

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

ALESSANDRA MARQUES DOS SANTOS

**Proficiência do método alternativo ao uso de animais OECD TG 491 para  
avaliação de irritação e corrosão ocular**

Florianópolis

2019

Alessandra Marques dos Santos

**Proficiência do método alternativo ao uso de animais OECD TG 491 para  
avaliação de irritação e corrosão ocular**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Farmacêutico.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karin Silva Caumo

Coorientador: Me. Maria Luiza Carneiro Büchele

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Santos, Alessandra  
Proficiência do método alternativo ao uso de animais  
OECD TG 491 para avaliação de irritação e corrosão ocular /  
Alessandra Santos ; orientadora, Karin Silva Caumo,  
coorientadora, Maria Luiza Carneiro Büchele , 2019.  
50 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências  
da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Testes alternativos. 3. Irritação  
ocular. 4. OECD TG 491. I. Silva Caumo, Karin . II.  
Carneiro Büchele , Maria Luiza. III. Universidade Federal  
de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. IV. Título.

Alessandra Marques dos Santos

**Proficiência do método alternativo ao uso de animais OECD 491 para avaliação de irritação e corrosão ocular**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Farmacêutico” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Farmácia

Florianópolis, 21 de Novembro de 2019.

---

Profª Drª. Marení Rocha Farias  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Profª Drª Karin Silva Caumo  
Orientador(a)  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Profª Drª Tânia Beátria Creckzynski Pasa  
Avaliadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Profª Drª Iara Fabrícia Kretzer  
Avaliadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

## RESUMO

Os métodos alternativos ao uso de animais na pesquisa científica são utilizados na busca do melhoramento aos problemas éticos envolvidos e objetivam fornecer resultados que mimetizem com mais especificidade as reações que ocorrem no corpo humano. Muitas substâncias precisam passar por testes de toxicidade, que por serem feitos em animais, acarretam altos custos, tempo de ensaio prolongado e frequentemente o sofrimento animal. Além disso, os testes *in vivo* nem sempre são capazes de classificar todas as substâncias existentes, visto que novas moléculas são desenvolvidas a cada ano. O teste de Draize tem mais de 50 anos e ainda é considerado o método padrão ouro para avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular. Métodos alternativos desenvolvidos e validados, que utilizam modelos *in vitro* de córnea podem ser utilizados visando substituir ou diminuir o uso do teste de Draize. Combinações estratégicas de vários métodos de testes alternativos em uma abordagem integrada de teste chamada IATA (Integrated Approach on Testing and Assessment) podem substituir o teste de Draize. Um dos métodos *in vitro* para estudo de irritação e corrosão ocular descrita pela OECD TG 491 é o STE (*Short Time Exposure*). O STE permite medir a viabilidade das células da córnea de coelho SIRC cultivadas *in vitro*, após 5 minutos de exposição a soluções de teste diluídas a 5% e 0,05%, permitindo categorizar os produtos químicos em Categoria 1 (Cat 1) e Sem Categoria (No Cat). Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo realizar a proficiência intralaboratorial do método *in vitro* STE. Cinco substâncias de proficiência já estabelecidas no protocolo OECD TG 491 foram testadas frente à cultura de células de coelho SIRC e categorizadas conforme o protocolo. As substâncias controle foram validadas de acordo com os critérios de aceitação e as substâncias de proficiência foram classificadas de acordo com a capacidade de gerar danos oculares. A partir dos resultados obtidos, verificou-se que o método foi capaz de classificar de maneira correta as substâncias teste chegando à classificação adequada especificada pela TG 491, a cultura celular foi estabelecida, os critérios de validação foram cumpridos, os resultados foram válidos e houve reprodutibilidade intralaboratorial. Foi constatado que a metodologia tende a validar corretamente substâncias de acordo com a respectiva capacidade de gerar ou não dano ocular dentro do limite de classificação, podendo disponibilizar o teste para estudos da toxicidade ocular de fármacos e cosméticos no Laboratório de estudos de Protozoários Emergentes e Oportunistas (LAPEO).

Palavras-chave: Métodos alternativos. Irritação ocular. OECD TG 491.

## ABSTRACT

Alternative *in vitro* methods to the use of animals in scientific research are used to improve the ethical problems involved in animal use and aim to provide results that mimic more specifically the reactions that occur in the human body. Many substances need to pass for toxicity tests that are made in animals which carry high costs, prolonged testing time and often animal suffering. Besides that, the tests *in vivo* are not always able to classify all existing substances as new chemicals are developed each year. The Draize test developed over 50 years ago is still considered the gold standard for assessing eye irritation and corrosion potential. Alternative methods developed and validated using *in vitro* corneal models can be used to replace or decrease the use of the Draize test. Strategic combinations of alternative tests methods within an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) can replace Draize testing on animals. One of the *in vitro* methods for studying eye irritation and corrosion described by OECD TG 491 is STE (Short Time Exposure). STE allows measure the viability of an *in vitro* rabbit corneal cells SIRC, after 5 minutes of exposure to 5% and 0.05% diluted test solutions, allowing categorization of chemicals into Category 1 (Cat 1) and Sem Category (No Cat). In this context, the present work aimed to perform the intra-laboratory proficiency of the *in vitro* STE method. Five proficiency substances already established in the OECD TG 491 protocol were tested in SIRC rabbit cell culture and categorized according to the protocol. Control substances were validated according to acceptance criteria and proficiency substances were classified according to their ability to generate eye damage. From the results obtained it was found that the method was able to correctly classify the test substances reaching the appropriate classification specified by TG 491. The cell culture was established, the validation criteria were met, the results were valid and there was intra-laboratory reproducibility. Showing that the methodology tends to correctly validate substances according to their ability to generate or not eye damage within their classification limit, can made the test available for drug and cosmetic eye toxicity studies at Laboratório de estudos de Protozoários Emergentes e Oportunistas (LAPEO).

Key words: Alternative methods. Eye irritation. OECD TG 491.

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCOP	Bovine Corneal Opacity and Permeability
CONCEA	Conselho Nacional de controle a experimentação animal
ECVAM	European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing
EIT	Vitrigel-Eye Irritancy
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FL	Fluorescein Leakage
IATA	Integrated Approach on Testing and Assessment
ICCVAM	Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods
ICE	Isolated Chicken Eye
INCQS	Instituto Nacional Controle Qualidade em Saúde
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
JACVAM	Japanese Center for the Validation of Alternative Methods
JSAAE	Society for Alternative to Animal Experiments
LNBio	Laboratório Nacional de Biociências
MCTIC	Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
NICEATM	NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods
OECD	Organização para a cooperação e desenvolvimento econômico
PREMASUL	Plataforma Regional de Métodos Alternativos ao Uso de Animais de Experimentação
RENAMA	Rede Nacional de Métodos Alternativos
RhCE	Reconstructed human Cornea-like Epithelium
STE	Short Time Exposure
TG	Test guideline
ZEBET	Centre for Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**  
**SUMÁRIO**

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
1.1	OBJETIVO GERAL.....	10
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	10
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>11</b>
2.1	TESTES TOXICOLÓGICOS .....	11
2.2	TOXICOLOGIA DO SÉCULO XXI .....	13
2.3	IRRITAÇÃO E CORROSÃO OCULAR.....	18
<b>2.3.1</b>	<b>Teste <i>in vitro</i> Draize</b> .....	<b>20</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Testes alternativos oculares</b> .....	<b>25</b>
2.4	TESTE STE.....	31
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
3.1	CULTURA E MANUTENÇÃO CELULAR .....	35
3.2	DEMONSTRAÇÃO DE PROFICIÊNCIA .....	35
3.3	TESTE <i>IN VITRO</i> STE PARA IDENTIFICAÇÃO DE IRRITAÇÃO OCULAR OU DANOS OCULARES GRAVES.....	36
3.4	MEDIDA DA VIABILIDADE CELULAR.....	37
3.5	ANÁLISE DE DADOS E MODELO DE PREDIÇÃO .....	37
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>44</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>45</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Ensaio de toxicidade são fundamentais para prever a reação que determinada substância desenvolverá ao entrar em contato com o corpo humano. Historicamente, testes de toxicidade eram desenvolvidos em animais e os resultados eram extrapolados para humanos (COSTA VICTAL et al., 2015). Princípios éticos fizeram com que diversas leis e normas fossem desenvolvidas com o objetivo de garantir o princípio dos 3Rs (redução, refinamento e substituição) e assim controlar o uso de animais, refinar as metodologias existentes e desenvolver metodologias alternativas (CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004). Foram criados centros especializados em métodos alternativos ao uso de animais em todo o mundo, como ECVAM, ICCVAM, JaCVAM e ZEBET. Estes centros tem o objetivo de controlar, desenvolver, divulgar e promover as metodologias alternativas. No Brasil quem desenvolve este trabalho é a RENAMA, o CONCEA, a BraCVAM e o PReMASUL (PRESGRAVE et al., 2016).

Quando se trata de toxicidade ocular, o teste considerado como padrão ouro é o teste Draize, que faz o uso de coelhos, mas pela baixa reprodutibilidade e por questões éticas, diversas metodologias *in vitro* passaram a ser desenvolvidas para substituição (PRINSEN et al., 2017). Nenhuma metodologia *in vitro* sozinha é capaz de substituir totalmente o teste Draize, entretanto, uma combinação estratégica de metodologias alternativas pode realizar esta substituição (OECD, 2017<sup>2</sup>).

O teste *in vitro* de curta duração para danos oculares ou o “Short Time Exposure” (STE) mede a viabilidade das células da córnea de coelho SIRC cultivadas *in vitro*, após 5 minutos de exposição as soluções de teste diluídas a 5% e 0,05% permitindo classificar os produtos químicos em Categoria 1 (Cat 1) e Sem Categoria (No Cat) segundo o Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS) (OECD, 2018<sup>2</sup>).

O Laboratório de Estudos de Protozoários Emergentes e Oportunistas (LAPEO) tem como uma linha de pesquisa o estudo de amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba*, que são causadoras de uma infecção ocular grave chamada ceratite amebiana. Um dos objetivos da linhas de pesquisa é a descoberta de novas opções e alternativas medicamentosas para tratar essa infecção, logo, a proficiência

intralaboratorial de um teste de irritação ocular validado pela OECD, tal como o STE, permitirá novas oportunidades e resultados mais confiáveis para os estudos realizados pelo grupo.

### 1.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo realizar a proficiência intralaboratorial do método alternativo ao uso de animais OECD TG 491 para avaliação de irritação e corrosão ocular

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o teste STE conforme descrito no guia da OECD TG 491
- Testar as substâncias de proficiência pré-estabelecidas pelo protocolo OECD TG 491
- Categorizar cada substância de acordo com o potencial de irritação

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 TESTES TOXICOLÓGICOS

Durante o período de industrialização do século XX, percebeu-se a necessidade de proteger as pessoas contra possíveis efeitos nocivos de substâncias químicas (PRINSEN et al., 2017). Em 1937, a sulfanilamida, antimicrobiano utilizado em sua forma liofilizada recebeu uma nova forma farmacêutica líquida, denominado de “Elixir de sulfanilamida”, dissolvido em dietilenoglicol, um excipiente tóxico que pode provocar problemas renais e levar ao óbito. A consequência da comercialização do elixir foi a morte de diversas pessoas (RAPKIEWICZ; GROBE, 2014). Apesar da toxicidade desta nova formulação, ela só pode ser retirada do mercado pelo Food and Drug Administration (FDA) porque havia sido rotulada de modo inadequado. Elixires eram considerados como produtos que continham álcool em sua composição, se ele tivesse sido rotulado como “Solução de sulfanilamida” não poderia ter sido retirado do mercado. Nesta época não havia a obrigatoriedade da realização de testes de toxicidade para que os produtos entrassem no mercado, o que teria evitado a tragédia. Neste momento ficou evidente a necessidade de legislações específicas para este fim, sendo criada em 1938 a lei “Food, Drug and Cosmetic (FD&C)” que exigia comprovação de eficácia e segurança de medicamentos (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2007).

Neste mesmo período, houve um aumento do consumo de produtos de uso doméstico e pessoal, expondo a população a novas substâncias químicas, o efeito inicial desta exposição variou desde casos leves de dermatite até casos mais graves de câncer (PRINSEN et al., 2017). Quando se diz respeito à avaliação de toxicidade de produtos químicos, a utilização dos animais se fez necessária, em especial dos mamíferos, com o objetivo de predizer os efeitos nocivos que podem ser desencadeados após o contato com determinada substância (COSTA VICTAL et al., 2015).

