



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

ARTUR CHRISTIAN GARCIA DA SILVA

Desenvolvimento de modelo biomimético de córnea para avaliação da toxicidade ocular de produtos farmacêuticos: perfil inflamatório, caracterização e aplicabilidade.

**Goiânia
2018**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ Dissertação ☐ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Artur Christian Garcia da Silva

Título do trabalho: Desenvolvimento de modelo biomimético de córnea para avaliação da toxicidade ocular de produtos farmacêuticos: perfil inflamatório, caracterização e aplicabilidade.

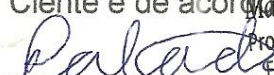
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo, Marize Campos Valadares


Profª Dra. Adjunto de Toxicologia
Faculdade de Farmácia / UFG

Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 04 / 05 / 18

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

ARTUR CHRISTIAN GARCIA DA SILVA

Desenvolvimento de modelo biomimético de córnea para avaliação da toxicidade ocular de produtos farmacêuticos: perfil inflamatório, caracterização e aplicabilidade.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Marize Campos Valadares

**Goiânia
2018**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Garcia da Silva, Artur Christian

Desenvolvimento de modelo biomimético de córnea para avaliação
da toxicidade ocular de produtos farmacêuticos: perfil inflamatório,
caracterização e aplicabilidade. [manuscrito] / Artur Christian Garcia da
Silva. - 2018.

111 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Marize Campos Valadares.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás,
Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Goiânia, 2018.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, lista de figuras, lista de
tabelas.

1. Caracterização morfofuncional. 2. Modelo biomimético de córnea.
3. Perfil inflamatório. 4. Toxicidade ocular. I. Campos Valadares,
Marize, orient. II. Título.

CDU 615



ATA DA SEÇÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aluno (a): Artur Christian Garcia da Silva

Orientador (a): Profa. Dra. Marize Campos Valadares

Título da Dissertação: "Desenvolvimento de modelo biomimético de córnea para avaliação da toxicidade ocular de produtos farmacêuticos: perfil inflamatório, caracterização e aplicabilidade".

Data: 27 de março de 2018

Horário: 14:00 horas

Local: na sala de aula do Programa/anexo II da Faculdade de Farmácia

Sugestões*:

*Obs: sugestão de alteração de título da dissertação deve ser acompanhada de justificativa.

parte as sugestões de banca

Parecer da Banca Examinadora

Membro	Aprovado /Reprovado	Assinatura
Profa. Dra. Marize Campos Valadares (FF/UFG) - Presidente	<i>Aprovado</i>	<i>Marize</i>
Profa. Dra. Fernanda Cristina Alcantara dos Santos (ICB/UFG)	<i>Aprovado</i>	<i>Fernanda Santos</i>
Prof. Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro (IQ/UFG)	<i>Aprovado</i>	<i>Wendell Coltro</i>
Profa. Dra. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira (FF/UFG) - Suplente	<i>af</i>	
Parecer Final	Aprovado/Reprovado	<i>Aprovado</i>



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Matheus Lavorenti Rocha

Goiânia-GO
2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

BANCA EXAMINADORA

Aluno(a): Artur Christian Garcia da Silva

Orientador(a): Profa. Dra. Marize Campos Valadares

Profa. Dra. Marize Campos Valadares

Professor Associado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás,
FF/UFG.

Profa. Dra. Fernanda Cristina Alcantara dos Santos

Professor Associado do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de
Goiás, ICB/UFG.

Prof. Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro

Professor Associado do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, IQ/UFG.

Profa. Dra. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira (Suplente)

Professor Adjunto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

Data: 27/03/2018

*Aos meus pais Luzivon Garcia Pereira
e Cláudia Valéria da Silva, pelas abdições,
pelos ensinamentos, pelo incentivo e pela força,
sem os quais não seria possível seguir adiante.*

Essa conquista também é de vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me conduzido até aqui, e por permitir a realização desse grande sonho. Obrigado por iluminar meu caminho, por me enviar anjos seus durante essa caminhada e por ter aberto portas que me levaram a lugares nos quais eu jamais imaginei que poderia chegar. Obrigado por, mesmo quando os pés estavam cansados e a respiração ofegante, o Senhor me aliviar o cansaço e soprar em minhas narinas um novo fôlego de vida. Não posso traduzir em palavras minha gratidão, nem tenho a pretensão de retribuir tantas bênçãos que a mim foram concedidas, mas que eu tenha a sabedoria necessária para usar o conhecimento a mim atribuído como instrumento de propagação do seu amor.

Aos meus queridos pais Luzivon Garcia Pereira e Cláudia Valéria da Silva, e à minha irmã Thauâny Christie Garcia da Silva, pelo amor incondicional e por serem o arcabouço de sustentação que me permitiu alcançar lugares tão privilegiados. Obrigado pelo carinho, pelos ensinamentos, pelas renúncias e por me darem a certeza de que eu poderei contar com vocês sempre, independentemente da circunstância. Todas as minhas conquistas, sempre dedicarei a vocês, pois só estou me tornando profissionalmente mestre hoje porque tive os melhores mestres, que sempre zelaram pela minha educação e pela minha conduta enquanto ser humano.

À Profa. Dra. Marize Campos Valadares, pela orientação, pelos ensinamentos, pela amizade e pela confiança. Obrigado por ter me conduzido de maneira tão atenciosa, por me fazer sentir um membro importante do seu grupo de pesquisa, por ter confiado em mim durante toda a execução do trabalho e por sempre me apoiar em minhas escolhas, por mais difíceis que elas tenham sido. Obrigado por nos liderar sempre com sua conduta inspiradora e por me fazer enxergar, dentro das minhas limitações, os lugares que eu poderia alcançar. Devo muito do que sou profissionalmente a você, e saiba que tenho uma profunda admiração pela pessoa e pela profissional que escolhi para chamar de líder.

À Profa. Dra. Aline Carvalho Batista da Faculdade de Odontologia da UFG, pelo carinho, pelo cuidado e por ter aberto as portas do seu laboratório para a execução de muitos dos procedimentos executados no decorrer deste trabalho. Obrigado por me receber de maneira tão acolhedora, pela solicitude, pela generosidade, pelas palavras de

incentivo, pelos sorrisos e pelo apoio técnico, sem o qual não teríamos conseguido seguir adiante. Obrigado por sempre acreditar em mim!

Ao Técnico de Laboratório da Faculdade de Odontologia Erildo Ribeiro, pela amizade, pelo apoio, pelo incentivo e por me ensinar muito do que sei hoje sobre técnicas histológicas. Sua ajuda foi de extrema importância, tanto para a execução do trabalho, quanto para minha vida profissional, e tenho um prazer imenso de hoje ser seu colega de profissão. Obrigado por todo o apoio!

