

# Estudo da aplicabilidade do ensaio de citotoxicidade por quantificação de proteínas totais na avaliação do potencial irritante ocular de tensoativos

Rodrigo Netto Costa<sup>1</sup>

Clarice Lima Abreu Suomela<sup>2</sup>

Rosaura de Farias Presgrave<sup>3</sup>

Eloisa Nunes Alves<sup>4</sup>

Anna Christina Rosa Guimarães<sup>5</sup>

Isabella Fernandes Delgado<sup>6</sup>

## Resumo

A crescente tendência mundial pela substituição do uso de animais em experimentação promoveu a busca por métodos alternativos. Particular ênfase é dada ao desenvolvimento de métodos para substituir o tradicional Teste de irritação ocular de Draize. Neste estudo, o ensaio de quantificação de proteínas totais em células SIRC e 3T3 utilizando o corante Azul Brilhante de Coomassie R-250 foi avaliado quanto ao seu valor em prever o potencial irritante ocular de tensoativos. O modelo de citotoxicidade proposto apresentou boa capacidade de diferenciar tensoativos quanto ao seu potencial irritante, sobretudo, quando conduzido com células SIRC. Apesar da necessidade de testar um maior número de amostras e da realização de estudos interlaboratoriais, esses resultados preliminares indicam que o modelo proposto, além de apresentar

---

<sup>1</sup> Mestre em Saúde Pública, Tecnologista em Saúde Pública, DI - INCQS/FIOCRUZ.

<sup>2</sup> Mestre em Vigilância Sanitária, Tecnologista em Saúde Pública, DI - INCQS/FIOCRUZ.

<sup>3</sup> Doutora em Vigilância Sanitária, Tecnologista Sênior, DFT - INCQS/FIOCRUZ.

<sup>4</sup> Mestre em Vigilância Sanitária, Tecnologista Sênior, DFT - INCQS/FIOCRUZ

<sup>5</sup> Técnica em Biotecnologia, Técnica em Saúde Pública, DI - INCQS/FIOCRUZ

<sup>6</sup> Doutora em Ciências, Tecnologista em Saúde Pública do Departamento de Imunologia. INCQS/FIOCRUZ. Av. Brasil4365 - Manguinhos, Rio de Janeiro – CEP: 21040-900. Fone: (21) 38655169 Fax: (21)22900915. E-mail: isabella.delgado@incqs.fiocruz.br

características importantes (rapidez, sensibilidade, simplicidade de execução, baixo custo e alto grau de automação), é capaz de predizer o potencial irritante ocular de tensoativos.

**Palavras-chave:** Teste de Draize. Irritação ocular. Métodos alternativos. Tensoativos. SIRC. 3T3.

## 1 Introdução

A necessidade da realização de ensaios utilizando animais tem sido seriamente questionada por camadas poderosas da sociedade, seja no âmbito político, social, ético ou científico. Os grupos que argumentam a favor da abolição da experimentação animal têm encontrado um suporte significativo na Europa e Estados Unidos, e suas ideias têm se expandido por todo o mundo. Diante desse cenário, pode-se dizer que diversos setores da indústria e mesmo os órgãos governamentais de regulamentação e controle da qualidade estão sob crescente pressão para substituir ensaios *in vivo* por métodos alternativos que não utilizem animais (EUN; SUH, 2000).

Particular ênfase é dada ao desenvolvimento de métodos para substituir o tradicional Teste de Draize, utilizado na avaliação do potencial irritante ocular de ingredientes passíveis de contato com o olho humano (DRAIZE; WOODARD; CALVERY, 1944; KAY; CALANDRA, 1962).

Esse teste tem sido duramente criticado pela comunidade científica, principalmente devido à subjetividade de avaliação das lesões oculares e variabilidade dos resultados obtidos em diferentes laboratórios, além de questões éticas relacionadas ao bem-estar animal.