A necessidade de melhora dos testes toxicológicos se mostrou de grande importância após o caso da talidomida. Em 1956 Kunz et al. demonstraram o efeito sedativo rápido e prolongado da talidomida. Foram realizados testes em ratos, camundongos, porquinhos-da-índia e coelhos e em nenhum deles foi observado

efeitos respiratórios, cardíacos ou arteriais. Também não houve efeito nos modelos de infecção ou no carcinoma de Ehrlich em camundongos (MELLIN; KATZENSTEIN, 1962). Os estudos de toxicidade tinham resultados que representavam um baixo risco de intoxicação, a dose letal (LD50) nem foi possível de ser determinada em animais (SCHARDEIN, 1993). Entretanto não foram realizados testes de teratogenicidade, mesmo que na época já se soubesse que substâncias com baixa toxicidade pudessem gerar danos fetais (LENZ, 1988). Em 1957, a talidomida entrou no mercado da Alemanha, comercializado como um medicamento totalmente atóxico e sem efeitos colaterais e, em 1961, foi retirado do mercado por sua associação aos casos de má formação fetal, que não foi prevista pelos métodos de toxicidade em animais utilizados em sua avaliação (OLIVEIRA; BERMUDEZ; SOUZA, 1999). A talidomida foi um caso clássico de falha nos testes toxicológicos realizados em animais, onde os ratos foram resistentes e os fetos humanos foram sensíveis (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2007).

Russell e Burch em 1959 publicaram o livro “The Principles of Humane Experimental Technique”, ou seja “O princípio da técnica experimental humanitária”, onde descreveram sobre métodos alternativos ao uso de animais e desenvolveram o princípio dos 3Rs (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002). O princípio dos 3Rs leva esse nome em função das iniciais de seus objetivos: Reduction (redução), Refinement (refinamento) e Replacement (substituição). O primeiro “R” diz respeito à redução do número de animais utilizados na pesquisa, desenvolver novos protocolos para obter um maior número de informações relevantes com um pequeno número de animais (CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004). O segundo “R” significa a promoção do alívio ou minimização do sofrimento e estresse animal, fazendo o uso de novas tecnologias e métodos com novos endpoints toxicológicos além do usual, que é a letalidade (CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004). Para isso podem ser utilizadas diversas técnicas de monitoramento do curso da doença como biomarcadores, observações comportamentais e avaliação da temperatura corporal (KENDALL et al., 2018). O terceiro “R” significa a substituição dos ensaios *in vivo* por ensaios *in vitro*, ou seja, desenvolver métodos alternativos ao uso de animais (CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004).

Com o passar dos anos, os testes toxicológicos expandiram, houve avanços na ciência que permitiram a criação de novos protocolos experimentais e sistemas de avaliação. O problema deste cenário estava relacionado ao custo dos experimentos, ao uso de animais e ao tempo necessário. Mesmo com todo este investimento, estes resultados podem não ser ideais, não representando o que ocorre durante uma exposição humana (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2007). Os resultados obtidos por modelos de experimentais que fazem uso de animais vêm sendo motivo de críticas. Estima-se que gasto anual de estudos com animais em 1970 foi de 100-200 milhões de dólares, em 1993 de 60-85 milhões e em 2005 de 50-100 milhões. Os gastos para experimentos *in vivo* em todo mundo foram cerca de US \$ 14 bilhões por ano (TAYLOR et al., 2008). Esses valores continuam estáveis em 2018 (ÁVILA; VALADARES, 2019).

A avaliação de toxicidade é baseada na resposta biológica observada de grupos de animais, onde os resultados são extrapolados para os humanos. Os testes realizados em grupos homogêneos de animais expostos a substâncias isoladas e em altas concentrações são usados para representar a resposta biológica que irá ocorrer em grupos heterogêneos de humanos, expostos a doses mais baixas da substância que estará em contato com outras substâncias, as quais o organismo humano está diariamente exposto (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2007). Acredita-se que com o avanço da ciência estes possam ser substituídos por outros que levem em consideração a fisiologia humana (ÁVILA; VALADARES, 2019).

Em 1979, época onde já se sabia da importância dos testes toxicológicos, havia cerca de 62.000 produtos químicos disponíveis no mercado. Em 2007 eram cerca de 82,000 e estima-se que a todo ano sejam introduzidos 700 novos químicos no mercado. Essa demanda não é atendida pelos modelos atuais de toxicidade, o tempo, custo, e número de animais não permitem a viabilidade de realizar todos testes toxicológicos para este alto número de substâncias, logo, estes não estão sendo totalmente avaliados (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2007).

## 2.2 TOXICOLOGIA DO SÉCULO XXI

Em 2007 surgiu o conceito de “toxicidade do século XXI” a partir da publicação do “Toxicity testing in the 21st Century” pela National Research Council, período em que ocorreram mudanças mais drásticas no campo da toxicologia experimental com a promoção de metodologias *in vitro*. Os testes *in vivo* foram considerados antiquados em comparação com metodologias *in vitro* que trouxeram a possibilidade de obter resultados mais relevantes e eficientes. A toxicologia moderna tem por objetivo a utilização de metodologias que não utilizam animais e que possuam resultados mais confiáveis aos seres humanos sem o sofrimento animal. Já existem grandes avanços neste campo, estes são resultados do desenvolvimento de legislações específicas, pesquisas inovadoras, agências regulatórias e divulgação de informações relevantes entre integrantes da comunidade acadêmica (ÁVILA; VALADARES, 2019).

Estas novas metodologias incluem modelos *ex vivo* que fazem uso de tecido de animais mortos, métodos de citotoxicidade baseados cultura celular, em tecido reconstituído, métodos organotípicos, métodos de membrana corioalantóica (CAM), métodos de órgãos isolados e modelos computacionais (WILSON; AHEARNE; HOPKINSON, 2015). O Comitê Técnico da ISO 194 visa à padronização de materiais, métodos, princípios, testes e investigações na área clínica e biológica. Através da publicação da ISO 10993- 2009 houve um incentivo da substituição dos testes em animais pelo uso de testes alternativos (YUN et al., 2016).

Existem cerca de 20 centros de validação de metodologias alternativas no mundo, sendo quatro principais o ECVAM, ICCVAM, JaCVAM e ZEBET (PRESGRAVE, 2012). Criados a partir da década de 1980, esses centros têm por objetivo promover, coordenar, revisar, supervisionar e financiar pesquisas que levem em consideração o princípio dos 3Rs, o desenvolvimento e validação de métodos alternativos ao uso de animais. Eles também auxiliam na implementação e aceitação no mercado pós-validação (ZEBET, 2008; BOTTINI et al., 2008). Essas ações fazem com que haja uma maior compreensão dos processos toxicológicos (EURL ECVAM, 2014). Dentre as áreas de aplicação dos métodos alternativos aceitos pelo ECVAM, ICCVAM e/ou OCDE, são: corrosão cutânea, irritação cutânea, absorção/penetração cutânea, sensibilização cutânea, corrosão ocular, irritação ocular, toxicidade sistêmica aguda, genotoxicidade/ mutagenicidade, carcinogenicidade,

pirogenicidade, hematotoxicidade, fototoxicidade aguda, toxicidade reprodutiva (PETA, 2018).

A OECD possui uma coleção chamada “Guidelines for the testing of chemicals”, ou seja, diretrizes para testes de produtos químicos, que é dividida em 5 seções. A primeira seção trata das propriedades físico-químicas das substâncias, a segunda sobre seus efeitos nos sistemas bióticos, a terceira sobre destino e efeito no ambiente, a quarta sobre efeitos na saúde e a quinta sobre outras diretrizes. Essas seções compreendem cerca de 150 métodos de testes aceitos internacionalmente e utilizados pela indústria, laboratórios e governos para identificar, caracterizar, selecionar e classificar substâncias químicas que são candidatas ao desenvolvimento de novos produtos (iLibrary, 2017). No Brasil a área de métodos alternativos passou por mudanças nos últimos anos, a criação da RENAMA, o CONCEA, a BraCVAM e o PReMASUL foram grande avanço. Eles são responsáveis pelos processos de validação dos métodos alternativos (PRESGRAVE, 2012). A Lei 9.605 de 12 de Fevereiro de 1998 trata sobre atividades lesivas ao meio ambiente e estabelece que experimentos em animais apenas sejam permitidos quando não há um método alternativo validado. Publicado na DOU 13/02/1998. Em 2008 foi aprovada a Lei de Arouca (Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008) que estabelece “procedimentos para o uso científico de animais” e, dentre outras disposições, ela traz no capítulo 2 a criação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e descreve suas competências, que incluem credenciar instituições para a utilização de animais em pesquisas, monitorar e avaliar as metodologias alternativas, avaliar métodos, instalações e condições de trabalho de laboratórios que realizam experimentação animal, entre outros. Publicado no DOU de 09/10/2008, Pág.1.

Em 2012, o governo criou a RENAMA com o objetivo promover os métodos alternativos no país, e em 2013 foi instituído o BraCVAM que já vinha sendo proposto desde 2008 quando foram publicados 3 artigos a respeito da necessidade de sua criação. Em 2011, a FIOCRUZ e a ANVISA assinaram um acordo de cooperação técnica a respeito, onde se criou uma comissão para viabilizar sua criação que, por fim, se deu em 2013 (PRESGRAVE et al., 2016). Estas três instituições trabalham em conjunto seguindo o modelo descrito pela OECD número

34 “Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment” (OECD, 2005). A RENAMA participa da etapa de organização dos estudos, a BraCVAM recebe as solicitações para a validação de testes, faz a revisão dos resultados obtidos dos ensaios de validação, a recomendação da aprovação e informa ao CONCEA sobre metodologias promissoras, e, por fim, o CONCEA que irá tornar essa metodologia aceita no país, é o responsável pela adoção dos métodos alternativos no Brasil. A BraCVAM e a RENAMA possuem plataformas digitais que são usadas para reunir informações sobre os métodos mundiais, atualizando assim pesquisadores e a população em geral (PRESGRAVE et al., 2016).

A RENAMA tem como objetivo a validação, certificação, implementação e desenvolvimento dos métodos alternativos, levando em consideração o princípio dos 3Rs. Ela é responsável pelo treinamento técnico das metodologias e o monitoramento do desempenho através de avaliações interlaboratoriais e, também, por promover o desenvolvimento de novas metodologias alternativas ao uso de animais (MCTIC, 2017). A RENAMA é composta por três laboratórios principais, o INMETRO, o LNBio e o INCQS e por outros laboratórios secundários. Por meio desta rede de laboratórios, a RENAMA disponibiliza as metodologias reconhecidas pela OECD (PRESGRAVE et al., 2016).

Em 2016 o MCTIC desenvolveu a PReMASUL, uma plataforma que visa auxiliar a implementação de métodos alternativos no MERCOSUL estimulando a adoção das metodologias validadas, capacitando e treinando pesquisadores e técnicos e assim, promovendo a pesquisa e desenvolvimento destas metodologias. Este investimento terá resultados benéficos para a economia de todos os países pertencentes ao bloco e o Brasil é o líder neste processo (MCTIC, 2017). Os laboratórios associados a RENAMA realizam capacitação teórico e prática anualmente que incluem diferentes métodos de avaliação toxicológica alternativa (ÁVILA; VALADARES, 2019).

A respeito de resoluções, a Normativa CONCEA n° 17 de 03 de Julho de 2014 que “Dispõe sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil e dá outras providências”. Interessados em validar para pesquisas os métodos alternativos ao uso de animais devem estar

associados a RENAMA (rede nacional de métodos alternativos) e o CONCEA irá reconhecer a validação do método e após o reconhecimento fica estabelecido o prazo de 5 anos para a substituição obrigatória do método original para o alternativo. Publicado no DOU de 04/07/2014, Seção I, Pág.51 (MCTIC, 2016). Ainda em 2014 foi publicado a Resolução normativa CONCEA nº18 de 24 de Setembro de 2014 que “Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil, nos termos da Resolução Normativa nº 17, de 03.07.2014, e dá outras providências” (CONCEA, 2014)

Em 2015 a ANVISA publicou a RDC nº 35 de 07 de Agosto de 2015 que “Dispõe sobre a aceitação dos métodos alternativos de experimentação animal reconhecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.” Onde, a ANVISA dispõe sobre a aceitação dos métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa reconhecidos pelo CONCEA (Publicado no DOU nº151, de 10/08/2015). Após o reconhecimento da ANVISA pelos métodos aprovados pelo CONCEA, os estabelecimentos têm um prazo de 5 anos para adequação aos métodos alternativos, prazo esse que acabou em Setembro de 2019 (ASCOM, 2015).

A resolução normativa nº 31 de 18 de Agosto de 2016 reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. O CONCEA reconhece sete métodos alternativos agrupados nos seguintes grupos: avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular, avaliação do potencial de sensibilização cutânea, avaliação de toxicidade reprodutiva, avaliação da contaminação pirogênica em produtos injetáveis. No grupo de “Avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular” estão os testes OECD TG 491 (teste STE), OECD TG 492 (teste RhCE). Para “Avaliação do potencial de sensibilização cutânea” estão OECD TG 442C (Sensibilização cutânea *in chemico*) e OECD TG 442D (Sensibilização cutânea *in vitro*). Para “avaliação de toxicidade reprodutiva” OECD TG 421 (teste de triagem para toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento) e OECD TG 422 (estudo de toxicidade repetida combinado com teste de toxicidade reprodutiva) e para “Avaliação da contaminação pirogênica em produtos injetáveis” está o teste de Endotoxina Bacteriana (Farmacopeia Brasileira), publicado no DOU de 19/08/2016, Seção I, Pág.04 (CONCEA, 2016).