Ao colega e Odontólogo da UFG, Diego Antônio Costa Arantes, pela amizade, pela solicitude, pela disposição em contribuir com o trabalho e pelo apoio técnico que foi indispensável para a condução deste. Obrigado por ter se tornado um grande companheiro nessa jornada, por dividir as aflições e celebrar as conquistas. Foi muito bom poder contar com você!

A toda equipe do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular (LFTC), dos quais muitos se tornaram amigos pessoais: Adrienny Chialchia, Alane Cortez, Ana Clara Stival, Andreia Luiza, Bruna Tollstadius, Bruna Pedralli, Edvande Xavier, Elisandra Gava, Gessyca Gonçalves, Hallisson Ranieri, Isabelly Paula, Laís Brito, Lara Prado, Larissa Cleres, Larissa Matuda, Renato Ivan, Soraia Ferreira, Thaisângela Rodrigues, Thaís Rosa e Wanessa Andrade. Obrigado pela agradável convivência diária, pela troca de conhecimentos, pelas risadas, por compartilharem as conquistas e também alguns momentos de desespero, pelos cafés e pelos incontáveis pedaços de bolo! Sem dúvida, trabalhar ao lado de vocês deixou o caminho muito mais leve e aprazível.

Às minhas estimadas amigas, Larissa Cleres Moreira e Thaís Rosa Marques dos Santos, deixo meu agradecimento especial. Obrigado por se fazerem presentes durante todo o caminho, por celebrarem comigo a cada conquista alcançada, por me aconselharem ao surgir de cada dúvida, por não me deixarem desistir diante das dificuldades e, principalmente, por me darem a certeza de que existem anjos de Deus entre nós, cabendo a nós enxergarmos o papel que eles têm em nossas vidas. Vocês me fazem enxergar o que há de melhor em mim, mesmo que muitas vezes eu não consiga fazê-lo por mim mesmo. Cada uma com seu jeito, vocês me conquistam todos os dias e me ensinam lições que jamais serão encontradas em nenhum periódico científico.

À Profa. Dra. Elisandra Gava de Castro, pela amizade, pela solicitude, pelo apoio técnico e científico. Obrigado por nos ajudar a navegar por águas não exploradas e por nos fornecer seu conhecimento científico como farol para nos auxiliar durante a jornada.

Agradeço também pelo companheirismo e pela amizade sempre dispensados. É muito bom poder contar com você!

À aluna de Iniciação Científica Adrienny Rodrigues Chialchia, por ter contribuído tão cuidadosamente para a execução deste estudo. Obrigado pela amizade, por ser sempre tão solícita, por compartilhar comigo cada resultado positivo e também por lamentar comigo a cada insucesso. Sua ajuda foi indispensável!

À secretária do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas Fernanda Bellato, pelo cuidado, pela solicitude, pela amizade e pelo carinho. Obrigado por sempre cuidar de nós de maneira quase maternal e por se fazer presente em todos os momentos.

Aos professores do Departamento de Histologia, Biologia Celular e Embriologia, do Instituto de Ciências Biológicas da UFG, especialmente ao Prof. Dr. Pedro Vale de Azevedo Brito. Obrigado por me acolherem de maneira tão especial, e por serem sempre tão solícitos e compreensivos com os momentos nos quais eu precisei me ausentar para a execução do presente trabalho. Lembrarei-me sempre com muito carinho do DHisto, e saibam que vocês sempre poderão contar comigo enquanto servidor da UFG.

Ao Diretor do Instituto de Ciências Biológicas Prof. Dr. Reginaldo Nassar Ferreira, agradeço a acolhida, a solicitude e prontidão.

À Profa. Dra. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira, pela amizade e por toda a ajuda e orientação no estágio em docência.

Aos nossos vizinhos do Laboratório de Nanotecnologia e Sistemas de Liberação de Fármacos, pela agradável convivência e pela amizade.

A todos os docentes do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, que direta ou indiretamente contribuíram e contribuem para nossa formação como discentes.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

“Entrega o teu caminho ao Senhor, confia nele e ele tudo fará.”

Salmos 37:5

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 – Estrutura morfofuncional do sistema óptico	22
1.1.1 – O olho	22
1.1.2 – A córnea	23
1.2 – Irritação ocular	25
1.2.1 – Fisiopatologia e bases celulares/moleculares	25
1.2.2 – Avaliação <i>in vivo</i> do potencial de irritação ocular de substâncias químicas e misturas	26
1.2.3 – Métodos alternativos disponíveis para a avaliação da toxicidade ocular	29
1.3 – Modelos 3D como ferramenta de avaliação toxicológica	42
1.3.1 - Modelos epiteliais 3D no contexto da avaliação da toxicidade ocular	45
2 OBJETIVOS	49
2.1 – Objetivo geral	49
2.2 – Objetivos específicos	49
3 MÉTODOS	50
3.1 – Cultivo celular	50
3.2 – Seleção e preparo das substâncias-teste	50
3.3 – Determinação da citotoxicidade das substâncias-teste frente aos queratinócitos HaCat	51
3.4 – Determinação do perfil de citocinas da linhagem HaCat mediante exposição às substâncias-teste	54
3.5 – Avaliação da produção de IL-1 β pelos queratinócitos HaCat e pelo modelo epitelial 3D mediante exposição às substâncias-teste	56
3.6 – Obtenção dos modelos epiteliais 3D	58
3.7 – Caracterização dos modelos epiteliais e da córnea humana	60
3.7.1 – Processamento das amostras para avaliação histológica	60
3.7.2 – Avaliação da expressão das proteínas Pan-citoqueratina, CD44 e Ki-67 por imunofluorescência indireta	61
3.8 – Mensuração da Resistência Transepitelial (TEER) dos modelos 3D	62
3.9 – Avaliação da aplicabilidade do modelo epitelial para a identificação de substâncias irritantes oculares	63
3.10 – Utilização da plataforma em monocamada e do modelo epitelial para a avaliação do potencial de toxicidade ocular de Henas de sobancelha	65
3.11 – Análise estatística	65
4 RESULTADOS	66

4.1 - Citotoxicidade das substâncias teste frente os queratinócitos HaCat.....	66
4.2 - Determinação do perfil de citocinas da linhagem HaCat mediante exposição às substâncias-teste	67
4.3 - Produção de IL-1 β pelos queratinócitos HaCat mediante exposição às substâncias teste.....	72
4.4 – Caracterização dos modelos biomiméticos de córnea.....	75
4.5 - Avaliação da aplicabilidade do modelo epitelial para a detecção de substâncias irritantes	79
4.6 – Avaliação da produção de IL-1 β pelo modelo 3D após exposição às substâncias teste.....	83
4.7 – Avaliação do potencial de irritação ocular das amostras de Hena mediante utilização da plataforma em monocamada e do modelo epitelial 3D	86
5 DISCUSSÃO	90
6 CONCLUSÕES	101
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