Apesar do Teste de Draize ser um dos principais alvos dos grupos antiviviseccionistas, não existem ainda hoje métodos alternativos para a avaliação da irritação ocular que sejam plenamente validados e, portanto, aceitos pelas agências regulatórias mundiais. O teste de opacidade e permeabilidade de córnea bovina (BCOP; do inglês *Bovine Corneal Opacity and Permeability assay*) e o teste em olho enucleado de galinha (ICE; do inglês *Isolated Chicken Eye assay*), embora recentemente validados pelo Centro Europeu para Validação de Metodologias Alternativas - ECVAM, são

somente aplicáveis à avaliação de produtos corrosivos ou com severo potencial irritante (ESAC, 2009). Não se destinam, portanto, à avaliação de produtos com baixo potencial irritante, o que seria de fato o interesse na área de controle da qualidade de produtos sujeitos ao regime de Vigilância Sanitária (*e.g.* cosméticos, medicamentos de uso oftálmico etc).

No caso da avaliação da toxicidade ocular induzida por produtos, sabe-se que um único método alternativo dificilmente será capaz de substituir o uso de animais (PAUWELS; ROGIERS, 2004; ABREU; PRESGRAVE; DELGADO, 2008). Assim, os principais centros internacionais de estudos e validação de métodos alternativos ao uso de animais recomendam que a comunidade científica continue pesquisando novas metodologias e aprofunde seus conhecimentos a respeito das metodologias pré-existentes, procurando conhecer as particularidades desses métodos e avaliando um maior número de substâncias e produtos acabados.

Atualmente, há um número considerável de estudos nesse sentido, como *e.g.* aqueles que empregam ensaios de citotoxicidade, utilizando diversas linhagens celulares com corantes vitais como MTT e NRU (NORTH-ROOT et al., 1982; NORTH-ROOT et al., 1985; ROGUET et al., 1992; YANG; ACOSTA, 1994; PASTERNAK; MILLER, 1995; TANI et al., 1999; TAKAHASHI et al., 2008; TAVASZI et al., 2008). No entanto, trabalhos sobre a aplicabilidade do ensaio de quantificação de proteínas totais (QPT), utilizando o corante Azul Brillhante de Coomassie R-250 (CBB-R250) na avaliação do potencial irritante ocular são escassos (VIANet al., 1995). Este ensaio baseia-se na adsorção, eluição e medição da densidade óptica (D.O.) do CBB-R250, que cora proteínas celulares (MARGIS; BOROJEVIC, 1989). Substâncias que apresentam ação citolítica ou interferem com o crescimento/proliferação celular podem ser avaliadas por este ensaio. Há uma relação inversa entre o efeito citotóxico da substância teste e o teor de proteínas dosadas, *i.e.* quanto maior o efeito citotóxico, menor a dosagem protéica.

Nesse contexto, o presente trabalho pretende contribuir para uma maior compreensão da aplicabilidade do ensaio de QPT, utilizando as linhagens celulares SIRC e 3T3, como mais uma possível alternativa no processo de substituição ao Teste de Draize.

## **2 Material e métodos**

### **2.1 Amostras**

Foram avaliados cinco tensoativos: lauril sulfato de sódio, triton X-100, tween-20 e cloreto de benzalcônio, da marca Sigma<sup>®</sup>, e brometo de cetildimetetilamônio da MERCK<sup>®</sup>.

### **2.2 Linhagens celulares**

Foram utilizadas duas linhagens celulares: uma derivada de córnea de coelho (SIRC) e outra derivada de tecido de embrião de camundongo suíço albino (NIH/3T3), ambas obtidas da American Type Culture Collection (ATCC). A linhagem SIRC foi mantida em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM HAM F12) e a linhagem 3T3 em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), ambos suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) marca Gibco (Eragny, França). As células em cultura foram incubadas a  $36,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  em estufa úmida de  $\text{CO}_2$  no Setor de Cultura de Células do Laboratório de Vacinas Virais do Departamento de Imunologia do INCQS/FIOCRUZ, conforme Manual da Qualidade do Instituto (Procedimento Operacional Padrão – POP – 65.3430.031).

### **2.3 Teste de Draize**

Os dados relacionados ao Teste de Draize são provenientes do banco de dados do Setor de Irritação do Departamento de Farmacologia e Toxicologia do INCQS/FIOCRUZ.