### 2.3 IRRITAÇÃO E CORROSÃO OCULAR

Os olhos são órgãos receptores constituintes do sistema sensorial, onde sua principal função é receber estímulos luminosos e captá-los, de modo que estes estímulos cheguem ao sistema nervoso (PENS, 2008). O olho é formado por 3 camadas. A camada externa, também chamada de camada fibrosa, é composta pela córnea e a esclera. A camada média ou vascular é composta pela íris e coroide e a camada mais interna do olho é a retina, que faz parte do sistema nervoso central (BERNE; LEVY, 2009). Os testes toxicológicos de irritação e corrosão ocular são necessários, pois diversas substâncias possuem a capacidade de gerar danos à córnea, como produtos de uso doméstico, agrícolas, industriais, cosméticos, higiênicos e medicamentos oculares ou não oculares quando usados de forma inadequada. Estes danos podem variar desde processos irritativos até processos inflamatórios e causar sintomas como desconforto ocular, podendo ter evolução para corrosão do tecido e até cegueira (WILSON; AHEARNE; HOPKINSON, 2015).

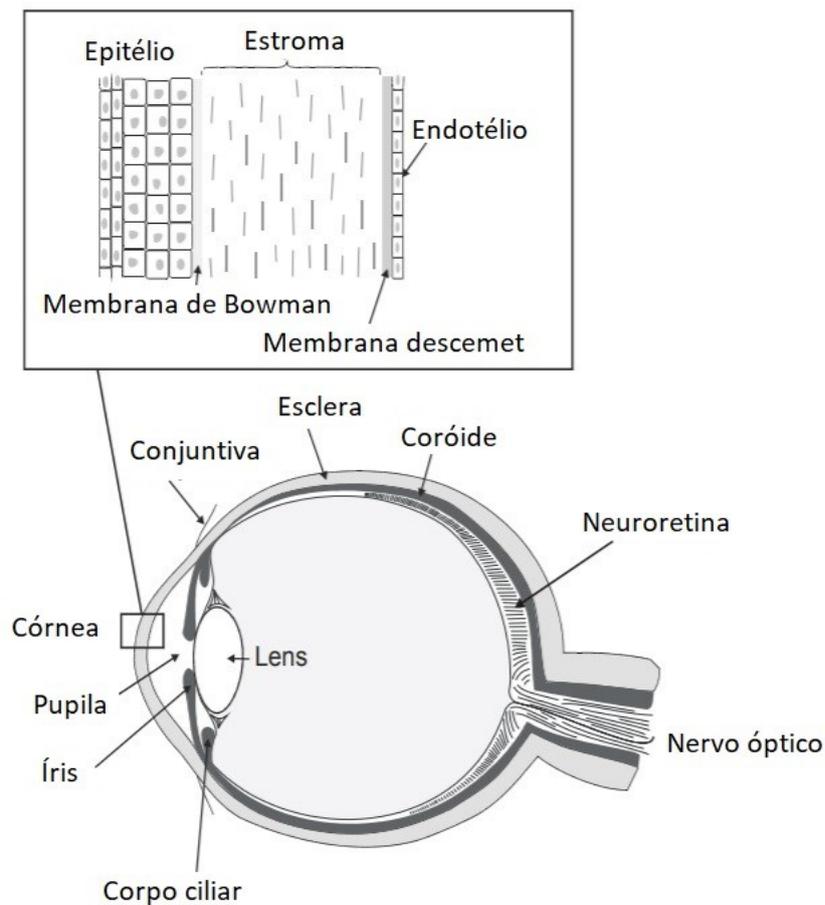
A córnea é uma membrana transparente e avascular, com cerca de 12 mm de diâmetro e 0,50 mm de espessura. Ela é dividida em 5 camadas, o epitélio da superfície que é rico em nervos, a membrana de Bowman rica em colágeno e acelular, o estroma que representa 85-90% da espessura da córnea e é composto por fibrilas de colágeno que contém queratócitos (células que se assemelham aos fibroblastos) responsáveis pela homeostase da córnea, a membrana descemet acelular e o endotélio composto por 1 camada celular com função de manter a regularidade da matriz de colágeno, conforme figura 1 (HUHTALA et al., 2008).

De acordo com o protocolo OECD TG 405, que trata sobre irritação e corrosão ocular aguda, a irritação ocular pode ser definida como uma alteração ocular reversível provocada por certa substância até 21 dias após ter ocorrido a exposição e corrosão ocular, quando a exposição a certa substância gerar um dano mais grave aos tecidos oculares que seja irreversível por 21 dias após a exposição (MCNAMEE et al., 2009). O processo de irritação e corrosão ocular é caracterizado pelo efeito citotóxico e inflamatório, que muitas substâncias químicas e físicas são capazes de gerar ao entrar em contato com as células que compõe as diversas

camadas oculares. As características clínicas observadas após esta exposição podem variar desde desconforto leve, coceira e hiperemia até casos mais graves como cegueira (SILVA, 2018). Geralmente as substâncias irritantes geram efeitos nas estruturas frontais dos olhos que incluem a córnea, conjuntiva e íris (MCNAMEE et al., 2009).

A córnea é a parte do olho que mais se estuda, pois a citotoxicidade de suas células está diretamente relacionada ao grau de severidade das substâncias que possam estar entrando em contato com os olhos (SILVA, 2018). Ao expor diferentes classes químicas aos olhos, como surfactantes, ácidos, álcoois, aldeídos, álcalis e outros, observa-se que a profundidade da lesão na córnea prediz o grau da lesão e a sua duração (MAURER; PARKER; JESTER, 2002).

Figura 1- Anatomia do olho e da córnea.



Fonte: Adaptado de HUHTALA et al. (2008).

Irritantes leves afetam células epiteliais da córnea, irritantes moderados afetam também a superfície do estroma e irritantes graves afetam o estroma mais profundamente (MCNAMEE et al., 2009). Substâncias oxidantes geram lise das células epiteliais da córnea. Surfactantes estão relacionados à precipitação e lise de proteínas que gera redução do tamanho dos corneócitos. Substâncias alcalinas induzem a saponificação dos fosfolípidos de membrana gerando ruptura das células epiteliais e substâncias ácidas geram precipitação de proteínas (SILVA, 2018). Outras características das substâncias também interferem em sua capacidade de gerar danos oculares, o pH é um exemplo, pH “extremos” ( $\geq 11,5$  ou  $\leq 2$ ) geram efeitos locais de irritação/corrosão ocular fortes (MCNAMEE et al., 2009).

### **2.3.1 Teste *in vitro* Draize**

Com o objetivo de avaliar os riscos que estão relacionados a estas substâncias, o teste Draize é considerado o padrão ouro como teste toxicológico. Nele são aplicadas substâncias nos olhos de coelhos *in vivo* para então avaliar a resposta biológica (LEE; HWANG; LIM, 2017). O teste Draize está descrito pela OECD como teste 405.

O Teste Draize foi descrito em 1944 em um manuscrito intitulado “Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes”, ou seja, “Métodos para o estudo da irritação e toxicidade de substâncias aplicadas topicamente à pele e mucosas” e publicado no Journal of Pharmacology and Experimental Therapy (PRINSEN et al., 2017).

Em 1961, a US-FDA adotou o teste Draize como método de avaliação para risco de exposição ocular e em 1964 publicou um guia intitulado “Illustrated Guide for Grading Eye Irritation by Hazardous Substances” (PRINSEN et al., 2017). Em 1981 a OECD publicou sua primeira diretriz sobre irritação ocular, chamado de teste TG 405 “Acute Eye Irritation/Corrosion”, este foi atualizado em 1987, 2002 e 2012 (OECD, 2017<sup>1</sup>). As revisões do TG 405 não trouxeram alterações no procedimento de exposição, e sim orientações para aperfeiçoar o método, conforme tabela 1 (PRINSEN et al., 2017).

Tabela 1- Diretriz de teste da OCDE no. 405 e suas revisões (procedimentos, resultados de interpretação, ética e 3 R's)

OECD TG 405	Procedimento	Orientação na interpretação dos resultados	Considerações éticas	Três R's
<b>1981</b>	- 0,1 mL ou 0,1 g de substância; - lavar apenas após 24 h	- A extrapolação dos resultados dos estudos de irritação ocular em animais para o homem é válida apenas em um grau limitado. O coelho albino é mais sensível que o homem a irritantes oculares ou corrosivos na maioria dos casos. - Resultados semelhantes em testes com outras espécies animais podem dar mais peso à extrapolação dos estudos com animais para o homem. - Deve-se tomar cuidado na interpretação dos dados para excluir irritações resultantes de infecção secundária	Anestésicos locais propostos	- Três em vez de seis coelhos Nenhum teste de: - Substâncias fortemente ácidas ou alcalinas - Irritantes corrosivos ou graves da pele
<b>1987</b>	- 0,1 mL ou 0,1 g de substância; - lavar apenas após 24 h	Idêntica à orientação de 1981	Adição de: - Os animais que mostram sinais severos e duradouros de angústia e dor podem precisar ser mortos humanamente.	Adição de: - irritantes oculares graves identificados em estudos alternativos bem validados
<b>2002</b>	- 0,1 mL ou 0,1 g de substância; - lavar após 1 h (sólidos)	Semelhante às orientações de 1981 e 1987	Adição de: - Pontos finais para sacrifício humano - Teste em camadas	Adição de: - Análise do peso da evidência nos dados relevantes existentes - Realização de testes <i>in vitro</i> validados e aceitos; - Um coelho primeiro
<b>2012</b>	- 0,1 mL ou 0,1 g de substância; - lavar após 1 h (sólidos)	Semelhante às orientações de 1981, 1987 e 2002	Adição de: - Instruções abrangentes para o uso de anestésicos tópicos e analgésicos sistêmicos	Adição de: - teste ICE (OCDE 438) - teste BCOP (OCDE 437)

Fonte: Adaptado de Prinsen et al. (2017)

Em 1980, Henry Spira publicou no New York Times um anúncio que dizia “Quantos coelhos Revlon cega para o bem da beleza?”. Henry é membro e fundador do grupo “Animal Rights International group” e sua publicação fez com que o público conhecesse mais sobre o teste, deixando a necessidade da criação de testes alternativos mais nítida. Isso fez com que a Revlon e outras indústrias como Avon, Chanel e Mary Kay fizessem doações em prol do desenvolvimento de métodos alternativos a partir das quais criou-se o “Centre for Alternatives to Animal Testing”, ou seja, centro de Alternativas para Testes em Animais (PRINSEN et al., 2017).

O teste Draize descrito no TG 405 da OECD segue o seguinte procedimento: Em coelhos albinos, uma substância teste que pode ser sólida, líquida ou aerossol, é aplicada em dose única no saco conjuntival de um dos olhos de cada animal, o outro olho não recebe o tratamento e será utilizado como controle (iLibrary, 2017). Previamente a exposição à substância teste, os animais selecionados recebem anestésicos gerais e locais, a aplicação se faz no saco conjuntival puxando a pálpebra inferior de um dos olhos e posteriormente mantendo as pálpebras juntas por alguns segundo para evitar a perda do material. Os animais são observados e avaliados em 1, 24, 48 e 72 horas, 7, 14 e 21 dias (OECD<sup>1</sup>, 2017). Os parâmetros avaliados são os graus de reação ocular da conjuntiva, córnea e íris e as avaliações levam em consideração um conjunto entre a gravidade e natureza, além de sua reversibilidade ou a falta dela (iLibrary, 2017). Os padrões avaliados geram uma pontuação, as observações são macroscópicas, por isso não há boa reprodutibilidade interlaboratorial (TAKAHASHI et al., 2008). Os padrões avaliados estão descritos na tabela 2.

Com base na pontuação agregada a substância é possível classificar ela em não irritante, moderadamente irritante e severamente irritante. Porém, inicialmente, as classificações variavam entre os países e, apesar de serem parecidas entre si, algumas substâncias receberam classificações, rótulos e dados diferentes (WILSON; AHEARNE; HOPKINSON, 2015). Historicamente, o potencial de irritação ocular era resumido como o "Maximum Average Score" (MAS), ou seja, a pontuação máxima média que era obtida pela média das pontuações máximas de animais individuais (HUHTALA et al., 2008). Isso fez com que fosse desenvolvido um padrão de

classificação pela GHS, na qual as substâncias foram classificadas em Categoria 1, Categoria 2 A/B e Sem categoria.

Tabela 2- Classificação das lesões oculares.