Título	Página
Tabela 1: Classificação proposta pelo Sistema Global de Harmonização na classificação e rotulagem de substâncias químicas, considerando o potencial de irritação/corrosão ocular.	28
Tabela 2: Principais métodos alternativos para avaliação de toxicidade ocular de substâncias químicas e misturas.	38
Tabela 3: Descrição das substâncias-teste selecionadas e classificação in vivo das mesmas de acordo com o Global Harmonization System (GHS).	52
Tabela 4: Descrição das etapas do ensaio de ELISA realizado para quantificação de IL-1 β nas amostras de lisado celular da linhagem HaCat, após 24 horas de exposição às substâncias-teste.	58
Tabela 5: Descrição dos anticorpos primários e secundários utilizados para a caracterização dos tecidos pela técnica de imunofluorescência indireta.	62
Tabela 6: Descrição das substâncias-teste, bem como concentrações empregadas na exposição dos modelos biomiméticos de córnea.	64
Tabela 7: Classificação das substâncias-teste conforme os diferentes graus de irritação ocular e valores de CI50 e CV80 obtidos no do ensaio de citotoxicidade.	66
Tabela 8: Produção de IL-1 β pelos queratinócitos HaCat após 24 horas de exposição à CV80 das diferentes substâncias teste.	73
Tabela 9: Valores de viabilidade tecidual obtidos após a exposição dos modelos 3D às substâncias oriundas das diferentes categorias do UN GHS.	80
Tabela 10: Resultados obtidos frente o agrupamento dos valores de viabilidade tecidual nas diferentes categorias do UN GHS, de acordo com a classificação das substâncias-teste avaliadas.	81
Tabela 11: Produção de IL-1 β pelos modelos biomiméticos de córnea 24 horas após a exposição às substâncias pertencentes às diferentes categorias do UN GHS.	84
Tabela 12: Valores de CI50 e CV80 das amostras comerciais de Hena de sobancelha, obtidos por meio do método de redução do MTT após 24 horas de exposição às concentrações de 10 – 0,078mg/mL.	86
Tabela 13: Produção de IL-1 β pelos queratinócitos HaCat após 24 horas de exposição à CV80 das diferentes amostras de Hena de sobancelha.	88
Tabela 14: Valores de viabilidade tecidual obtidos após a exposição dos modelos 3D às dispersões das amostras de Hena de sobancelha.	89

Título	Página
Figura 1: Representação esquemática do globo ocular, bem como dos seus principais constituintes.	23
Figura 2: Representação esquemática da córnea humana, bem como dos diferentes estratos e componentes celulares desse tecido.	24
Figura 3: Representação esquemática do ensaio de irritação ocular com olho isolado de galinha (ICE).	31
Figura 4: Esquema de montagem do <i>holder</i> para o ensaio de Opacidade e Permeabilidade da Córnea Bovina (BCOP).	32
Figura 5: Fluxograma do teste de liberação de fluoresceína aplicado à classificação de substâncias que causam dano ocular e substâncias não irritantes.	35
Figura 6: Variação do poder preditivo dos modelos biomiméticos de córnea em função da complexidade tecidual obtida in vitro.	46
Figura 7: Fotomicrografias dos modelos biomiméticos de córnea EpiOcular™ e HCE™, produzidos e comercializados pelas empresas internacionais MatTek e SkinEthic, respectivamente.	46
Figura 8: Representação esquemática do teste de citotoxicidade feito para as substâncias-teste frente a linhagem HaCat, através do método de redução do MTT.	53
Figura 9: Fluxograma do ensaio de CBA para a determinação do perfil de citocinas produzido pela linhagem HaCat após exposição às substâncias-teste.	56
Figura 10: Fluxograma do ensaio de ELISA para a quantificação de IL-1 β no lisado celular e no meio basal do modelo 3D.	57
Figura 11: Representação esquemática da configuração inicial do sistema de cultivo empregado para a obtenção dos modelos biomiméticos de córnea.	59
Figura 12: Fluxograma de obtenção dos modelos epiteliais 3D.	59
Figura 13: Produção das citocinas IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-8 (C), IL-10 (D), IL-12p70 (E) e TNF- α (F) por queratinócitos HaCat após exposição à CV80 das substâncias teste selecionadas para a análise preliminar, quantificadas no sobrenadante.	69
Figura 14: Produção das citocinas IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-8 (C), IL-10 (D), IL-12p70 (E) e TNF- α (F) por queratinócitos HaCat após exposição à CV80 das substâncias teste selecionadas para a análise preliminar, quantificadas no lisado celular.	70

Figura 15: Produção das citocinas IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-8 (C), IL-10 (D), IL-12p70 (E) e TNF- α (F) por queratinócitos HaCat após exposição à CV80 das substâncias teste agrupadas nas diferentes categorias do UN GHS conforme o potencial de irritação ocular.	71
Figura 16: Produção de IL-1 β pela linhagem de queratinócitos HaCat após 24 horas de exposição às diferentes substâncias-teste, de acordo com a classificação pelo sistema UN GHS, obtida por meio da técnica de ELISA	74
Figura 17: Produção de IL-1 β por queratinócitos HaCat após exposição à CV80 das substâncias teste agrupadas nas diferentes categorias do UN GHS conforme o potencial de irritação ocular.	74
Figura 18: Fotomicrografias demonstrando a cinética de crescimento epitelial dos modelos biomiméticos de córnea, bem como a comparação histomorfológica do mesmo com a córnea humana.	76
Figura 19: Fotomicrografias demonstrando a imunolocalização da proteína Pan-citoqueratina no modelo 3D e no tecido epitelial de córnea humana.	77
Figura 20: Fotomicrografia demonstrando a imunolocalização das proteínas CD44 e α -tubulina; Ki-67 e colágeno tipo I no modelo 3D e no tecido epitelial de córnea humana.	78
Figura 21: Representação gráfica da Resistência Transepitelial (TEER) do modelo biomimético de córnea durante sete dias de avaliação.	79
Figura 22: Viabilidade tecidual dos modelos epiteliais 24 horas após exposição às diferentes substâncias-teste, de acordo com a classificação pelo sistema UN GHS.	81
Figura 23: Viabilidade tecidual dos modelos epiteliais 24 horas após exposição às diferentes substâncias-teste agrupadas nas diferentes categorias do UN GHS, conforme o potencial de irritação ocular, avaliada por meio do método de redução do MTT.	82
Figura 24: Representação gráfica dos valores de absorbância obtidos mediante a avaliação de 12 diferentes lotes do modelo biomimético de córnea, obtidos por meio da técnica de redução do MTT.	82
Figura 25: Produção de IL-1 β pelo modelo epitelial 24 horas após a exposição às diferentes substâncias-teste, de acordo com a classificação pelo sistema UN GHS.	85
Figura 26: Produção de IL-1 β pelo modelo epitelial 24 horas após exposição as substância teste agrupadas nas diferentes categorias do UN GHS, de acordo com o potencial de irritação ocular, a qual foi obtida empregando-se o método de ELISA.	85
Figura 27: Citotoxicidade das amostras comerciais de Hena de sobancelha 1(A), 2(B), 3 (C), 4 (D) e 5(D) sobre os queratinócitos HaCat, obtida por meio do método de redução do MTT.	87
Figura 28: Produção de IL-1 β pela linhagem de queratinócitos HaCat após 24 horas de exposição à CV80 das diferentes amostras de Hena de sobancelha.	88
Figura 29: Viabilidade tecidual dos modelos epiteliais 24 horas após exposição às amostras comerciais de Hena de sobancelha.	89

