, Categoria 2A, Categoria 2B. A incapacidade de identificação ocorre devido ao número considerável de substâncias de Categoria 1 subestimadas como Categoria 2, 2A ou 2B e substâncias não

classificadas segundo o GHS superestimadas como Categoria 2, 2A ou 2B. Por essa razão, testes adicionais podem ser necessários.

Limitações do teste RhCE incluem não discriminação entre irritação ocular/efeitos reversíveis nos olhos (Categoria 2) e lesões oculares graves/irreversíveis efeitos nos olhos (Categoria 1), nem entre Categoria 2A e a Categoria 2B, conforme definido pelo GHS. Para esses fins, uma abordagem integrada para testes e para avaliação de lesões oculares graves e irritação ocular, é necessária.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o trabalho esperou-se destacar a importância de metodologias *in vitro* em relação às *in vivo*, as quais objetivam eliminar a experimentação de milhares de animais, como prática comum em vários lugares do planeta. Mesmo com a eutanásia obrigatória ao final do estudo, os animais sofrem com dores e desconforto por dias até o final do estudo, uma vez que o item teste é aplicado diretamente na pele ou nos olhos desses animais. Portanto, os testes de draize ainda são extremamente dolorosos para os animais e considerados cruéis apesar de serem ainda muito utilizados por sua eficácia.

Em vista disso, a demonstração da eficácia e segurança dos métodos *in vitro* são essenciais para que cada vez mais as agências reguladoras possam aceitar e validar esses estudos, sem a necessidade da realização de estudos *in vivo* para confirmação do resultado de irritação e corrosão ocular e cutânea. Ao mesmo tempo que métodos novos ou modificações em métodos existentes possam fazer com que estes tenham menos limitações em relação aos resultados e conseqüentemente que sejam suficientemente confiáveis ao ponto de não ser necessário realizar testes com animais.

Países europeus estão à frente no quesito legislação e aprovação desses métodos alternativos ao uso de animais não só nos testes de irritação e corrosão ocular e cutânea, como também em praticamente todos os testes requeridos. No Brasil, a RDC 294/2019 abre precedentes para realização destes testes, porém é comum a ANVISA solicitar testes *in vivo* além dos testes *in vivo*, já que a legislação não é clara e bem definida em relação à realização dos métodos alternativos ao uso

de animais. Portanto, a legislação deve acompanhar o avanço da ciência e desta maneira, o uso de animais em testes poderá se tornar obsoleto.

6. BIBLIOGRAFIA

BOTELHO, Louise Lira Roedel; DE ALMEIDA CUNHA, Cristiano Castro; MACEDO, Marcelo. O método da revisão integrativa nos estudos organizacionais. **Gestão e sociedade**, v. 5, n. 11, p. 121-136, 2011.

CAZARIN, Karen Cristine Ceroni; CORRÊA, Cristiana Leslie; ZAMBRONE, Flávio Ailton Duque. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, p. 289-299, 2004.

CAZEDEY, Edith Cristina Laignier et al. Corrositex®, BCOP and HET-CAM as alternative methods to animal experimentation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p. 759-766, 2009.

CRUZ, Áurea Silveira; BARBOSA, Maria Luisa; PINTO, Terezinha de Jesus Andreoli. Testes in vitro como alternativa aos testes in vivo de Draize. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 63, n. 1, p. 1-9, 2004.

DALFOVO, Michael Samir; LANA, Rogério Adilson; SILVEIRA, Amélia. Métodos quantitativos e qualitativos: um resgate teórico. **Revista interdisciplinar científica aplicada**, v. 2, n. 3, p. 1-13, 2008.

DANILENKO, Dimitry M.; PHILLIPS, Gail D. Lewis; DIAZ, Dolores. In vitro skin models and their predictability in defining normal and disease biology, pharmacology, and toxicity. **Toxicologic Pathology**, v. 44, n. 4, p. 555-563, 2016.

DE OLIVEIRA, Maxwell Ferreira. Metodologia científica: um manual para a realização de pesquisas em Administração. **Universidade Federal de Goiás. Catalão-GO**, 2011.

GORDON, Kathryn. The OECD guidelines and other corporate responsibility instruments: a comparison. 2001.

KALUZHNY, Yulia et al. Eye irritation test (EIT) for hazard identification of eye irritating chemicals using reconstructed human cornea-like epithelial (RhCE) tissue model. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 102, p. e52979, 2015.

MINI, Camila Alessandra. **Estabelecimento de um modelo de epiderme em 3D proveniente de células imortalizadas a ser utilizado como plataforma de avaliação da toxicidade dérmica induzida por corantes de tinturas capilares**. 2020. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

NO, OECD Test Guideline. 437. **Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants**, 2020.

NO, OECD Test. 492: Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage. **Guidel. Test. Chem. In OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**, 2019.

OECD, Test No. 491: Short Time Exposure in vitro Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage,(2020).

OECD. Test No. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion. 2002.

ORGANISATION DE COOPÉRATION ET DE DÉVELOPPEMENT ÉCONOMIQUES. **Test No. 404: acute dermal irritation/corrosion**. OECD Publishing, 2015.

ORGANISATION DE COOPÉRATION ET DE DÉVELOPPEMENT ÉCONOMIQUES. **Test No. 431: In Vitro Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Method**. OECD Publishing, 2013.

PELLEVOISIN, Christian et al. SkinEthic™ RHE for in vitro evaluation of skin irritation of medical device extracts. **Toxicology in Vitro**, v. 50, p. 418-425, 2018.

RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 294, DE 29 DE JULHO DE 2019. Dispõe sobre os critérios para avaliação e classificação toxicológica, priorização da análise e comparação da ação toxicológica de agrotóxicos, componentes, afins e preservativos de madeira, e dá outras providências. Anvisa 2019.

SANTOS, Alessandra Marques dos et al. Proficiência do método alternativo ao uso de animais OECD TG 491 para avaliação de irritação e corrosão ocular. 2019.

TAKAHASHI, Yutaka et al. Development of the short time exposure (STE) test: an in vitro eye irritation test using SIRC cells. **Toxicology in vitro**, v. 22, n. 3, p. 760-770, 2008.

TAKAHASHI, Yutaka et al. The Short Time Exposure (STE) test for predicting eye irritation potential: intra-laboratory reproducibility and correspondence to globally harmonized system (GHS) and EU eye irritation classification for 109 chemicals. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 7, p. 1425-1434, 2011.

TG, OECD. OECD Guideline for Testing of Chemicals, no. 439: In Vitro Skin Irritation Reconstructed Human Epidermis Test Method. 2019.



Ana Cláudia de Andrade Pepato
Aluna



Profa. Dra Silvyta Stuchi Maria-Engler
Orientadora