Os tensoativos foram aplicados em diferentes concentrações, que variaram entre 0,5% e 100%. O Teste de Draize foi realizado conforme o Manual da Qualidade do INCQS/FIOCRUZ (Procedimento Operacional Padrão - POP – 65.3330.004), cujo objetivo é a detecção e avaliação do potencial de irritabilidade ocular para o homem, de qualquer substância ou produto acabado.

Para cada tensoativo avaliado, foram utilizados 05 coelhos da raça Nova Zelândia provenientes do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL/

FIOCRUZ), machos ou fêmeas, hípidos e de peso corpóreo acima de 2kg. Instilou-se 0,1 ml da amostra no saco conjuntival inferior e, em seguida, massageou-se gentilmente durante 30 segundos. As leituras foram realizadas nos períodos de 24, 48, 72 horas e 7 dias após a aplicação da amostra, para observar as alterações que podem ocorrer nas estruturas do olho (córnea, íris e conjuntiva) e calcular a média dos escores máximo (MEM) por substância analisada.

O Teste de Draize permite as seguintes classificações: não irritante (NI), irritante leve (IL), irritante moderado (IM), irritante severo (IS) e irritante máximo (IMax).

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Fiocruz.

### **3 Ensaio *in vitro***

O processo de coloração por CBB-R250 foi proposto por Margis e Borjevic (1989). No presente trabalho, o ensaio de QPT foi adaptado para o uso em microplacas de 96 cavidades, como Clothier e colaboradores (2006). Para tal, estabeleceu-se um protocolo com modificações nos volumes utilizados de cada reagente, no uso de lavador automático de microplacas e no esquema de lavagem das placas após a coloração. Detalhes da padronização dessa técnica modificada foram previamente descritos por nosso grupo (COSTA, 2006; ABREU, 2008).

As células SIRC e 3T3 foram semeadas em microplacas de 96 cavidades (excetuando-se as extremidades) no volume de 100µL e concentração de  $1,5 \times 10^5$  células/mL (SIRC) e de  $1,0 \times 10^5$  células/mL (3T3) em seus respectivos meios de cultura e mantidas por 24 horas em estufa a  $36,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$  com 3,5% de  $\text{CO}_2$ . Depois, os meios de cultura foram trocados por 100µL de diluições pré-estabelecidas das amostras em meio DMEM HAM F12 a 5% de SFB para SIRC e em meio DMEM a 5% de SFB para 3T3. Após 24h de incubação em estufa, a  $36,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$  com 3,5% de  $\text{CO}_2$ , todo o conteúdo de meio existente nas microplacas foi descartado e procedeu-se à lavagem com tampão fosfato de sódio (PBS) 0,01M em lavador automático em quatro ciclos de lavagem.

Então, o PBS foi descartado e adicionou-se, em cabine de segurança química, 100µL PBS 0,01M/formol 4% (agente fixador), incubando-se durante 15min. O fixador foi descartado e a placa foi seca à temperatura ambiente. Adicionou-se a cada poço 50µL de solução do corante CBB-R250 0,2% p/v, incubando-se por 30 minutos ao abrigo da luz. O corante foi descartado, a microplaca foi imediatamente mergulhada em um recipiente plástico, contendo água destilada e, logo após, lavada manualmente por três vezes, trocando-se o recipiente a cada lavagem e, então, a microplaca foi colocada em um agitador automático por 20min a 500rpm, seguindo-se de uma última lavagem com água destilada. A placa secou a temperatura ambiente e o corante foi, então, eluído ao se adicionar 100µL de dodecilsulfato de sódio (SDS) 1% em cada cavidade, deixando agir *overnight*. Então, a D.O. foi medida em espectrofotômetro a 595nm.