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

Símbolo, sigla ou abreviatura	Significado
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AOP	<i>Adverse Outcome Pathway</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BCOP	<i>Bovine Cornea Opacity and Permeability)</i>
BraCVAM	Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos
BSA	<i>Bovine Serum-albumine</i>
CAS	<i>Chemical Abstract Service</i>
CAAT	<i>Center for Alternatives to Animal Testing</i>
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
Cl ₅₀	Concentração Inibitória de 50% do crescimento celular
CM	<i>Cytosensor Microphysiometer</i>
COLIPA	<i>European Cosmetic Association</i>
CONASQ	Comissão Nacional de Segurança Química
CV ₈₀	Concentração na qual a viabilidade celular é de 80%
DAMP's	<i>Danger Associated Molecular Patterns</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxico
ECETOC	<i>European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals</i>
ECVAM	<i>European Center of Validation of Alternative Methods</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FL	<i>Fluoresceine Leakage</i>
H ₅₀	Concentração da amostra que causa lise de 50% dos eritrócitos
HET-CAM	<i>Hen's Egg Test on Chorioallantoic Membrane</i>
HTS	<i>High Throughput Screening</i>
IATA	<i>Integrated Approach on Testing and Assessment</i>
ICE	<i>Isolated Chicken Eye</i>
ICCVAM	<i>Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods</i>

IVIS	<i>In Vitro Score</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MoA	<i>Mode of Action</i>
MRD ₅₀	Concentração que ocasiona redução de 50% na taxa metabólica
MTT	Brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
PAMP's	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PEG 400	Polietilenoglicol 400
REACH	<i>European regulation on Registration, Evaluation and Restriction of Chemical substances</i>
RENAMA	Rede Nacional de Métodos Alternativos
SFB	Soro Fetal Bovino
STE	<i>Short Time Exposure Test</i>
TEER	<i>Transepithelial Electrical Resistance</i>
TM	<i>Trademark</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor - α</i>
UN GHS	<i>United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals</i>

Desenvolvimento de modelo biomimético de córnea para avaliação da toxicidade ocular de produtos farmacêuticos: perfil inflamatório, caracterização e aplicabilidade.

Silva, A. C. G.¹; Valadares, M. C.¹

¹Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular (LFTC), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás.

Introdução: A avaliação da toxicidade ocular de produtos cosméticos tem sido mundialmente realizada mediante a utilização de métodos alternativos desde que a experimentação animal foi proibida para esse fim em muitos países. Nesse contexto, os modelos epiteliais reconstruídos têm sido internacionalmente utilizados para essa finalidade, os quais não encontram-se disponíveis no Brasil por questões burocráticas que limitam a importação e utilização dos mesmos no território nacional. **Objetivo:** Neste estudo, foram propostos uma plataforma de avaliação baseada em alterações celulares inflamatórias ocasionadas pela exposição a agentes irritantes oculares, bem como o desenvolvimento de um modelo biomimético de córnea a partir de queratinócitos humanos, o qual foi caracterizado e avaliado quanto à aplicabilidade para aplicação em estudos de toxicidade ocular. **Metodologia:** O perfil inflamatório dos queratinócitos HaCat foi determinado após exposição à 13 diferentes substâncias químicas, com diferentes perfis de irritação ocular (irritantes e não irritantes), por meio das técnicas de *Cytometric Bead Array* (CBA) e ELISA. Os modelos 3D foram obtidos mediante o cultivo da linhagem HaCat sobre uma matriz de colágeno tipo I, em interface ar-líquido por cinco dias. A caracterização morfológica do modelo foi realizada por meio de coloração com Hematoxilina-eosina e a expressão de biomarcadores do tecido epitelial da córnea utilizando-se imunofluorescência indireta. A avaliação da capacidade preditiva do modelo foi realizada mediante exposição deste às substâncias supracitadas, com posterior avaliação da viabilidade tecidual. Por fim, a aplicabilidade do sistema para avaliação de misturas foi verificada avaliando-se cinco amostras de Hena de sobrancelha comercializadas, sendo consideradas não irritantes pela ausência de rotulagem adequada. **Resultados e discussão:** Foi estabelecida correlação qualitativa e quantitativa em relação ao perfil inflamatório e à severidade das substâncias teste avaliadas. O modelo desenvolvido apresentou morfologia e expressão de biomarcadores semelhantes aos padrões encontrados na córnea humana, de modo que a viabilidade tecidual após a exposição às substâncias reduziu de maneira diretamente proporcional ao potencial irritante das mesmas. Ademais, das cinco amostras de Hena avaliadas, o modelo classificou quatro como irritantes moderados ou leves. **Conclusão:** O modelo epitelial desenvolvido apresentou características morfológicas e funcionais semelhantes às da córnea humana, permitindo a distinção entre substâncias irritantes e não irritantes, sendo também aplicável à investigação da toxicidade ocular de misturas botânicas.

Palavras-chave: Caracterização morfofuncional; Modelo biomimético de córnea; Perfil inflamatório; Toxicidade ocular.

Agradecimentos: LFTC, CNPQ, CAPES, FINEP.

Biomimetic corneal model for assessment of pharmaceutical products eye toxicity: inflammatory profile, characterization and applicability.

Silva, A. C. G.¹; Valadares, M. C.¹

¹Laboratory of Cell Pharmacology and Toxicology (LFTC), Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás (UFG).