<b>Córnea</b>	
<b>Pontuação</b>	
Opacidade: grau de densidade (as leituras devem ser feitas na área mais densa) *	
Sem ulceração ou opacidade .....	0
Áreas de opacidade dispersas ou difusas (exceto um ligeiro embotamento do brilho normal); detalhes da íris claramente visíveis .....	1
Área translúcida facilmente discernível; detalhes da íris ligeiramente obscurecidos .....	2
Área nacrosa; nenhum detalhe da íris visível; tamanho da pupila quase imperceptível .....	3
Córnea opaca; íris não discernível através da opacidade .....	4
Máximo possível: 4	
* A área de opacidade da córnea deve ser observada	
<b>Íris</b>	<b>Pontuação</b>
Normal .....	0
Rugas marcadas e profundas, congestão, inchaço, hiperemia circuncínea moderada; ou injeção; íris reativa à luz (uma reação lenta é considerada um efeito).....	1
Hemorragia, destruição grosseira ou nenhuma reação à luz .....	2
Máximo possível: 2	
<b>Conjuntiva</b>	<b>Pontuação</b>
Vermelhidão (refere-se às conjuntivas palpebral e bulbar; excluindo córnea e íris)	
Normal .....	0
Alguns vasos sanguíneos hiperêmicos (injetados) .....	1
Cor difusa, carmesim; embarcações individuais que não são facilmente discerníveis .....	2
Músculo difuso vermelho .....	3
Máximo possível:3	
<b>Quemose</b>	<b>Pontuação</b>
Inchaço (refere-se a tampas e / ou membranas nictantes)	
Normal .....	0
Algum inchaço acima do normal .....	1
Inchaço óbvio, com eversão parcial das pálpebras .....	2
Inchaço, com tampas quase fechadas .....	3
Inchaço, com tampas mais da metade fechadas .....	4
Máximo possível: 4	

Fonte: Adaptado de OECD (2017<sup>1</sup>)

Quando a substância gera um dano sério irreversível por até 21 dias ao olho são classificadas como Categoria 1. Enquadra-se em dano sério as lesões teciduais oculares graves ou a deterioração física séria da visão. Substâncias que causam irritação ocular onde as alterações são reversíveis em 21 dias são classificadas em Categoria 2, que é subdividida em Categoria 2A (reversíveis em até 21 dias) e Categoria 2B (reversíveis em até 7 dias). Os produtos que não geram danos oculares ou irritação ocular são classificados como “sem categoria” (WILSON; AHEARNE; HOPKINSON, 2015; OECD, 2017<sup>2</sup>).

Apesar de seguir a classificação proposta pela GHS, o teste Draize vem sendo muito criticado nos últimos anos devido a sua baixa reprodutibilidade, por superestimar os efeitos das substâncias e por ser um método que faz uso de animais vivos (MAURER; PARKER; JESTER, 2002). A extensão e profundidade da lesão irão refletir em sua gravidade, logo, a capacidade de penetração da substância e a espessura da epiderme da córnea devem ser levadas em consideração, o que levanta mais uma discussão quanto aos dados obtidos no teste Draize, uma vez que o olho do coelho é anatomicamente diferente do olho humano em vários aspectos. A espessura da córnea de coelhos é de 0,37 mm e a do homem de 0,51 mm, o pH das lágrimas dos coelhos é 8 e de humanos é 7, isso influencia na capacidade do tampão, o mecanismo de lacrimejamento e o processo de piscar é menos eficaz nos coelhos (BOSSHARD, 1985). Além disso, os coelhos possuem uma membrana nictitante (dobra na conjuntiva que forma uma terceira pálpebra) e uma área superficial da córnea maior que a dos humanos e sem a camada de Bowman (WILHELMUS, 2001).

Há mais de 40 anos o protocolo de irritação ocular permanece inalterado, não existe praticamente nenhum outro campo da ciência onde os protocolos experimentais permaneçam o mesmo por tanto tempo. Isso fez com que diversas tentativas de métodos alternativos ao teste Draize fossem desenvolvidas, em comparação com os outros testes *in vivo*, o teste Draize foi o que recebeu maior foco destas metodologias (WILSON; AHEARNE; HOPKINSON, 2015).

### 2.3.2 Testes alternativos oculares

Nenhum teste alternativo *in vitro* é capaz de substituir totalmente o teste *in vivo* Draize e assim como ele, ser capaz de prever todas respostas graves de dano ocular (OECD, 2017<sup>2</sup>). Os modelos alternativos também não são aprovados para distinguir irritantes leves e moderados. Para avaliar todas as classes de químicos em todos os possíveis efeitos de irritação é necessário combinar vários ensaios *in vitro* (DHOLAKIYA; A BARILE, 2013). Durante a associação de mais de um tipo de teste alternativo é possível substituir totalmente o teste Draize (OECD, 2017<sup>2</sup>). A busca por mais opções alternativas e pelo aperfeiçoamento das metodologias já existentes se fez maior porque na União Europeia tornou-se obrigatória desde 2009 a adoção de metodologia alternativa *in vitro* para o teste de irritação ocular para cosméticos a partir da implementação do Regulamento (CE) nº 1223/2009 (WILSON; AHEARNE; HOPKINSON, 2015).

Vários métodos *in vitro* foram desenvolvidos depois de 2009 para identificar produtos que entrem na classificação da UN GHS como “Categoria 1” e “Sem categoria”. Em uma exposição ocular por alguma substância irritante, primeiramente ocorre a destruição do filme lacrimal e a função da barreira epitelial do olho, depois há morte celular deste epitélio e então degeneração estromal, morte endotelial e opacidade da córnea. Os testes *in vitro* falham ao não considerarem a produção deste filme lacrimal, que, em uma exposição real ao olho, age como uma forma de proteção, logo, algumas substâncias podem ser resultado falso positivo para irritação ou corrosão ocular. Além disso, as opções *in vitro* não avaliam os efeitos da íris diretamente e não avaliam a toxicidade sistêmica associada a esta exposição ocular, apesar de que sabe-se que o primeiro efeito resultado da exposição não ocorrerá na íris e que existem outros modelos de avaliação sistêmica disponíveis, são falhas que devem ser levadas em consideração. Mas, de acordo com o protocolo OECD TG 405 é muito importante que as substâncias sejam previamente testadas por metodologias *in vitro* antes de chegarem nos testes *in vivo* (OECD, 2017<sup>2</sup>).

Em Julho de 2017 foi publicada o “Guidance document on an integrated approach on testing and assessment (IATA) for serious eye damage and eye irritation”, ou seja, um documento com orientações sobre uma abordagem integrada

de testes de avaliação para danos oculares graves e irritação dos olhos. Este documento traz, entre outras informações, dados sobre testes de irritação ocular *in vivo* e *in vitro*. Os testes *in vitro* adotados pela OECD para avaliação de lesão ocular grave e irritação ocular são: OECD TG 437 (teste BCOP), OECD TG 438 (teste ICE), OECD TG 491 (teste STE), OECD TG 492 (teste RhCE) e OECD TG 460 (teste FL) (OECD, 2017<sup>2</sup>).

De acordo com o que está descrito na IATA, há diferentes caminhos para classificar adequadamente substâncias quanto a sua capacidade de gerar ou não dano ocular. Antes de optar pelos métodos disponíveis, é necessário realizar um WoE (Weight of Evidence), ou seja, avaliar todas as informações já existentes como métodos *in vitro* ou *in vivo* já realizados cujo resultado esteja disponível, avaliar as características das substâncias, parâmetros físico-químicos como pH, características ácido/base e os dados em humanos, levando sempre em consideração a relevância científica destes dados. Essas informações podem ou não ser o suficiente para classificar a substância, caso não sejam deve-se prosseguir com os ensaios.

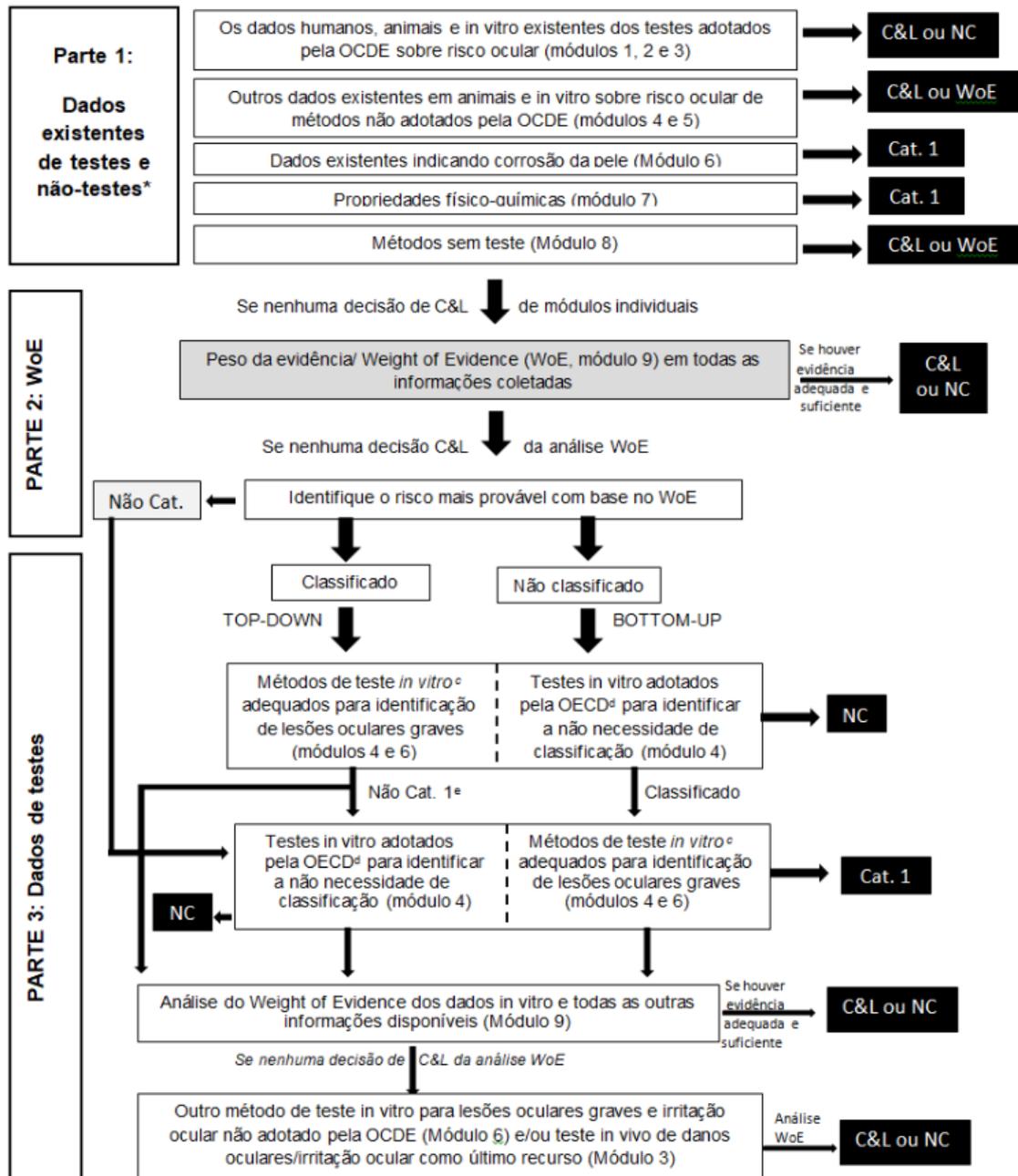
As informações da WoE podem identificar o risco mais provável que esta substância pode representar, se esse risco for alto para danos oculares é adotada uma sequência de ensaios “Top-down” que irá iniciar com um método *in vitro* adequados para identificar lesões oculares graves, se o resultado for positivo ele é classificado como “Categoria 1”, se for negativo outro teste que avalie lesões oculares graves é executado, desde que com outro parâmetro de avaliação, assim evita-se um falso negativo. Se o resultado for negativo no segundo método, o próximo passo é escolher uma metodologia *in vitro* adequada para identificar substâncias que não causam irritação ocular. Se o resultado for positivo ele é confirmado por outra metodologia para este mesmo fim e, se essa também for positiva, a substância é classificada como “Sem categoria”. Caso estes testes não sejam o suficiente para classificar a substância, deve-se realizar novamente uma WoE e escolher outras metodologias *in vitro* não descritas pela OECD ou métodos *in vivo*. Mas, se a primeira WoE demonstrar que provavelmente há um baixo risco para dano ocular, é adotada uma sequência de ensaios “Bottom-up”, que segue a mesma linha de raciocínio que a “top-down”, a diferença é que primeiro são realizados os

ensaios capazes de classificar substâncias não irritantes e depois os ensaios para substâncias que causem lesões graves, conforme figura 2 (OECD, 2017<sup>2</sup>).