Uma curva inicial foi obtida com oito concentrações de cada tensoativo diluído em meio de cultura (100; 10; 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 e 0,00001mg/mL). A partir daí, uma segunda curva com uma faixa mais estreita de oito concentrações foi realizada a partir do resultado da primeira curva. A concentração em que se obteve nessa segunda curva a redução de 50% na absorbância, quando comparada às células não tratadas (controle), foi considerada a concentração de efeito citotóxico (*i.e* IC<sub>50</sub> ou concentração inibitória 50%). O valor de IC<sub>50</sub> para cada substância testada foi calculado pela média de três ensaios independentes.

## 4 Resultados e discussão

### 4.1 Teste de Draize

Os tensoativos foram avaliados em diferentes concentrações no Teste de Draize. A relação dose-resposta e o potencial irritante ocular (MEM e classificação final) de cada tensoativo estudado estão demonstrados na Tabela 1.

A partir dos resultados obtidos *in vivo* (Tabela 1), buscamos categorizar os tensoativos de acordo com o seu potencial irritante, como mostra a Tabela 2.

Tabela 1 - Média do Escore Máximo (MEM) e classificação final obtidos no teste *in vivo*.

<b>Concentração aplicada nos olhos dos coelhos (%)</b>								
	100	30	16	10	8	4	1	0,5
<b>TS09</b>	2,0 (NI)	-	-	-	-	-	-	-
<b>TS01</b>	-	56,0 (IS)	48,4 (IS)	15,6 (IM)	15,6 (IM)	5,6 (IL)	-	-
<b>TS08</b>	-	59,8 (IMax)	-	-	-	-	2,8 (IL)	1,6 (NI)
<b>TS05</b>	-	-	-	-	-	-	46,4 (IS)	6,0 (IM)
<b>TS06</b>	-	-	-	-	-	-	-	8,4 (IM)

TS01 - lauril sulfato de sódio, TS05 - cloreto de benzalcônio, TS06 - brometo de cetildimetiletilamônio, TS08 – triton X-100 e TS09 - tween-20.

Classificação final: NI: não irritante; IL: irritante leve; IM: irritante moderado; IS: irritante severo e IMax: irritante máximo.

Os dados compilados nas Tabelas 1 e 2 demonstram que todos os tensoativos apresentam potencial irritante ocular, com exceção do tween-20 (TS09), um tensoativo não-iônico, que mesmo quando testado puro, foi classificado como não irritante.

O lauril sulfato de sódio (TS01) foi avaliado em diversas concentrações e mostrou-se irritante severo, quando aplicado a 30% e 16%, tendo sido classificado como irritante moderado nas concentrações de 10% e 8% e como irritante leve na concentração de 4%.

Tabela 2 - Categorização do potencial irritante ocular dos tensoativos avaliados.

Tensoativos	Natureza	Resultado <i>in vivo</i> : Concentração teste (Classificação)	Potencial irritante <i>in vivo</i>
<b>TS09</b>	Não-iônico	100% (NI)	não irritante
<b>TS01</b>	Aniônico	30% (IS)	+
<b>TS08</b>	Não-iônico	30% (IMax); 0,5% (NI)	++
<b>TS05</b>	Catiônico	0,5% (IM)	+++
<b>TS06</b>	Catiônico	0,5% (IM)	+++

TS01 - lauril sulfato de sódio, TS05 - cloreto de benzalcônio, TS06 - brometo de cetildimetilamônio, TS08 - triton X-100 e TS09 - tween-20.

O triton X-100 (TS08) induziu lesões graves nos olhos dos animais e recebeu classificação compatível com “irritante máximo”, quando testado a 30%, demonstrando assim que apesar de pertencer à classe de tensoativos não-iônicos (que, via de regra, é considerada uma classe que compreende ingredientes com baixo potencial irritante) é mais irritante para os olhos que o tensoativo aniônico lauril sulfato de sódio (TS01).

Este mesmo tensoativo (TS08) foi ainda avaliado nas concentrações 1% (irritante leve) e 0,5% (não irritante), apresentando menor potencial irritante do que o catiônico cloreto de benzalcônio (TS05), que, quando aplicado nos olhos dos animais nas concentrações de 1% e 0,5% induziu lesões compatíveis com as classificações “irritante severo” e “irritante moderado”, respectivamente (Tabelas 1 e 2).