Introduction: Cosmetic products eye toxicity assessment has been performed worldwide using alternative methods since animal testing has been banished for this purpose in many countries. In this context, reconstructed epithelial models have been used internationally for these evaluations, which are not available in Brazil due bureaucratic issues that limit their acquisition and use in national territory. **Objective:** In this work, an evaluation platform based on cellular inflammatory changes caused by exposure to eye irritants was proposed, as well as the development of a biomimetic corneal model from human keratinocytes, which was characterized and evaluated for applicability in ocular toxicity studies. **Methods:** Inflammatory profile of HaCat keratinocytes was determined after exposure to 13 different chemicals with different classification for ocular irritation (irritants and non-irritants) using Cytometric Bead Array (CBA) and ELISA methods. 3D models were obtained by cultivating HaCat cell line onto a collagen type I matrix, in air-liquid interface for five days. Morphological characterization was carried out through Hematoxylin-eosin staining and corneal epithelial biomarkers expression was assessed using indirect immunofluorescence. Predictive capacity assessment was performed by exposure of model to test substances with subsequently tissue viability assessment. Finally, applicability of system was verified by testing five marketed eyebrow Henna samples which were considered non-irritants due the lack of adequate labelling. **Results and Discussion:** A qualitative and quantitative correlation was established regarding the HaCat cells inflammatory profile and eye irritation degree of evaluated substances. The epithelial model presented similar morphology and biomarkers expression patterns similar to the found in human corneal epithelium, so that tissue viability after exposure to test substances reduced proportionately to the irritant potential of them. Furthermore, 3D model classified four of the five evaluated Henna samples as moderate or mild irritants. **Conclusion:** The developed epithelial model presented morphological and functional properties similar to those founded in human corneal epithelium, which enabled the distinction between irritants and non-irritants and it is also applicable to the investigation of botanical mixtures ocular toxicity potential.

Key-words: Morphofunctional characterization; Biomimetic corneal model; Inflammatory profile; Ocular toxicity.

Acknowledgement: LFTC, CNPQ, CAPES, FINEP.

1.1 – Estrutura morfofuncional do sistema óptico

1.1.1 – O olho:

O olho constitui o principal órgão do sistema fotorreceptor, sendo responsável pela captação da luz ambiente, geração de impulsos nervosos na retina e condução destes ao Sistema Nervoso Central, no qual os sinais ópticos são convertidos em impulsos neurais, resultando no processo da visão. Anatomicamente, o globo ocular situa-se dentro da órbita, sendo externamente envolto por duas projeções músculo-cutâneas denominadas pálpebras, as quais possuem cílios e glândulas sebáceas, responsáveis pela proteção mecânica e manutenção da lubrificação ocular, respectivamente (SMERDON, 2000).

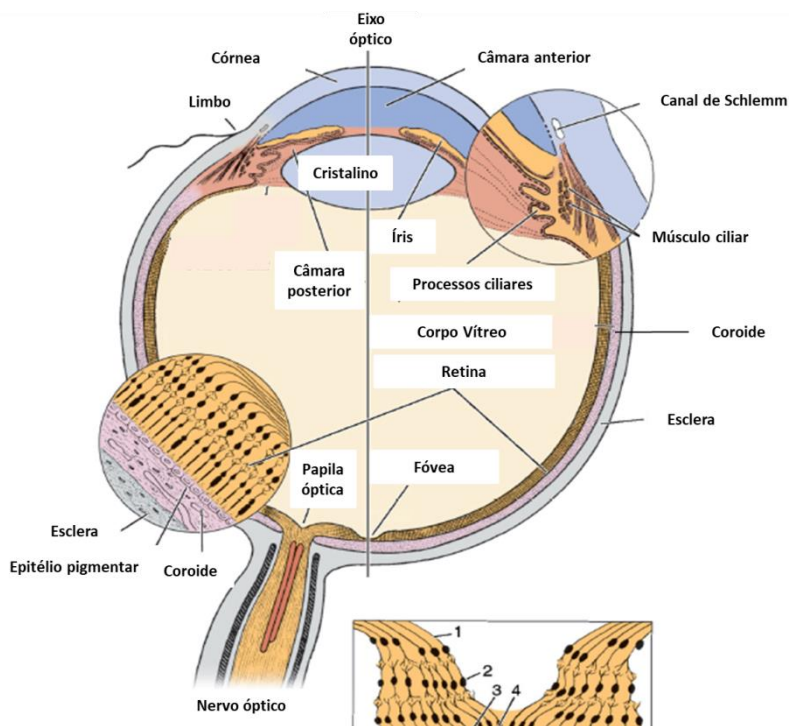
O globo ocular (Figura 1) é composto por três envoltórios principais, sendo a camada mais externa composta pela esclera e pela córnea, a túnica média ou vascular pelo corpo ciliar e pela íris e a camada interna pela retina, que se comunica diretamente com o nervo óptico. Internamente, logo abaixo da córnea, encontra-se o cristalino, o qual trata-se de uma lente biconvexa transparente sustentada pela zônula ciliar e é recoberto externamente pela íris. Entre a córnea e o cristalino existe uma cavidade denominada câmara anterior, que é preenchida pelo humor aquoso, responsável pela nutrição das estruturas avasculares presentes na porção anterior do olho. A cavidade interna do órgão é preenchida pelo corpo vítreo, o qual tem o aspecto de um gel transparente composto basicamente por água e ácido hialurônico (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A íris, que recobre anteriormente o cristalino e também está em íntimo contato com a córnea, possui uma estrutura músculo-fibrosa, responsável pela regulação do diâmetro de seu orifício circular central, a pupila, o qual é controlado pela ação direta do Sistema Nervoso Autônomo. Adicionalmente, a íris é posteriormente recoberta por uma camada de melanócitos, que conferem a cor aos olhos de acordo com a quantidade de melanina produzida e é responsável por evitar a entrada de luminosidade excessiva na porção ocular interna (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A conjuntiva, por sua vez, recobre a superfície ocular externamente e se inicia anatomicamente na porção interna das pálpebras, estendendo-se até a porção posterior da órbita, recobrindo a superfície externa da esclera (SMERDON, 2000). Essa estrutura

acessória possui uma rede vascular responsável pela nutrição e manutenção da umidade da superfície ocular, a qual também é componente importante da resposta inflamatória induzida por agentes irritantes ou distúrbios patológicos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; FUKUDA; FUKUSHIMA, 2017).

Figura 1: Representação esquemática do globo ocular, bem como dos seus principais constituintes.



Fonte: Adaptado de JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013.