O teste BCOP, descrito pela OECD como TG 437, é capaz de classificar substâncias e misturas de acordo com a UN GHS em “Categoria 1” quando a substância for muito irritante e “Sem categoria” quando a substância for considerada não irritante ocular. Este teste foi descrito pela ICCVAM junto com a ECVAM e JaCVAM em 2006 e 2010. A metodologia é baseada em um modelo organotípico que faz uso de córneas isoladas de bovinos recém abatidos destinados para o consumo humano. A avaliação é feita analisando de maneira quantitativa as alterações que ocorrem após a exposição à substância teste. Os parâmetros avaliados são a opacidade e permeabilidade da córnea a partir da análise da quantidade de luz que é transmitida através da córnea usando um opacitômetro e da quantidade de fluoresceína de sódio que passa pela córnea medida por espectrofotometria de luz visível, respectivamente. Após a análise é calculado o *In Vitro* Irritancy Score (IVIS), ou seja, a pontuação de irritabilidade *in vitro* que é utilizada para categorizar as substâncias onde,  $IVIS \leq 3$  é classificado com “sem categoria”,  $IVIS > 55$  “Categoria 1” e caso fique na faixa de  $3 < IVIS \leq 55$  nenhuma predição poderá ser feita (OECD, 2017<sup>3</sup>).

O teste ICE, descrito pela OECD como TG 438, assim como o teste BCOP, ele é capaz de classificar as substâncias de acordo com a UN GHS em “Categoria 1” e “sem categoria”. A metodologia faz uso de um modelo organotípico com olhos de galinha provenientes de matadouros destinadas ao consumo humano. Após a exposição às substâncias teste, são avaliados 4 parâmetros: a opacidade da córnea, a capacidade de retenção da fluoresceína pelo epitélio (se houver retenção há dano epitelial), medição quantitativa do aumento do epitélio para verificar se houve inchaço e avaliação macroscópica do dano morfológico. Os parâmetros avaliados geram uma pontuação de I a IV que são relacionadas a classificação da UN GHS (OECD, 2018<sup>1</sup>) Tanto o BCOP quanto o ICE não podem ser usados para avaliar a reversibilidade das lesões e não podem testar gases e aerossóis (OECD, 2017<sup>2</sup>).

Figura 2- IATA detalhada para lesões oculares graves e irritação ocular



Fonte: OECD (2017<sup>2</sup>).

O teste FL, descrito pela OECD como TG 460 é capaz de classificar as substâncias teste de acordo com sua capacidade de irritação e corrosão ocular, seguindo a classificação da UN GHS, em “Categoria 1”. Apenas substâncias solúveis em água podem ser testadas. A metodologia é realizada com células de rim de cães, as MDCK (MadinDarby Canine Kidney), elas são plaqueadas, expostas às

substâncias teste e sua viabilidade é mensurada a partir permeabilidade da fluoresceína de sódio através de sua monocamada epitelial. O ponto de corte é o  $FL_{20}$  e a substância é considerada como “Categoria 1” quando  $FL_{20} \leq 100$  (OECD, 2017<sup>4</sup>).

O teste STE está descrito na OECD como TG 491, ele é capaz de classificar as substâncias em “Categoria 1” ou “Sem categoria”. A metodologia faz uso de células de córnea de coelho, a exposição às substâncias teste é feita durante 5 minutos e a viabilidade celular é mensurada pelo ensaio MTT (OECD, 2018<sup>2</sup>). Já o teste RhCE, descrito pela OECD como TG 492 é capaz de classificar substâncias que não causam irritação ocular de acordo com UN GHS como “sem categoria”. Esta metodologia faz uso de um epitélio reconstituído de córnea humana, com função de mimetizar a córnea humana e suas características bioquímicas, fisiológicas, morfológicas e histológicas. A estimativa de viabilidade celular também é observada pelo ensaio MTT (OECD, 2019<sup>1</sup>). Todos ensaios *in vitro* descritos na IATA possuem suas limitações, pontos positivos e negativos, estes estão descritos no quadro 1.

Outra metodologia *in vitro* para avaliação ocular é a EIT, foi descrita pela OECD em Junho de 2019 como TG 494, faz uso de olhos de Vitrigel e é capaz de classificar as substâncias em “Sem categoria”. Sua metodologia faz uso das células hCE de epitélio de córnea humana fabricadas em uma câmara de membrana de colágeno vitrigel e é baseada na capacidade da substância em danificar a função de barreira deste epitélio, uma característica muito relevante durante o dano ocular. A avaliação é feita a partir dos valores do tempo dos valores da resistência elétrica transepitelial (TEER) após 3 minutos de exposição às substâncias teste. Uma vantagem desta metodologia é que ela permite o teste de substâncias com características como  $Ph > 5,0$ , substâncias altamente voláteis, substâncias que reagem ou absorvem a luz no mesmo comprimento de onda que os produtos provenientes da reação com o MTT (OECD, 2019<sup>2</sup>).

Quadro 1- Uso regulatório, aplicabilidade, limitações e desempenho dos métodos adotados pela OECD de teste *in vitro* para identificação de perigos para os olhos.

	BCOP (OECD TG 438)	ICE (OECD TG 438)	STE (OECD TG 491)	RhCE (OECD TG 492)	FL (OECD TG 460)
<b>Identificação da categoria 1 do GHS da ONU</b>					
<b>Aplicação</b>	Substâncias e misturas	Substâncias e misturas	Substâncias, substâncias multiconstituintes e misturas dissolvidas ou suspensas uniformemente por pelo menos 5 minutos	Não aplicável	Substâncias e misturas solúveis em água
<b>Limitações</b>	Álcoois e cetonas correm risco de excesso de previsão	Risco de super previsão de álcoois	Nenhuma outra limitação específica relatada	Não aplicável	Ácidos e bases fortes, fixadores celulares, produtos químicos de teste altamente voláteis, produtos químicos de teste coloridos e viscosos, produtos químicos sólidos suspensos em líquido que tendem a precipitar
<b>Acurácia</b>	79% (150/191)	86% (120/140)	83% (104/125)	Não aplicável	77% (117/151)
<b>Taxa de falsos positivos (especificidade)</b>	25% (32/126)	6% (7/113)	1% (1/86)	Não aplicável	7% (7/103)
<b>Taxa de falsos negativos (sensibilidade)</b>	14% (9/65)	48% (13/27)	51% (20/39)	Não aplicável	56% (27/48)
<b>Identificação de Sem categoria do GHS da ONU</b>					
<b>Aplicação</b>	Substâncias e misturas	Substâncias e misturas	Substâncias, substâncias multiconstituintes e misturas dissolvidas ou suspensas uniformemente por pelo menos 5 minutos	Substâncias e misturas. Os produtos químicos de teste que interferem na medição do MTT (por exemplo, interferência na cor ou redução do MTT) requerem o uso de controles apropriados ou análise de HPLC-UPLC se for relatada incompatibilidade de cores com o MTT superior a 80%	Não aplicável
<b>Limitações</b>	Devido às altas taxas de falsos positivos, o BCOP não deve ser o método de primeira escolha para iniciar uma abordagem Bottom-up	As tintas que contêm solventes orgânicos antiincrustantes podem estar subestimadas. Para materiais sólidos que levam a um GHS No Cat. Como resultado, uma segunda execução de teste é recomendada	Substâncias altamente voláteis com pressão de vapor > 6 kPa (a 25°C). Produtos químicos sólidos (substâncias e misturas), exceto surfactantes e misturas de surfactantes. Misturas que contenham substâncias com pressão de vapor > 6kPa podem arriscar sub-previsões	-	Não aplicável
<b>Precisão</b>	69% (135/196)	82% (125/152)	90% (92/102)	80% (n=112)	Não aplicável
<b>Taxa de falsos positivos (especificidades)</b>	69% (61/89)	33% (26/79)	19% (9/48)	37% (n=55)	Não aplicável
<b>Taxa de falsos negativos (sensibilidade)</b>	0% (0/107)	1% (1/73)	2% (1/54)	4% (n=57)	Não aplicável

Fonte: Adaptado de OECD (2017<sup>2</sup>).

Além dos métodos *in vitro* descritos pela OECD, existem outros que também propõe avaliar a irritação e corrosão ocular de químicos. Alguns visam classificar em “Categoria 1” e “Sem categoria”, e outros vem com a proposta de avaliar também irritantes moderados e leves pertencentes a “Categoria 2 A/B” como é o caso do “EpiOcular time-toxicity (ET50) assay”, “Chorio-Allantoic Membrane Vascular Assay (CAMVA)”, “3D hemi-cornea” e outros. Mas, até a publicação desta IATA eles ainda não haviam sido validados pela OECD (OECD, 2017<sup>2</sup>). No Brasil, o CONCEA reconhece como testes alternativos para irritação e corrosão ocular o TG 491 (teste STE), TG 492 (teste RhCE) (CONCEA, 2016).

## 2.4 TESTE STE

O teste STE (Short Time Exposure) é uma metodologia *in vitro* destinada a análise e classificação de substâncias quanto ao seu dano ocular. Foi descrita pela Kao Corporation em 2008, os autores Takahashi et al. também publicaram outros estudos sobre o tema em 2009, 2010 e 2011. Dois estudos de validação foram realizados para o método, um pela JSAAE em 2011 e outro pela JaCVAM em 2013. Também em 2013 o ICCVAM e NICEATM publicaram uma revisão dos estudos de validação (OECD, 2018<sup>2</sup>). A OECD incluiu este teste em sua guideline como TG 491 em 2015 (OECD, 2017<sup>2</sup>). É um teste de citotoxicidade que utiliza células SIRC (Statens Seruminstitut Rabbit Cornea), células derivadas de córnea de coelho ATCC- CCL 60. A linhagem SIRC foi obtida na Dinamarca a partir da córnea de um coelho *Oryctolagus cuniculus*, conhecido como coelho europeu, em 1957 por M. Volkert da Staatens Seruminstitut. Ela deve ser cultivada em meio MEM (Eagle's minimum essential medium), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), sua renovação média é de 2 vezes por semana (OECD, 2017<sup>2</sup>; ATCC, 2019).

O teste STE usa viabilidade celular como seu método de avaliação, mas diferente de outros testes de citotoxicidade *in vitro*, considera um tempo de exposição de 5 minutos (ABO et al., 2018). Durante uma exposição real de uma substância ao olho humano sabe-se que nos primeiros 1-2 minutos 90% do material será excretado e nos coelhos 80% será excretado de 3-4 minutos, logo um tempo curto de exposição *in vitro* é capaz de representar o que acontece *in vivo*. O teste trouxe em sua proposta vantagens sobre as outras metodologias *in vitro*, como o tempo de execução, custo e simplicidade. E quando comparado a metodologias de citotoxicidade trouxe a vantagem de ter três opções de solvente disponíveis, o soro fisiológico, soro fisiológico com 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) ou óleo mineral, enquanto as outras metodologias utilizam apenas a opção do meio de cultura como solvente, fazendo com que substâncias insolúveis em água fossem excluídas do teste (TAKAHASHI et al., 2008).

Quadro 2- Lista de substâncias para proficiência.

Substância	CASRN	Classe química <sup>1</sup>	Estado físico	Categoria <i>in vivo</i> UN GHS <sup>2</sup>	Solvente no teste STE	Categoria STE UN GHS
Cloreto de benzalconio (10%, aquoso)	8001-54-5	Composto de ônio	Líquido	Categoria 1	Salina	Categoria 1
Triton X-100 (100%)	9002-93-1	Éter	Líquido	Categoria 1	Salina	Categoria 1
Ácido vermelho 92	18472-87-2	Composto heterocíclico; Composto de bromo; Composto de Cloro	Sólido	Categoria 1	Salina	Categoria 1
Hidróxido de sódio	1310-73-2	Álcali; Químico inorgânico	Sólido	Categoria 1 <sup>3</sup>	Salina	Categoria 1
Butirolactona	96-48-0	Lactona; Composto heterocíclico	Líquido	Categoria 2A	Salina	Nenhuma predição pode ser feita
1-Octanol	111-87-5	Álcool	Líquido	Categoria 2A/B <sup>4</sup>	Óleo mineral	Nenhuma predição pode ser feita
Ciclopentanol	96-41-3	Álcool; Hidrocarboneto, cíclico	Líquido	Categoria 2A/B <sup>5</sup>	Salina	Nenhuma predição pode ser feita
Acetato de 2-etoxietil	111-15-9	Álcool; Éter	Líquido	Sem categoria	Salina	Sem categoria
Dodecano	112-40-3	Hidrocarboneto, acíclico	Líquido	Sem categoria	Óleo mineral	Sem categoria
Metil isobutil cetona	108-10-1	Cetona	Líquido	Sem categoria	Óleo mineral	Sem categoria
Sulfato de n,n dimetilguanidina	598-65-2	Amida; Composto de enxofre	Sólido	Sem categoria	Salina	Sem categoria

Abreviações: CAS RN= Chemical Abstracts Service Registry Number

<sup>1</sup> Classes químicas: As classes de produtos químicos foram atribuídas usando informações obtidas de publicações anteriores do NICEATM e, se não estiverem disponíveis, usando o Medical Subject Headings (MeSH®) da National Library of Medicine (via ChemIDplus® [National Library of Medicine], disponível em <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>) e determinações de estrutura feitas pelo NICEATM.<sup>2</sup> Baseado nos resultados do teste do olho de coelho *in vivo* (OECD TG 405) e usando UN GHS,

[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev05/05files\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html).<sup>3</sup> A classificação como Cat.1 é baseada no potencial corrosivo da pele de 100% de hidróxido de sódio (listado como um produto

Quadro 2- Lista de substâncias para proficiência (continuação)

químico de proficiência com potencial corrosivo para a pele na OECD TG 435) e o critério para a categoria 1 do UN GHS.<sup>4</sup> A classificação como 2A ou 2B depende da interpretação do critério UN GHS para distinguir entre essas duas categorias, ou seja, 2 de 6 vs 4 de 6 animais com efeitos no dia 7 necessários para gerar uma classificação de Categoria 2A. O conjunto de dados *in vivo* incluiu 2 estudos com 3 animais cada. Em um estudo, dois de três animais apresentaram efeitos no dia 7 garantindo uma categoria de classificação 2A, enquanto que no segundo estudo todos os endpoints nos três animais recuperaram a uma pontuação de zero no dia 7 garantindo uma categoria de classificação 2B.<sup>5</sup> A classificação como 2A ou 2B depende da interpretação do critério do UN GHS para distinguir entre essas duas categorias, ou seja, 1 de 3 vs 2 de 3 animais com efeitos no dia 7 necessários para gerar uma classificação de Categoria 2A. O estudo *in vivo* incluiu 3 animais. Todos os extremos para além da opacidade da córnea e vermelhidão da conjuntiva num animal recuperaram para uma pontuação de zero no dia 7 ou anterior. O animal que não se recuperou totalmente no dia 7 teve um escore de opacidade corneal de 1 e uma vermelhidão conjuntiva de 1 (no dia 7) que se recuperou totalmente no dia 14.