Os tensoativos catiônicos cloreto de benzalcônio (TS05) e o brometo de cetildimetilamônio (TS06) foram os ingredientes que demonstraram os maiores potenciais irritantes deste estudo; mesmo quando avaliados em concentrações muito baixas (*i.e.* 0,5%), induziram lesões oculares compatíveis com a classificação “irritante moderado”.

Assim, considerando a classificação do Teste de Draize em função da relação dose-resposta observada, podemos ordenar os tensoativos de acordo com o seu potencial irritante ocular *in vivo*; onde [TS09] < [TS01] < [TS08] < [TS05 = TS06], conforme demonstra a Tabela 2.

#### 4.2 Ensaio *in vitro*

As médias das  $IC_{50}$  de cada um dos cinco tensoativos avaliados foram obtidas a partir de três ensaios independentes. Esses valores são demonstrados na Tabela 3.

Alguns métodos alternativos mais consagrados pelo uso, como *e.g.* o RBC Teste de Hemólise, já contam com valores de ponto de corte (*cut off*) previamente estabelecidos durante o processo de desenvolvimento/padronização do método. Tais valores são úteis na identificação de respostas positivas (substâncias irritantes) ou negativas (substâncias não irritantes), e na classificação do potencial irritante da substância-teste positiva, conforme a severidade dos efeitos observados (ALVES et al., 2008; MITJANS et al., 2008).

Tabela 3 - Comparação dos valores médios de  $IC_{50}$  e do potencial irritante *in vivo* dos tensoativos avaliados.

	Potencial irritante <i>in vivo</i>	$IC_{50}$ (mg/ml)*	
		SIRC	3T3
TS09	Não irritante	1,208 ± 0,321	0,393 ± 0,017
TS01	+	0,040 ± 0,002	0,062 ± 0,002
TS08	++	0,030 ± 0,008	0,005 ± 0,003
TS05	+++	0,004 ± 0,001	0,007 ± 0,003
TS06	+++	0,003 ± 0,001	0,004 ± 0,001

\* Valores: média ± DP de três ensaios independentes. TS01 - lauril sulfato de sódio, TS05 - cloreto de benzalcônio, TS06 - brometo de cetildimetiletilamônio, TS08 - triton X-100 e TS09 - tween-20.

No caso do Teste RBC, para citar o mesmo exemplo já mencionado acima, a substância-teste que apresenta como resultado final um valor de  $H_{50}/ID > 100$  é considerada como *não irritante*, enquanto um resultado de  $H_{50}/ID \leq 100$  é indicativo de uma resposta positiva, *i.e. irritante*. Tal estabelecimento, além de possibilitar a identificação de substâncias-teste como *irritantes* ou *não irritantes*, permite ainda classificar *in vitro* uma substância como irritante leve ( $H_{50}/ID \geq 10$ ), moderado ( $H_{50}/ID \geq 1$ ), severo ( $H_{50}/ID \geq 0,1$ ) ou máximo ( $H_{50}/ID < 0,1$ ).

Para os ensaios de citotoxicidade, no entanto, não há na literatura científica propostas consensuais a respeito de um valor de  $IC_{50}$  que seja passível de ser considerado como *cut off* para diferenciar substâncias *não irritantes* daquelas *irritantes*.

Um dos poucos artigos publicados nesse tema é de autoria de Vian et al. (1995), que propõe um valor de *cut off* para ensaios de citotoxicidade em estudo conduzido com células 3T3, SIRC e L929 e utilizando diferentes metodologias (MTT, NRU e QPT). Vian e colaboradores consideraram o valor de  $IC_{50} = 0,700\text{mg/ml}$  como o melhor ponto de corte que distingue *in vitro* um tensoativo irritante ( $IC_{50} < 0,700\text{mg/ml}$ ) de um *não irritante* ( $IC_{50} > 0,700\text{mg/ml}$ ).

### 4.3 Células SIRC

Nas condições experimentais do presente estudo e levando-se em consideração o ponto de corte proposto por Vian et al. (1995), constatamos que somente quando o ensaio de QPT foi conduzido com a linhagem celular SIRC, ele foi capaz de identificar corretamente o tensoativo TS09 ( $IC_{50} = 1,208\text{mg/ml}$ ), o único ingrediente classificado *in vivo* como *não irritante* no presente estudo (Tabela 3).