1.1.2 – A córnea:

A córnea é o componente mais externo do globo ocular e separa o ambiente externo da porção interna do olho. Com diâmetro médio de 11mm e espessura média de 600µm, a córnea humana é composta histologicamente por cinco estratos distintos: epitélio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio (Figura 2) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013);

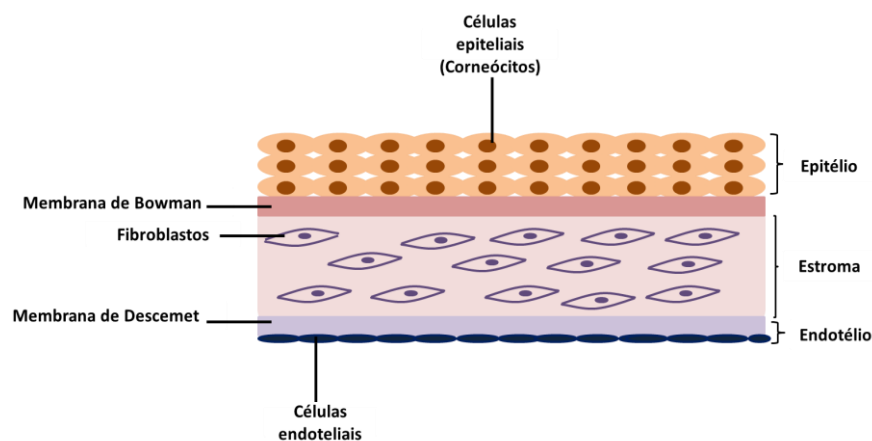
O epitélio é composto por 5-7 camadas de células epiteliais, cujas células basais mostram-se mitoticamente ativas e são ancoradas diretamente sobre a membrana basal, seguida por 2-3 camadas das chamadas “*wing cells*”, de modo que as células superficiais adquirem uma morfologia pavimentosa, não sendo observado nenhum grau de queratinização (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; HERTSENBERG; FUNDERBURGH, 2015). Estima-se que a renovação epitelial ocorra a cada 7-10 dias e é desempenhada tanto pelas células da camada basal quanto pelas células tronco epiteliais do limbo, as

quais migram para a região central da córnea e contribuem para a manutenção da integridade epitelial (HERTSENBERG; FUNDERBURGH, 2015).

A membrana de Bowman consiste em uma camada de cerca de 10-15µm de espessura e situa-se imediatamente abaixo do epitélio. É composta basicamente por fibrilas de colágeno tipo IV, formando uma estrutura rígida e desprovida de células que confere rigidez e resistência à córnea (LOTZ et al., 2016). Abaixo da membrana de Bowman inicia-se o estroma, o qual possui espessura média de 500µm e é constituído por uma rede densa de fibras colágenas (Tipo I e V) orientadas paralelamente, cuja organização tridimensional confere transparência e translucidez ao tecido. As fibras colágenas estão entremeadas por proteoglicanos e fibroblastos especializados na síntese e manutenção da matriz extracelular estromal, bem como pelo reparo de lesões que atinjam esse estrato (FINI, 1999; JESTER et al., 1999; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A membrana de Descemet situa-se na porção inferior da córnea e separa o estroma do endotélio, possuindo cerca de 10µm de espessura e sendo composta basicamente por uma rede tridimensional de colágeno tipo VIII. O endotélio, por sua vez, é formado por uma única camada de células pavimentosas e se mantém em direto contato com o humor aquoso. Essa camada possui a função de manter o equilíbrio hídrico da córnea, possibilitando a difusão de nutrientes do humor aquoso para o interior do tecido e evitando a entrada excessiva de água no interior do estroma, o que evita a formação de edemas e contribui diretamente para a manutenção da transparência do tecido (HERTSENBERG; FUNDERBURGH, 2015).

Figura 2: Representação esquemática da córnea humana, bem como dos diferentes estratos e componentes celulares desse tecido.



Fonte: O autor.

1.2 – Irritação ocular

1.2.1 – Fisiopatologia e bases celulares/moleculares:

A irritação ocular é um fenômeno que ocorre mediante a exposição dos olhos a diferentes agentes agressores químicos ou físicos, cujos sintomas clínicos podem variar desde desconforto leve, hiperemia, prurido, perda da acuidade visual, levando à cegueira irreversível em alguns casos. A fisiopatologia desse processo está estritamente relacionada à ação citotóxica e/ou pró-inflamatória de tais agentes sobre os diferentes componentes do sistema óptico, as quais resultam nas manifestações clínicas supracitadas em indivíduos acometidos (MacNAMEE, et al. 2009; WILSON; AHEARNE; HOPKINSON, 2015).

Considerando-se as bases mecânicas do processo de irritação ocular, a córnea é o componente óptico mais estudado para a compreensão de tal alteração patológica. Estudos mostram que a profundidade do dano nesse tecido se correlaciona diretamente ao grau de severidade do agente irritante, sendo que a citotoxicidade sobre os diferentes tipos celulares presentes nesse tecido é o principal parâmetro alterado mediante a exposição a agressores químicos e físicos (MAURER et al., 2001; MAURER; PARKER; JESTER, 2002).

Admite-se que o mecanismo de morte celular desencadeado, bem como os tipos celulares acometidos e os processos histopatológicos resultantes podem ser diferentes quando se considera a natureza química do agente causal. Substâncias com potencial oxidante atuam por meio da lise das células epiteliais da córnea, o que ocorre mediante a depleção dos diferentes sistemas antioxidantes presentes no tecido ocular (CROUCH; LING; HAYDEN, 1988; HAYDEN et al., 1990). Surfactantes iônicos e não-iônicos, por sua vez, estão associados à precipitação de proteínas e, em alguns casos, lise celular, resultando na redução do tamanho dos corneócitos e, conseqüentemente, da espessura epitelial, bem como com o acometimento de fibroblastos do estroma (MAURER et al., 2001; MAURER; PARKER; JESTER, 2002).

Substâncias alcalinas tendem a induzir a saponificação dos fosfolipídeos de membrana, o que conduz à ruptura das células epiteliais, enquanto agentes ácidos atuam por meio da coagulação e precipitação de proteínas. Os valores de pH também influenciam na ação irritante de substâncias catiônicas, as quais em meio alcalino reagem com os grupamentos carboxila do colágeno e dos glicosaminoglicanos presentes no estroma, resultando em maior severidade e profundidade de dano (WAGONER, 1997). Solventes orgânicos, em contrapartida, atuam sobre a córnea de maneira imediata, causando perda total

ou parcial das células epiteliais, não induzindo grandes alterações no estroma por não possuírem reatividade química com os componentes teciduais desse estrato (GRANT, 1974; MAURER et al. 2001; ESKES, 2005).