Fonte: Adaptado de OECD (2018<sup>2</sup>).

O teste STE faz uso da classificação da GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) sendo capaz de classificar substâncias em Categoria 1 e Sem categoria (ABO et al., 2018). O TG 491 descreve todas as etapas de análise do teste STE, desde a cultura celular até a análise de dados e substâncias de proficiência que estão descritas no quadro 2. As células SIRC são testadas frente a duas concentrações de cada substância (5% e 0,05%) e sua viabilidade celular comparada aos solventes controles é utilizada para estimar o potencial de irritação ocular e então classificar em Categoria 1 ou Sem categoria. Para ser classificado como Categoria 1 ambas concentrações devem estar menores ou iguais ( $\leq$ ) 70%, já para ser classificado como Sem categoria ambas concentrações devem estar maiores que ( $>$ ) 70% de viabilidade celular, conforme quadro 3 (OECD, 2017<sup>2</sup>; OECD, 2018<sup>2</sup>).

O método de avaliação da viabilidade celular utilizado no teste STE é o MTT (OECD, 2018<sup>2</sup>). A disfunção da mitocôndria é uma forma de avaliar a integridade celular. Um dos principais indicadores da função da mitocôndria é a atividade das desidrogenases dependentes de NAD (piruvato desidrogenase e três desidrogenases do ciclo do ácido tricarboxílico). Essas desidrogenases em condições ideais irão reduzir o MTT (3 (4,5dimetiltiazol2il) 2,5 brometo de difeniltetrazólio) gerando compostos formazan que absorvem fortemente na faixa visível do espectro (SURIN et al., 2017).

O STE faz parte da IATA para irritação e corrosão ocular e pode ser utilizado como parte de um planejamento estratégico para substituição do teste *in vivo* Draize (OECD, 2017<sup>2</sup>). Sendo, então, sua proficiência de grande importância.

Quadro 3- Classificação das substâncias-teste pelo método STE

Viabilidade celular		Classificação UM GHS	Aplicação
5,0%	0,05%		
> 70%	> 70%	Sem categoria	Substâncias e misturas, com a exceção de: Substâncias altamente voláteis com pressão de vapor maior que 6kPa <sup>1</sup> e Químicos sólidos (substâncias e misturas) outros que não sejam surfactantes e misturas compostas apenas por surfactantes.
≤70%	> 70%	Nenhuma predição pode ser feita	Não aplicável
≤70%	≤70%	Categoria 1	Substâncias e misturas <sup>2</sup>

<sup>1</sup> As misturas que contêm substâncias com pressão de vapor superior a 6kPa devem ser avaliadas com cuidado para evitar possíveis sub-previsões, e devem ser justificadas caso a caso.<sup>2</sup> Com base nos resultados obtidos principalmente com substâncias monoconstituíntes, embora também exista uma quantidade limitada de dados sobre o ensaio de misturas. O método de ensaio é, no entanto, tecnicamente aplicável ao ensaio de substâncias e misturas multiconstituíntes. Antes de usar esta Diretriz de Teste em uma mistura para gerar dados para uma finalidade regulatória pretendida, deve-se considerar se, e em caso afirmativo, por que, ela pode fornecer resultados adequados para essa finalidade. Tais considerações não são necessárias, quando há uma exigência regulamentar para testar a mistura.

Fonte: Adaptado de OECD (2018<sup>2</sup>).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 CULTURA E MANUTENÇÃO CELULAR

A linhagem de córnea SIRC (ATCC® CCL-60™) foi utilizada para a realização do método STE. As células foram mantidas em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> ou 25 cm<sup>2</sup>, contendo meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) inativado, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 10 mM de tampão de ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico] (HEPES), pH 7,2, e mantidas em estufa úmida a 37 °C, com 5% CO<sub>2</sub>. As culturas foram repicadas e expandidas até atingirem 80% de confluência. Os experimentos poderiam ser realizados entre as passagens 03 e 25 e em triplicata, mas todos foram realizados entre as passagens 5 e 13.

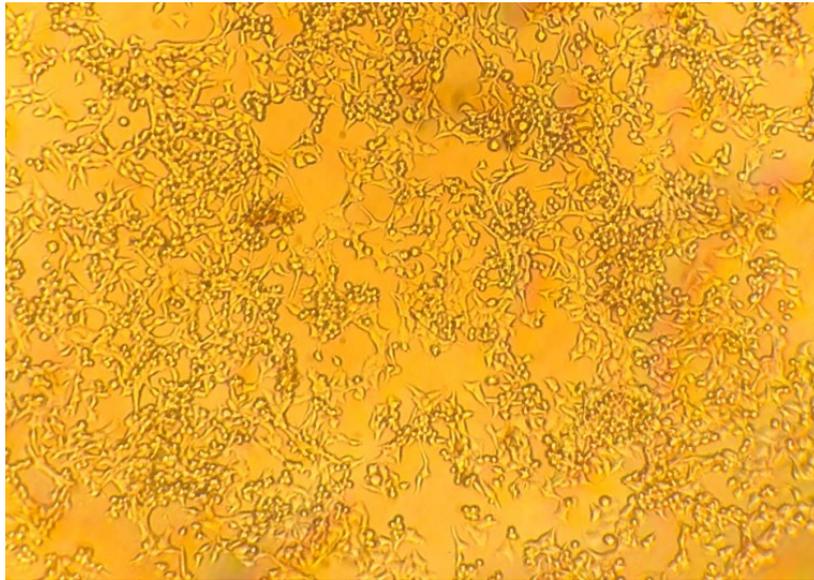
As células possuem a característica que ficam aderidas à garrafa de cultura, quando não estão aderidas elas são arredondadas e ao aderirem ficam alongadas, conforma figura 3. No início de cada repique ou plaqueamento, o meio de cultura foi retirado e adicionado tripsina para que as células que até então estavam aderidas à garrafa ficassem soltas. A tripsina ficou entre 5-10 min em contato com as células e então foi adicionado meio de cultura para cessar a ação da tripsina. A suspensão celular foi centrifugada a 200 x g, por 5 minutos em temperatura ambiente (20-25 °C). O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular ressuspenso em 1,0 ml de meio de cultura. O número de células viáveis foi avaliado pelo método de exclusão do corante Azul de Trypan (0,4%) e foram utilizadas para os experimentos somente as amostras com viabilidade celular superior a 90%.

#### 3.2 DEMONSTRAÇÃO DE PROFICIÊNCIA

O quadro 2 contém as 11 substâncias de proficiência que devem ser avaliadas no teste STE. Estas substâncias são divididas em “Categoria 1”, “Sem Categoria” e “Nenhuma predição pode ser feita”. Das 11 substâncias de proficiência, 5 foram testadas no presente trabalho. Foram testados o Hidróxido de sódio e Triton x-100 pertencentes a classificação UN GHS “Categoria 1”, da classificação UN GHS

“Sem Categoria” foi testado o Metil Isobutil Cetona e incluídos na classificação de “Nenhuma predição pode ser feita” foram testados o 1-Octanol e Butirolactona. O Hidróxido de sódio, Triton x-100 e Butirolactona foram diluídos em solução de soro fisiológico 0,9% produzido no laboratório a partir de NaCl PA e água destilada. O 1-Octanol e butirolactona foram diluídos em óleo mineral. Todas as substâncias foram preparadas antes do ensaio em duas concentrações, 5% e 0,05%.

Figura  
SIRC  
em cultura.



3- Células  
aderidas

Fonte: Elaborado pela autora deste trabalho (2019)

### 3.3 TESTE *IN VITRO* STE PARA IDENTIFICAÇÃO DE IRRITAÇÃO OCULAR OU DANOS OCULARES GRAVES

Para realização do teste STE, as células SIRC foram tripsinizadas, centrifugadas, ressuspensas e a sua viabilidade foi avaliada em câmara de Neubauer utilizando Azul de Trypan. As células foram contadas e  $6 \times 10^3$  células/poço depositadas em microplacas de 96 poços para tempo de incubação de 4 dias, ou  $3 \times 10^3$  células/poço para incubação de 5 dias. A incubação foi feita em estufa úmida a 37 °C, com 5% CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, o meio de cultura foi retirado e 200 µL das substâncias testes nas duas concentrações (5 e 0,05%) preparadas e

dos controles foi adicionado, em triplicata, por 5 minutos. Foram utilizados 4 controles, o controle positivo utilizado foi o Lauril Sulfato de sódio (SLS) na concentração de 0,01% em soro fisiológico, como controle negativo foi utilizado o meio de cultura RPMI e o controle dos solventes foi feito com o soro fisiológico e óleo mineral.

### 3.4 MEDIDA DA VIABILIDADE CELULAR

Após a exposição às substâncias, as células foram lavadas duas vezes com 200 µl de PBS e em seguida foi adicionado 200 µl de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) na concentração de 0,5 mg de MTT/mL de RPMI. Após 2 horas de incubação a 37 °C (5% CO<sub>2</sub>) protegido da luz, o MTT foi retirado por decantação e 200 µL de 0.04 N-isopropanol de ácido clorídrico foi adicionado para a extração do MTT formazan e incubado por 1 hora protegido da luz. A absorbância da solução de MTT formazan foi mensurada após 1 hora de incubação em leitor de placa em 570 nm. O tampão PBS foi adicionado em triplicata antes da leitura e foi utilizado como branco.

### 3.5 ANÁLISE DE DADOS E MODELO DE PREDIÇÃO

Para validação da placa, 3 critérios de aceitação foram seguidos:

- A densidade óptica (OD) do meio deve ser maior ou igual a 0,3 após subtração do branco
- A viabilidade dos solventes deve ser maior ou igual a 80% relativa ao meio controle
- Viabilidade do controle positivo deve estar entre 21,1% e 62,3%

Os valores da OD de cada produto químico em teste e a OD dos controles foram utilizadas para calcular a viabilidade celular, conforme fórmula 1. O valor de viabilidade celular foi utilizado para classificar a substância conforme o quadro 3. A classificação obtida foi comparada a classificação teórica descrita no quadro 2. Para considerar válido o resultado de classificação, foram realizadas pelo menos 3 repetições independentes do teste e o desvio padrão destas repetições deve ser menor que 15%.

## Fórmula 1- Cálculo de viabilidade celular

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{(OD_{570} \text{ da substância teste}) - (OD_{570} \text{ do branco})}{(OD_{570} \text{ do solvente controle}) - (OD_{570} \text{ do branco})} \times 100$$

Fonte: Adaptado de OECD (2018<sup>2</sup>).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Avanços consideráveis ocorreram nos últimos anos na busca por métodos alternativos ao uso de animais. Várias metodologias *in vitro* foram desenvolvidas e validadas para teste de candidatos a fármacos ou cosméticos. O teste TG OECD 491 é utilizado como parte de uma IATA para irritação e corrosão ocular que visa substituir total ou parcialmente o teste *in vivo* Draize, considerado padrão ouro para este fim. O método *in vitro* STE é baseado na viabilidade de uma cultura celular de córnea de coelho exposta a duas concentrações de certa substância por 5 minutos. A partir dos valores obtidos é possível classificar a substância de acordo com a GHS como “Sem categoria” ou “Categoria 1”, se ela não gerar dados oculares ou gerar danos oculares severos, respectivamente. O método não é capaz de classificar substâncias da Categoria 2A e 2B da GHS, que geram danos oculares moderados e leves. Neste caso elas são categorizadas como “Nenhuma predição pode ser feita” e devem ser analisadas por outras metodologias.