Com relação aos tensoativos classificados *in vivo* como irritantes, podemos dizer que os menores valores de  $IC_{50}$  (*i.e.* tensoativos com maior potencial irritante ocular *in vitro*) foram atribuídos aos tensoativos catiônicos brometo de cetildimetiletilamônio (TS06:  $IC_{50} = 0,003\text{ mg/ml}$ ) e cloreto de benzalcônio (TS05:  $IC_{50} = 0,004\text{ mg/ml}$ ), exatamente aqueles que *in vivo* apresentaram o maior potencial irritante ocular. É digno de nota o fato do  $IC_{50}$  médio obtido para esses tensoativos ter sido cerca de 400 vezes menor que o  $IC_{50}$  médio observado para o tensoativo *não irritante* TS09, demonstrando a boa capacidade desse modelo em diferenciar produtos *irritantes* daqueles *não irritantes*.

Ainda em relação à análise de dados provenientes de ensaios conduzidos com a linhagem SIRC, observamos que os resultados obtidos com essa célula para os tensoativos TS01 ( $IC_{50} = 0,040\text{ mg/ml}$ ) e TS08 ( $IC_{50} = 0,030\text{ mg/ml}$ ) são cerca de 10 vezes maiores que aqueles obtidos com os TS06 e TS05. Assim, com base nos dados compilados na Tabela 3, podemos afirmar que os resultados obtidos *in vitro* com a SIRC são compatíveis com o potencial irritante dos tensoativos estabelecidos *in vivo*.

#### 4.4 Células 3T3

A Tabela 3 mostra ainda que, com a utilização da linhagem celular 3T3, todos os cinco tensoativos são classificados como *irritantes*, uma vez que todos apresentaram valores de  $IC_{50} < 0,700\text{mg/ml}$ . A resposta obtida *in vitro* com células 3T3 para o TS09 ( $IC_{50}=0,393\text{mg/ml}$ ) pode, portanto, ser considerada falso positiva, conforme demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4 - Tabela de contingência: concordância entre resultados *in vivo* e *in vitro*.

		Classificação <i>in vivo</i>	
		Irritante	Não irritante
	Classificação <i>in vitro</i>		
<b>SIRC</b>	<b>Irritante</b>	4	0
	<b>Não irritante</b>	0	1
<b>3T3</b>	<b>Irritante</b>	4	1*
	<b>Não irritante</b>	0	0

\* falso positivo; cut off *in vitro*  $IC_{50} = 0,700\text{mg/ml}$ .

No entanto, o fato do tensoativo TS09 não ter sido identificado como não irritante *in vitro* não deve ser considerado um resultado conclusivo, uma vez que o número de tensoativos avaliados no presente estudo é pequeno e que nossa classificação foi feita com base em proposta de *cut off* realizada por outros autores. Tal valor de *cut off*, além de não ser um consenso na literatura internacional, pode não refletir de maneira adequada a situação de uso para as diferentes linhagens celulares. Além disso, entendemos que estudos adicionais que incluam uma avaliação interlaboratorial de tensoativos e produtos acabados que os contenham (e.g. xampus, condicionadores, sabonetes líquidos etc) são importantes para estabelecer de forma definitiva um valor de *cut off* para o teste de citotoxicidade por QPT com o corante CBB-R250.

Por fim, deve-se levar em consideração que os resultados positivos obtidos com as duas linhagens celulares são semelhantes entre si, sobretudo aqueles

obtidos com os tensoativos catiônicos, que apresentam forte potencial irritante. Além disso, existe um fator de 100 vezes entre o maior (0,393 mg/ml) e o menor (0,004 mg/ml) valor de  $IC_{50}$  médio observado no estudo com 3T3. Embora menor do que o observado para células SIRC, esse fator demonstra diferença considerável entre um tensoativo *irritante* e um *não irritante*, em termos de  $IC_{50}$ .