O estroma possui importante papel na resposta tecidual a agentes irritantes, pois substâncias que comprometam a viabilidade ou metabolismo dos fibroblastos, bem como o arranjo das fibras colágenas da matriz extracelular podem comprometer a transparência da córnea e, conseqüentemente, a chegada de luz na retina, culminando em diminuição da acuidade visual (JESTER et al., 1999). O reparo de lesões estromais oriundas de agressões químicas ou físicas ocorre através da ação dos fibroblastos, os quais passam por alterações morfofuncionais e participam da síntese de colágeno tipo I e IV, bem como do remodelamento da matriz extracelular por meio da expressão de enzimas como a collagenase e diversos tipos de metaloproteases, culminando em alguns casos no processo de cicatrização e fibrose local (FINI, 1999).

Além das alterações histopatológicas mencionadas, a inflamação deve ainda ser considerada como o evento final que sucede tais observações e contribui para as manifestações clínicas da toxicidade ocular. A injúria química ocasiona a liberação de fatores quimiotáticos pelas células epiteliais e estromais, culminando na migração de leucócitos para o estroma, o que é facilitado pela expressão de moléculas de adesão, podendo ser observado um padrão composto por células mononucleares e polimorfonucleares (MICHAEL; WAGONER, 1997).

1.2.2 – Avaliação *in vivo* do potencial de irritação ocular de substâncias químicas e misturas:

De acordo com o *Test Guideline* N.405 da OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*) (2017), que dispõe sobre o teste de irritação/corrosão ocular aguda, substâncias ou misturas irritantes são caracterizadas por causarem danos reversíveis a uma ou mais das estruturas oculares (córnea, conjuntiva e íris), de modo que para os corrosivos, tais alterações mostram-se irreversíveis (OECD, 2017a).

Devido à localização, estrutura fisiológica e sensibilidade do globo ocular, a exposição a substâncias químicas de diversas classes, incluindo medicamentos de uso oftálmico, cosméticos, produtos de limpeza e higiene pessoal, pode ocorrer de maneira acidental ou incidental, de modo que a irritação ocular tornou-se um parâmetro de avaliação mandatória

para qualquer substância, material ou produto que possa vir a entrar em contato com os olhos (WILSON; AHEARNE; HOPKINSON, 2015).

Tal obrigatoriedade foi historicamente estabelecida mediante a ocorrência de eventos que demandaram pela garantia da segurança de produtos de modo prévio à sua inserção no mercado. O marco da toxicologia ocular que primou por tal concepção ocorreu em 1933, quando uma consumidora de 38 anos de idade tornou-se irreversivelmente cega após a utilização de um rímel que continha em sua composição o corante sintético parafenilenodiamina, o qual induziu uma reação ocular que se iniciou com hipersensibilidade, progredindo para ceratite bilateral com secundária infecção bacteriana. Tal fato motivou agências reguladoras internacionais, como o FDA (*Food and Drug Administration*) e o EPA (*Environmental Protection Agency*) a legislarem sobre a análise da toxicidade ocular de produtos previamente a sua livre comercialização, o que requeria o desenvolvimento de um ou mais métodos para a realização de tais avaliações (WILHELMUS, 2001).

Diante desse cenário, em 1944 o farmacologista John Draize publicou um estudo no qual descreveu um protocolo para a avaliação do potencial de irritação e corrosão dérmica e de membranas mucosas, o qual foi adotado pelo FDA em 1964 como método padrão para a investigação de tais parâmetros. A partir de então, o teste de Draize, como passou a ser chamado, foi eleito mundialmente como método de escolha para análises toxicológicas oculares e dérmicas, sendo amplamente utilizado para cosméticos, medicamentos, misturas agroquímicas, produtos de limpeza, entre outros (WILHELMUS, 2001).

O teste consiste previamente na administração de analgésicos e anti-inflamatórios nos animais utilizados, com posterior aplicação de 0,1mL ou 0,1g da amostra diretamente no saco conjuntival de um dos olhos de coelhos albinos, a qual permanece em contato com o mesmo por até 24 horas. A primeira avaliação deve ser realizada uma hora após a exposição, seguindo-se com avaliações diárias que devem se estender pelo período de 21 dias. Durante esse período, devem ser observadas alterações na córnea (opacidade, ulcerações), íris (edema, hemorragia) e conjuntiva (hiperemia, eventos vasculares), as quais devem ser pontuadas para a determinação do score e, consequentemente, da classificação da substância (DRAIZE; WOODARD; CALVERY, 1944; OECD, 2017a).

De acordo com as observações realizadas no teste, as substâncias químicas ou misturas podem ser classificadas em diferentes categorias, com base no grau de severidade dos eventos observados, bem como na reversibilidade nos mesmos durante o período de avaliação. Apesar de diferentes países adotarem sistemas distintos de classificação para a

toxicidade ocular, o modelo de classificação adotado pela OECD baseia-se no proposto pelo *United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* (UN GHS), adotado em 2003, no qual as substâncias são inseridas em duas categorias distintas, segundo o grau de toxicidade ocular. A Categoria 1 compreende substâncias ou misturas que induzem danos oculares severos, os quais incluem opacidade da córnea, irite e alterações vasculares que não são reversíveis dentro de 21 dias. A Categoria 2, por sua vez, é dividida em duas sub-categorias distintas, de modo que a Categoria 2A engloba substâncias que resultam em danos reversíveis dentro de 21 dias e a Categoria 2B inclui os irritantes leves, que provocam irritação reversível dentro de 7 dias. Substâncias não irritantes são denominadas como Não Categorizadas, de acordo com esse sistema (Tabela 1) (WILSON; AHEARNE; HOPKINSON, 2015).

Tabela 1: Classificação proposta pelo Sistema Global de Harmonização na classificação e rotulagem de substâncias químicas, considerando o potencial de irritação/corrosão ocular.

Classificação – Globally Harmonized System (UN GHS)		
Categoria 1	Substâncias que causam danos severos/irreversíveis na córnea, íris ou conjuntiva	Substâncias que ocasionam dano ocular
Categoria 2A	Substâncias que causam irritação severa que se mostra reversível dentro dos 21 dias de avaliação	Irritantes moderados
Categoria 2B	Substâncias que causam irritação leve que se mostra reversível dentro de 7 dias	Irritantes leves
Não-categorizadas	Ausência de sinais de irritação	Não-irritantes

O teste proposto por Draize auxiliou, irrefutavelmente, no preenchimento de várias lacunas existentes no âmbito da avaliação de toxicidade ocular de produtos farmacêuticos. Contudo, desde que foi proposto, tal método passou por muitos questionamentos pela comunidade científica, os quais se basearam principalmente nos aspectos éticos e na baixa capacidade preditiva do teste (ADRIAENS et al. 2014). Dentre as limitações, destacam-se a falta de reprodutibilidade, a natureza subjetiva das avaliações, as diferenças anatômicas do sistema ocular dos animais utilizados em relação aos humanos, a exposição a altas doses das

substâncias teste, refletindo em uma elevada taxa de resultados falso-positivos, sobretudo na falha em identificar mecanismos celulares e moleculares dos toxicantes avaliados. (DAVILA et al. 1998; CURREN; HARBELL, 2002; MAURER et al. 2002; PRINSEN, 2006; ADRIAENS et al. 2014; WILSON; AHEARNE; HOPKINSON, 2015) .