No presente trabalho, realizamos a proficiência intralaboratorial do método STE avaliando 5 substâncias das diferentes categorias (Sem categoria, Categoria 1 e Nenhuma predição pode ser feita) estabelecidas pelo protocolo da OECD. Todos os passos do protocolo validado foram seguidos, porém o meio de cultura utilizado foi substituído de acordo com a disponibilidade de meios de cultura no LAPEO. Num primeiro momento, a cultura celular e as placas teste foram realizadas com meio DMEM, que é uma modificação do meio MEM. As células se adaptaram muito bem ao DMEM, o crescimento e viabilidade apresentavam-se adequadas, porém o meio utilizado não permitiu a validação do controle negativo (meio de cultura com células) com densidade óptica (OD) menor que 0,3. O valor de OD dos poços tratados com o meio de cultura é usado para representar 100% de viabilidade e, a partir dele é calculada a viabilidade dos outros controles.

Após, realizou-se a substituição do meio MEM por RPMI. De acordo com a composição dos dois meios, as principais diferenças são alguns sais inorgânicos e vitaminas, o RPMI possui 3 vitaminas a mais que o MEM (D-biotin, *p*-Aminobenzoic Acid e Vitamin B<sub>12</sub>). Os aminoácidos diferem quanto ao Hydroxy-L-Proline, L-

Histidine e L-Alanine. Foi iniciada cultura com o RPMI, as células se adaptaram ao meio e a OD do meio foi maior que 0,3 e então as placas passaram a ser validadas.

Após validação dos controles, as substâncias passaram a ser avaliadas. O resultado de viabilidade celular de cada concentração das substâncias foi comparado entre as placas independentes e calculada a média e o desvio padrão conforme Quadro 4.

Quadro 4- Resultados de viabilidade celular do teste STE para as substâncias de proficiência e controles.

	Concentração teste	Média viabilidade (%)	Desvio padrão (%)	Classificação GHS
Soro fisiológico	0,9%	94	5	-
Óleo mineral	100%	108	6	-
Lauril sulfato de sódio	0,01%	52	3	Categoria 1
Hidróxido de sódio	5%	35	5	Categoria 1
	0,05%	39	11	
Triton x-100	5%	42	11	Categoria 1
	0,05%	50	9	
1-Octanol	5%	46	6	Categoria 2A/B
	0,05%	102	11	
Butirolactona	5%	57	7	Categoria 2A
	0,05%	96	7	
Metil isobutil cetona	5%	89	11	Sem categoria
	0,05%	84	6	

Fonte: A autora.

Os dados obtidos a partir dos testes das substâncias controle e de proficiência foram validados de acordo com os critérios estabelecidos no protocolo OECD 491. A OD do meio de cultura foi maior que 0,3 após subtração do branco. A viabilidade do soro fisiológico e óleo mineral, que foram utilizados como solventes para as substâncias controle e de proficiência foi maior que 80%. A viabilidade média das três repetições independentes para o controle positivo foi de 52%, de acordo com o valor esperado na faixa de aceitabilidade de 21,1% a 62,3%. As substâncias de proficiência foram validadas, pois de acordo com o preconizado, o

valor de desvio padrão entre as réplicas independentes foi menor que 15%. O controle positivo e as substâncias de proficiência Hidróxido de sódio, Triton x-100 e Butirolactona utilizaram o soro fisiológico como solvente. Enquanto o Metil isobutil cetona e o 1-Octanol utilizaram óleo mineral como solvente.

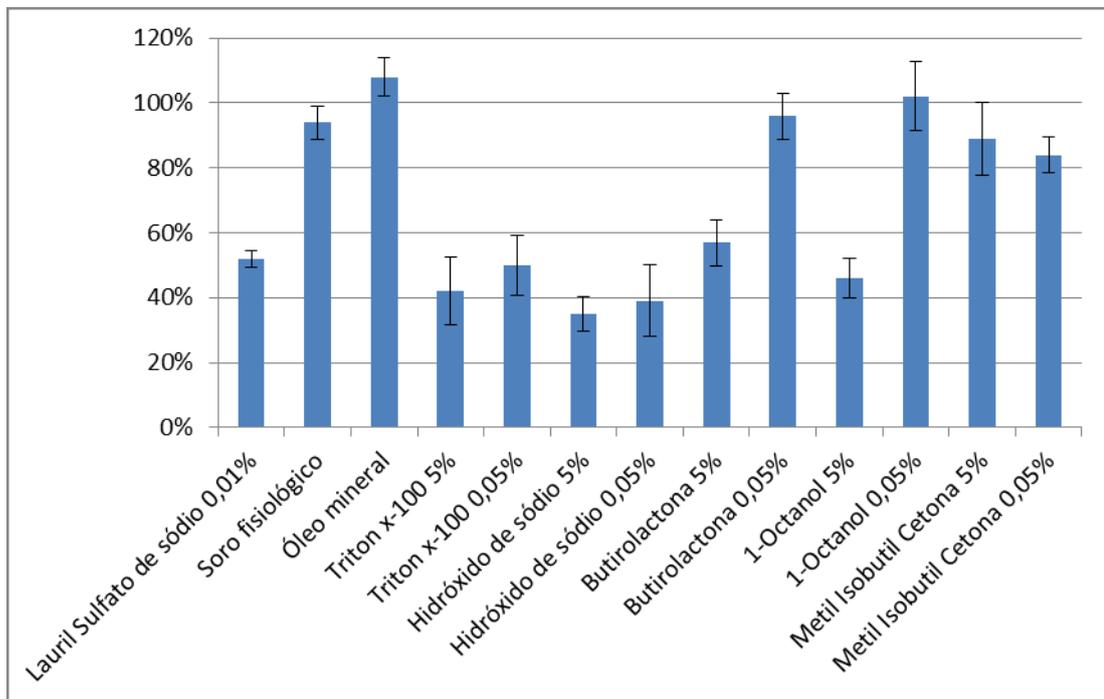
Os valores médios de viabilidade foram usados para classificar as substâncias de acordo com o quadro 3. O metil isobutil cetona foi classificado como UN GHS “Sem Categoria”, a viabilidade em ambas concentrações foi maior que 70%, ou seja, esta substância não gera nenhum dano ocular. O hidróxido de sódio e Triton x-100 foram classificados como UN GHS “Categoria 1”, pois são substâncias altamente irritantes oculares, a viabilidade celular em ambas concentrações foi menor que 70%. O 1-Octanol e Butirolactona tiveram a viabilidade celular menor que 70% na concentração de 5% e maior que 70% na concentração de 0,05%, então são classificados como UM GHS “Nenhuma predição pode ser feita”, esta metodologia não é capaz de classificar essa substância. As classificações encontradas foram iguais as preconizadas, conforme apresentado no quadro 2.

Os testes realizados com butirolactona foram feitos em duplicatas independentes por questão de tempo de estudo, mas o resultado de duas repetições independentes mostraram uma variação muito baixa entre si. As viabilidades e o desvio padrão de cada substância em ambas as concentrações estão representadas no gráfico 1.

No primeiro estudo desenvolvido pela Kao Corporation publicado em 2008 foram testadas 51 substâncias em 3 concentrações e os resultados foram relacionados ao teste Draize. As substâncias foram aplicadas sobre as células nas concentrações 5%, 0,5% e 0,05% e ficaram expostas durante 5 minutos, após isso a viabilidade celular foi mensurada pelo ensaio de MTT e os valores obtidos foram relacionados aos já existentes provenientes do teste Draize em duas concentrações, a 100% (substância pura) e a 10%. A partir dos valores encontrados, foi definido que as duas concentrações estudadas seriam a de 5% e 0,05% pois eram as que mais se relacionavam com as duas concentrações do teste Draize e que a classificação seria feita de acordo com a viabilidade celular obtida destas duas concentrações, com um valor de corte de 70% de viabilidade. A classificação obtida desta maneira teve uma boa correlação com a classificação da UN GHS (TAKAHASHI et al., 2008).

Os demais estudos fizeram comparações entre laboratórios, todos trouxeram uma classificação de pontuações que vai de 1-3 que também é utilizado para a classificação das substâncias. Os valores encontrados são comparados ao UN GHS e ao European Union (EU) classification (TAKAHASHI et al., 2009; TAKAHASHI et al., 2010; TAKAHASHI et al., 2011)

Gráfico 1- Viabilidade e desvio padrão das substâncias de proficiência e solventes.



Fonte: A autora.

No presente trabalho, os resultados obtidos das substâncias de proficiência avaliadas pelo teste STE, demonstraram reprodutibilidade intralaboratorial. Esse é um elemento importante a ser considerado, pois a repetibilidade do teste intralaboratorial e sua reprodutibilidade intra e interlaboratorial verifica o desempenho do mesmo. Como avaliação, deve-se considerar que haja uma revisão das substâncias utilizadas para garantia de segurança e confiabilidade do método, uma discussão sobre até que ponto essas substâncias representam os possíveis resultados das demais substâncias para qual o método foi proposto e, também,

deve-se realizar análises quantitativas e qualitativas da repetibilidade e reprodutibilidade do método intra e interlaboratorial (ICCVAM, 2013).

## 5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os testes toxicológicos já avançaram muito, mas que ainda há muito que ser feito principalmente quando se trata de toxicidade ocular. Nenhuma das metodologias existentes consegue por si só substituir o teste Draize, e mesmo quando combinadas há chances de ter que recorrer ao teste *in vivo*. Existe uma lacuna nas classificações, as metodologias alternativas não são capazes de classificar substâncias pertencentes a UN GHS “Categoria 2A” e “Categoria 2B”. Mesmo assim os testes *in vitro* para irritação e corrosão ocular são de grande utilidade e a tendência é de que os estudos estejam sempre avançando.

No presente trabalho, a cultura celular de SIRC foi bem estabelecida e todos os critérios de validação foram alcançados. Os testes com as 5 substâncias avaliadas para proficiência pelo teste STE foram validados, assim como os controles. Apesar de não ter feito uso do meio de cultura indicado pela OECD, conseguiu-se assegurar a qualidade dos resultados com o meio RPMI que pouco difere do meio MEM. Tanto o controle positivo quanto os veículos (soro fisiológico e óleo mineral) apresentaram resultado de viabilidade esperado. As 5 substâncias testadas atenderam aos critérios de aceitação, obtiveram resultados em placas independentes com menos de 15% de desvio padrão entre os resultados e foram classificadas de maneira correta quando comparado ao que foi estabelecido pelo TG 491.

As demais substâncias serão testadas assim que estiverem disponíveis. Após a proficiência das 11 substâncias, outras poderão ser testadas, incluindo substâncias de uso no laboratório LAPEO ou de outros laboratórios que almejem estes resultados.

## REFERÊNCIAS

- ABO, T. et al. Expansion of the applicability domain for highly volatile substances on the Short Time Exposure test method and the predictive performance in assessing eye irritation potential. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 43, n. 7, p. 407–422, 2018.
- ANDRADE, Antenor; PINTO, Sergio Correia; OLIVEIRA, Rosilene Santos de. **Animais de laboratório criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002. 387 p. Disponível em: <<http://books.scielo.org/id/sfwjtj/pdf/andrade-9788575413869.pdf>>. Acesso em: 05 set. 2019.
- ASCOM. **Métodos alternativos ao uso de animais são aprovados**. 2015. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset\\_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/aprovada-aceitacao-de-metodos-alternativos-ao-uso-de-animais/219201/pop\\_up](http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/aprovada-aceitacao-de-metodos-alternativos-ao-uso-de-animais/219201/pop_up)>. Acesso em: 13 jun. 2019
- ATCC. **SIRC Statens Seruminstitut Rabbit Cornea (ATCC® CCL-60™)**. Disponível em: <<https://www.atcc.org/products/all/CCL-60.aspx#generalinformation>>. Acesso em: 25 set. 2019.
- ÁVILA, Renato Ivan de; VALADARES, Marize Campos. Brazil Moves Toward the Replacement of Animal Experimentation. **Alternatives To Laboratory Animals**, [s.l.], v. 47, n. 2, p.71-81, maio 2019. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/0261192919856806>.
- BERNE, Robert M; LEVY, Matthew N. **Fisiologia**. 6. ed. R: Mosby Elsevier, 2009. 859 p.-Secao-I-Pag.-9.pdf>. Acesso em: 16 jun. 2019.
- BOSSHARD, E.. Review on skin and mucous-membrane irritation tests and their application. **Food And Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 23, n. 2, p.149-154, fev. 1985. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0278-6915\(85\)90007-9](http://dx.doi.org/10.1016/0278-6915(85)90007-9).
- BOTTINI, Annamaria A. et al. Optimisation of the Post-validation Process: The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 67a. **ATLA**, Itália, v. 36, p.353-366, 2008. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/8a9d/9e8632d7247cdfaefa94b37a2865c3cec221.pdf>>. Acesso em: 19 set. 2019.
- CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 289–299, 2004.
- CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE A EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Resolução Normativa Nº 18**. Disponível em: <<https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquiv>>

os/legislacao/resolucoes\_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-18-de-24.09.2014-D.O.U.-de-25.09.2014

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE A EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.