## 5 Conclusões

Em algumas circunstâncias, como parece ser o caso do teste de irritação ocular de Draize, os ensaios em animais não podem ser substituídos por um único método alternativo (PAUWELS; ROGIERS, 2004; ABREU; PRESGRAVE; DELGADO, 2008). Nesses casos, o desenvolvimento de um esquema de avaliação que envolva uma bateria de testes deve ser levado em consideração, podendo também ser desenvolvido um sistema hierárquico, no qual os animais somente sejam utilizados para a confirmação da ausência de toxicidade, reduzindo ao máximo o risco desses animais sofrerem quaisquer efeitos tóxicos. Essas condições implicam em um enorme desafio para a indústria de cosméticos e para a comunidade científica envolvida com a questão e justificam a realização do número significativo de modelos que vêm sendo desenvolvidos ao longo dos últimos anos nessa área específica.

Apesar de haver a necessidade de se estudar um maior número de substâncias, incluindo a avaliação de produtos acabados, os dados do presente estudo, associados aos disponíveis na literatura, demonstram que o ensaio de citotoxicidade por QPT pelo CBB-R250 em células SIRC e 3T3 pode ser usado na rotina como teste preliminar, tendo como principais vantagens: (i.) a capacidade de predizer o potencial tóxico de tensoativos, (ii.) ser um ensaio simples e quantitativo, (iii.) ser de baixo custo e não requerer equipamentos sofisticados, e (iv.) poder ser usado como um ensaio rápido e útil na bateria de testes *in vitro* a ser proposta na substituição do uso do coelho no Teste de Draize.

Nas condições experimentais deste estudo, a linhagem celular SIRC foi a que apresentou melhor concordância com os resultados *in vivo*. O ensaio QPT em células SIRC diferenciou melhor os tensoativos em termos de severidade do efeito irritante e apresentou maior diferença entre tensoativos *irritantes* e *não irritantes* em termos de  $IC_{50}$ .

## **Study on applicability of the total protein cytotoxicity assay for predicting ocular irritancy of surfactants.**

### **Abstract**

The growing world tendency for the animal replacement in experimentation promoted the search for alternative methods. Particular emphasis is given to developing methods to replace the traditional Draize eye irritation test. In this study, the total protein cytotoxicity assay using SIRC and 3T3 cells and the Coomassie Brilliant Blue R-250 dye was evaluated regarding its applicability for predicting ocular irritancy of surfactants. Our data show that the proposed cytotoxicity model has good ability to differentiate surfactants in relation to their irritancy potential, particularly when it was conducted with SIRC cells. Despite the need to test a greater number of samples and carrying out inter-laboratory studies, these preliminary results indicate that the total protein cytotoxicity assay using Coomassie Brilliant Blue R-250 is a method with important characteristics (speed, sensibility, simplicity of implementation, low cost and high degree of automation) and is able to predict the ocular irritation potential of surfactants.

**Keywords:** Draize Test. Ocular irritation. Alternative methods. Surfactants. SIRC. 3T3.

### **Referências**

ABREU, C. L. C. **Avaliação de citotoxicidade induzida por produtos cosméticos pelo método de quantificação de proteínas totais em células 3T3**. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária)- Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2008.

ABREU, C. L. C.; PRESGRAVE, O. A. F.; DELGADO I. F. Metodologias alternativas à experimentação animal: aplicação no controle da qualidade de produtos sujeitos à ação da Vigilância sanitária. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Brasília, v. 45, p. 20-27, 2008.

ALVES, E. N. et al. A reassessment of the *in vitro* RBC haemolysis assay with defibrinated sheep blood for the determination of the ocular irritation potential of cosmetic products: comparison with the *in vivo* Draize rabbit test. **Alternative to Laboratory Animals**, [S.l.], v. 36, n. 3, p. 275-284, 2008.

CLOTHIER, R. et al. The FRAME Alternatives Laboratory Database. 1. in vitro basal cytotoxicity determined by the kenacid blue total protein assay. **Alternative to Laboratory Animals**, [S.l.], v. 34, p. 151-175, 2006.

COSTA, R. N. **Estudo da aplicabilidade do ensaio de quantificação de proteínas totais em células SIRC na avaliação do potencial de irritação ocular de xampus e tensoativos**. Dissertação (Mestrado)- Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2006.

DRAIZE, J. H.; WOODARD, G.; CALVERY, H. O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [S.l.], v. 83, p. 377-390, 1944.

ENSAIO de irritação ocular. In: **Manual da qualidade**. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2008. (POP n. 65.3330.004).

ESAC. **Scientifically validated methods**: the bovine corneal opacity and permeability (BCOP) and the isolated chicken eye (ICE), test methods for eye irritation. Disponível em: <<http://ecvam.jrc.it>>. Acesso em: 26 jan. 2009.

EUN, H. C.; SUH, D. H. Comprehensive outlook of in vitro tests for assessing skin irritancy as alternatives to Draize Test. **Journal of Dermatological Science**, [S.l.], v. 24, p. 77-91, 2000.

KAY, J. H.; CALANDRA, J. C. Interpretation of eye irritation tests. **Journal of the Society of Cosmetic Chemistry**, [S.l.], v. 13, p. 281-289, 1962.

MANUTENÇÃO de linhagens de células animais. In: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Manual da qualidade**. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2008. (65.3430.031).

MARGIS, R.; BOROJEVIC, R. Quantification of attached cells in tissue culture plates and on microcarriers. **Analytical Biochemistry**, [S.l.], v. 181, n. 2, p. 209-211, 1989.

MITJANS, M.; INFANTE, M. R.; VIANRDELL, M. P. Human hemoglobin denaturation as an alternative to the Draize test for predicting eye irritancy of surfactants. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, [S.l.], v. 52, n. 2, p. 89-93, 2008.

NORTH-ROOT, H. et al. Evaluation of an *in vitro* cell toxicity test using rabbit corneal to predict the eye irritation potential of surfactants. **Toxicology Letters**, [S.l.], v. 14, p. 207-212, 1982.

NORTH-ROOT, H. et al. Prediction of the eye irritation potential of shampoos using the *in vitro* SIRC cell toxicity test. **Food and Chemical Toxicology**, [S.l.], v. 23, n. 2, p. 271-273, 1985.

PASTERNAK, A. S.; MILLER, W. M. First-order toxicity assays for eye irritation using cell lines: parameters that affect *in vitro* evaluation. **Fundamental and Applied Toxicology**, [S.l.], v. 25, n. 2, p. 253-263, 1995.

PAUWELS, M.; ROGIERS, V. Safety evaluation of cosmetic in EU reality and challenges for the toxicologist. **Toxicology Letters**, [S.l.], v. 151, p. 7-17, 2004.

ROGUET, R. et al. Prediction of eye irritation potential of surfactants using the SIRC-NRU cytotoxicity test. **Alternative to Laboratory Animals**, [S.l.], v. 20, p. 451-456, 1992.

TAKAHASHI, Y. 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, 2008.

TANI, N. et al. Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients (8): evaluation of cytotoxicity tests on SIRC cells. **Toxicology in vitro**, [S.l.], v. 13, p. 175-187, 1999.

TAVASZI, J. et al. An alternative test battery in detecting ocular irritancy of agrochemicals. **Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences**, [S.l.], v. 73, n. 4, p. 891-895, 2008.

VIAN, L. et al. Comparison of three *in vitro* cytotoxicity assays for estimating surfactant ocular irritation. **Toxicology in vitro**, [S.l.], v. 9, n. 2, p. 185-190, 1995.

YANG, W.; ACOSTA, D. Cytotoxicity potential of surfactants mixtures evaluated by primary cultures of rabbit corneal epithelial cells. **Toxicology Letters**, [S.l.], v. 70, p. 309-318, 1994.

**Para publicar na revista Universitas Ciências da Saúde, entre no endereço eletrônico [www.publicacoesacademicas.uniceub.br](http://www.publicacoesacademicas.uniceub.br). Observe as normas de publicação, facilitando e agilizando o trabalho de edição.**