**Resolução Normativa Nº 31.** Disponível em:

<[https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes\\_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-31-de-18.08.2016-D.O.U.-de-19.08.2016-Secao-I-Pag.-04.pdf](https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-31-de-18.08.2016-D.O.U.-de-19.08.2016-Secao-I-Pag.-04.pdf)>. Acesso em: 16 jun. 2019.

COSTA VICTAL, J. et al. Métodos alternativos *in vitro* e *in silico*: métodos auxiliares e substitutivos à experimentação animal. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 7, n. 2, p. 37–57, 2015.

DHOLAKIYA, Sanjay L; A BARILE, Frank. Alternative methods for ocular toxicology testing: validation, applications and troubleshooting. **Expert Opinion On Drug Metabolism & Toxicology**, [s.l.], v. 9, n. 6, p.699-712, 26 mar. 2013. Informa Healthcare. <http://dx.doi.org/10.1517/17425255.2013.783013>.

EURL ECVAM. **EURL ECVAM Status Report on the Development, Validation and Regulatory Acceptance of Alternative Methods and Approaches**. Itália: Joint Research Centre, 2014. 86 p. Disponível em:

<[http://publications.europa.eu/resource/ellar/1acff55b-fff9-4c14-9e2f-013c68ceae74.0001.02/DOC\\_1](http://publications.europa.eu/resource/ellar/1acff55b-fff9-4c14-9e2f-013c68ceae74.0001.02/DOC_1)>. Acesso em: 19 set. 2019.

HUHTALA, A. et. al. Corneal Models for the Toxicity Testing of Drugs and Drug Releasing Materials. **Topics in multifunctional biomaterials & devices**. Cap. 2, p.3-22, 2008. Disponível em

<[https://www oulu.fi/spareparts/ebook\\_topics\\_multifunctional/list\\_of\\_contr.html](https://www oulu.fi/spareparts/ebook_topics_multifunctional/list_of_contr.html)> Acesso em: 20 set. 2019.

INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS. **Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document**. EUA, 2013. Disponível em:

<[https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox\\_docs/ste-srd-niceatm-508.pdf](https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/ste-srd-niceatm-508.pdf)> Acesso em: 13 jun. 2019.

KENDALL, L. V et al. Replacement, Refinement, and Reduction in Animal Studies With Biohazardous Agents. **ILAR Journal**, p. 1–18, 2018.

LEE, M.; HWANG, J. H.; LIM, K. M. Alternatives to *in vivo* Draize rabbit eye and skin irritation tests with a focus on 3D reconstructed human cornea-like epithelium and epidermis models. **Toxicological Research**, v. 33, n. 3, p. 191–203, 2017.

LENZ, W.. A short history of thalidomide embryopathy. **Teratology**, [s.l.], v. 38, n. 3, p.203-215, set. 1988. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/tera.1420380303>.

MAURER, James K. et al. Pathology of Ocular Irritation with Acetone, Cyclohexanol, Paraf uoroaniline, and Formaldehyde in the Rabbit Low-Volume Eye Test.

Toxicologic Pathology, [s.l.], v. 29, n. 2, p.187-199, fev. 2001. SAGE Publications.  
<http://dx.doi.org/10.1080/019262301317052468>.

MAURER, James K.; PARKER, Ron D.; JESTER, James V.. Extent of Initial Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, [s.l.], v. 36, n. 1, p.106-117, ago. 2002. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/rtph.2002.1551>.

MCNAMEE, Pauline et al. A tiered approach to the use of alternatives to animal testing for the safety assessment of cosmetics: Eye irritation. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, [s.l.], v. 54, n. 2, p.197-209, jul. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2009.04.004>.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO. **Normativas do CONCEA: para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica**. Brasília, 2016. Disponível em <<https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/publicacoes/ebook-normativas.pdf>> Acesso em: 11 Junho 2019.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO. **PreMASUL**. 2017. Disponível em: <<https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/ciencia/SEPED/Saude/PreMASUL/PreMASUL.html?searchRef=premasul&tipoBusca=expressaoExata>>. Acesso em: 17 set. 2019.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO. **RENAMA - Rede Nacional de Métodos Alternativos**. 2017. Disponível em: <<https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/ciencia/SEPED/Saude/renama/renama.html?searchRef=renama&tipoBusca=expressaoExata>>. Acesso em: 17 set. 2019.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy. **National Academies Press**. Washington, Dc, p. 18-23. jan. 2007. Disponível em: <<https://www.nap.edu/catalog/11970/toxicity-testing-in-the-21st-century-a-vision-and-a>>. Acesso em: 12 set. 2019.

ORGANIZAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO, ILIBRARY. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4**. França. Disponível em <[https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects\\_20745788](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788)> Acesso em: 11 Junho 2019.

ORGANIZAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO. **Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment** França, 2005. Disponível em: <<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd-gd34.pdf>>. Acesso em: 13 Out. 2019.

ORGANIZAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO<sup>1</sup>.  
Test No. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion. **Oecd Guidelines For The Testing Of Chemicals, Section 4**, [s.l.], 09 out. 2017. OECD.  
<https://doi.org/10.1787/9789264185333-en>.

ORGANIZAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO<sup>2</sup>.  
**Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for Serious Eye Damage and Eye Irritation**. França, 2017. Disponível em:  
<[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2017\)15&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2017)15&doclanguage=en)>. Acesso em: 13 jun. 2019.

OECD<sup>3</sup>. Test No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. **Oecd Guidelines For The Testing Of Chemicals, Section 4**, [s.l.], 9 out. 2017. OECD.  
<http://dx.doi.org/10.1787/9789264203846-en>.

ORGANIZAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO<sup>4</sup>.  
Test No. 460: Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants. **Oecd Guidelines For The Testing Of Chemicals, Section 4**, [s.l.], 9 out. 2017. OECD. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264185401-en>.

ORGANIZAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO<sup>1</sup>.  
Test No. 438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. **Oecd Guidelines For The Testing Of Chemicals, Section 4**, [s.l.], 27 jun. 2018. OECD.  
<http://dx.doi.org/10.1787/9789264203860-en>.

ORGANIZAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO<sup>2</sup>.  
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. **Oecd Guidelines For The Testing Of Chemicals, Section 4**, [s.l.], 27 jun. 2018. OECD.  
<https://doi.org/10.1787/9789264242432-en>.

ORGANIZAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO<sup>1</sup>.  
Test No. 492: Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage. **Oecd Guidelines For The Testing Of Chemicals, Section 4**, [s.l.], 18 jun. 2019. OECD. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264242548-en>.

ORGANIZAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO<sup>2</sup>.  
Test No. 494: Vitrigel-Eye Irritancy Test Method for Identifying Chemicals Not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage. **Oecd Guidelines For The Testing Of Chemicals, Section 4**, [s.l.], 18 jun. 2019. OECD. <https://doi.org/10.1787/9f20068a-en>.

OLIVEIRA, Maria Auxiliadora; BERMUDEZ, Jorge Antônio Zepeda; SOUZA, Arthur Custódio Moreira de. Talidomida no Brasil: vigilância com responsabilidade compartilhada? **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 15, p.99-112, jan. 1999. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/csp/v15n1/0040.pdf>>. Acesso em: 08 out. 2019.

PEOPLE FOR THE ETHICAL TREATMENT OF ANIMALS. **Alternatives to animal testing for regulatory purposes**. 2018. Disponível em: <[https://www.piscltd.org.uk/wp-content/uploads/2018/10/PISC\\_Booklet\\_8.5x11\\_OCT2018hu8\\_WEB\\_300.pdf](https://www.piscltd.org.uk/wp-content/uploads/2018/10/PISC_Booklet_8.5x11_OCT2018hu8_WEB_300.pdf)>. Acesso em: 22 set. 2019.

PRESGRAVE, Octavio Augusto França. **Proposta de criação do centro brasileiro para métodos alternativos: formação, estrutura e funcionamento**. 2012. 136 f. Tese (Doutorado) - Curso de Vigilância Sanitária, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <[https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/9908/2/Tese\\_Octavio\\_Presgrave.pdf](https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/9908/2/Tese_Octavio_Presgrave.pdf)>. Acesso em: 19 set. 2019.

PRESGRAVE, Octavio et al. Brazilian Center for the Validation of Alternative Methods (BraCVAM) and the Process of Validation in Brazil. **Alternatives To Laboratory Animals**, [s.l.], v. 44, n. 1, p.85-90, mar. 2016. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/026119291604400110>.

PRINSEN, Menk K. et al. The Isolated Chicken Eye test to replace the Draize test in rabbits. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, [s.l.], v. 85, p.132-149, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.01.009>.

RAPKIEWICZ, Jackson Carlos; GROBE, Rafaela. **TRAGÉDIAS HISTÓRICAS: o caso do elixir de sulfanilamida**. 2014. Disponível em: <[https://www.crf-pr.org.br/uploads/revista/24162/cim\\_crf\\_pr\\_1\\_2014.pdf](https://www.crf-pr.org.br/uploads/revista/24162/cim_crf_pr_1_2014.pdf)>. Acesso em: 12 set. 2019.

SCHARDEIN, James L. Chemically Induced Birth Defects. **Marcel Dekker Inc.**, p.903. 1993. Nova York.

SILVA, Artur Christian Garcia da. **Desenvolvimento de modelo biomimético de córnea para avaliação da toxicidade ocular de produtos farmacêuticos: perfil inflamatório, caracterização e aplicabilidade**. 2018. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018. Disponível em: <<https://repositorio.bc.ufg.br/tede/bitstream/tede/8480/5/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20-%20Artur%20Christian%20Garcia%20da%20Silva%20-%202018.pdf>>. Acesso em: 20 set. 2019.

SURIN, A. M. et al. Disruption of functional activity of mitochondria during MTT assay of viability of cultured neurons. **Biochemistry (Moscow)**, [s.l.], v. 82, n. 6, p.737-749, jun. 2017. Pleiades Publishing Ltd. <http://dx.doi.org/10.1134/s0006297917060104>.

TAKAHASHI, Y. 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. An interlaboratory study of the short time exposure (STE) test using SIRC cells for predicting eye irritation potential. **Cutaneous And Ocular Toxicology**, [s.l.], v. 29, n. 2, p.77-90, 23 fev. 2010. Informa UK Limited.  
<http://dx.doi.org/10.3109/15569521003587327>.

TAKAHASHI, Yutaka et al. Development of the short time exposure (STE) test: An *in vitro* eye irritation test using SIRC cells. **Toxicology In Vitro**, [s.l.], v. 22, n. 3, p.760-770, abr. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2007.11.018>.

TAKAHASHI, Yutaka et al. Inter-laboratory study of short time exposure (STE) test for predicting eye irritation potential of chemicals and correspondence to globally harmonized system (GHS) classification. **The Journal Of Toxicological Sciences**, [s.l.], v. 34, n. 6, p.611-626, 2009. Japanese Society of Toxicology.  
<http://dx.doi.org/10.2131/jts.34.611>.

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**, [s.l.], v. 25, n. 7, p.1425-1434, out. 2011. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2011.04.012>.

TAYLOR, Katy et al. Estimates for Worldwide Laboratory Animal Use in 2005. **Altern Lab Anim**, Londres, p.327-342, 2008.

WILHELMUS, Kirk R. The Draize Eye Test. **Survey Of Ophthalmology**, [s.l.], v. 45, n. 6, p.493-515, maio 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0039-6257\(01\)00211-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0039-6257(01)00211-9).

WILSON, S. L.; AHEARNE, M.; HOPKINSON, A. An overview of current techniques for ocular toxicity testing. **Toxicology**, v. 327, p. 32–46, 2015.

WILSON, Samantha L.; AHEARNE, Mark; HOPKINSON, Andrew. An overview of current techniques for ocular toxicity testing. **Toxicology**, [s.l.], v. 327, p.32-46, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2014.11.003>.

YUN, J. et al. Toxicology *in Vitro* Exploration and comparison of *in vitro* eye irritation tests with the ISO standard *in vivo* rabbit test for the evaluation of the ocular irritancy of contact lenses. **TIV**, v. 37, p. 79–87, 2016.

ZEBET (Alemanha). **Centre for Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments**. 2008. Disponível em:  
<[https://www.bfr.bund.de/en/zebet\\_\\_\\_alternative\\_methods\\_to\\_animal\\_experiments-53868.html#attachments](https://www.bfr.bund.de/en/zebet___alternative_methods_to_animal_experiments-53868.html#attachments)>. Acesso em: 19 set. 2019.