Visando estabelecer um refinamento para o teste de Draize, em 1980 Griffith e colaboradores desenvolveram um protocolo no qual alterações no método original foram propostas, denominado *Low-volume eye-irritation test* (LVET). A diferença consiste na utilização de um volume menor de amostra (0,01mg para sólidos e 0,01mL para líquidos), bem como no local de aplicação, que passa a ser diretamente sobre a superfície da córnea e não no saco conjuntival do animal. Da mesma forma, as alterações patológicas são observadas na córnea, conjuntiva e íris, sendo também analisados os eventos histopatológicos após o término do estudo. Apesar de ser considerado menos estressante e mais preciso, o LVET fornece uma taxa relativamente alta de resultados falso-negativos e também é criticado por se tratar de um método que emprega o uso de animais para avaliação (ESKES et al., 2005; ICCVAM, 2010).

1.2.3 – Métodos alternativos disponíveis para a avaliação da toxicidade ocular:

De acordo com o pesquisador Thomas Hartung (2009) do Centro de Estudos em Métodos Alternativos (CAAT - *Center for Alternatives to Animal Testing*) do instituto americano John Hopkins, praticamente nenhum outro campo da ciência permaneceu por um período tão longo sem avanços metodológicos quanto a toxicologia. Os métodos atualmente empregados e tidos como padrão ouro para avaliação de risco, em sua grande maioria, baseiam-se na utilização de animais e apresentam diversas limitações preditivas quando se considera a exposição humana a xenobióticos (HARTUNG, 2009).

Mediante os avanços tecnológicos nos diferentes campos das ciências biomédicas, incluindo o aprimoramento de técnicas celulares e moleculares, o uso contemporâneo de tais metodologias de avaliação conservadoras torna-se insustentável, uma vez que os toxicantes necessitam de investigações mecanísticas que, na maioria dos casos, não podem ser realizadas em modelos animais (KREWSKI et al. 2010). Nesse contexto, os conceitos de *Mode of Action* (MoA) e *Adverse Outcome Pathways* (AOP) estabelecem que é indispensável o conhecimento das vias celulares, moleculares e bioquímicas pelas quais determinado toxicante desempenha sua ação tóxica, destacando-se a necessidade

de métodos de avaliação mais refinados que contemplem tais parâmetros (SEWEL et al., 2017).

As limitações preditivas tornaram a utilização do teste de Draize insustentável e, apesar de ter sido adotado mundialmente como padrão ouro para avaliação da toxicidade ocular, diversos métodos substitutivos para tal foram propostos ao longo das últimas décadas. Tais metodologias são baseadas em ensaios *ex vivo*, *in vitro* e *in silico*, sendo em sua grande maioria validadas e adotadas pelas agências reguladoras internacionais em substituição ao teste *in vivo* (LOTZ et al., 2016).

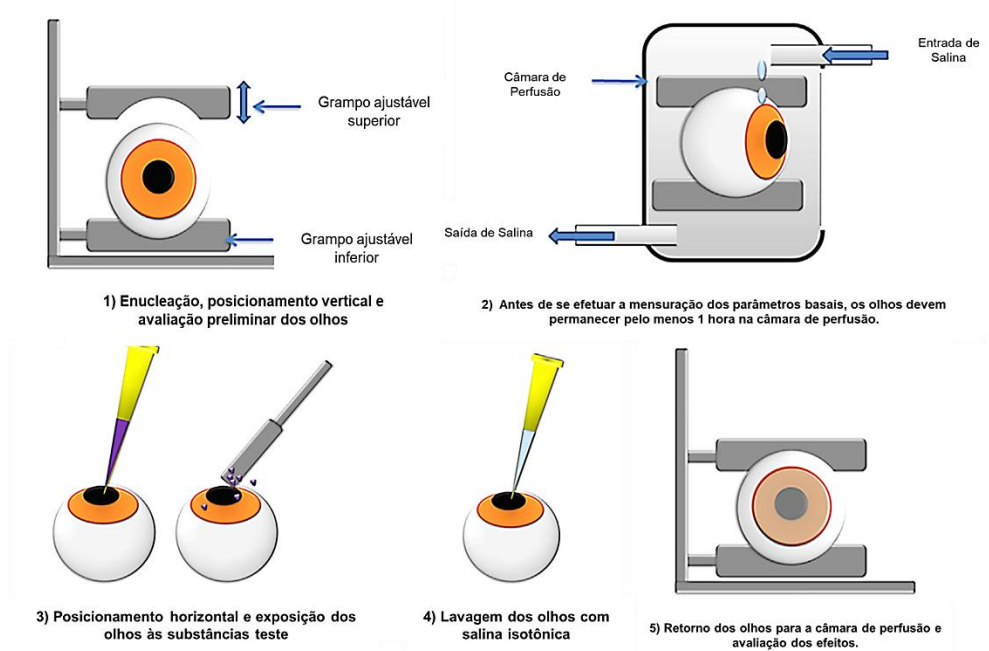
1.2.3.1 – Métodos *ex vivo*:

Os métodos *ex vivo* compreendem ensaios organotípicos que utilizam tecidos ou órgãos isolados provenientes de animais, de modo que os últimos não são utilizados como objeto de estudo. O primeiro método dessa classe proposto para tais avaliações foi desenvolvido por Burton e colaboradores em 1981, no qual eram utilizados olhos isolados de coelho, os quais eram colocados em um aparato de perfusão onde eram expostos às substâncias teste por 10 segundos, sendo posteriormente lavados e avaliados em relação à espessura da córnea e aumento da permeabilidade da mesma. Contudo, apesar de causar menos sofrimento e desconforto aos animais, os mesmos ainda eram eutanasiados unicamente para a execução do teste, não sendo observado nenhum ganho em relação ao teste de Draize, considerando-se o número de animais empregados (PRINSEN et al., 2017).

Tal protocolo foi posteriormente adaptado por Prinsen e Koëter em 1993 para utilização com olhos de galinha isolados, os quais geralmente são oriundos de material de rejeito da indústria alimentícia, e hoje compõem o Guia de Teste n. 438 da OECD. O método consiste na coleta das cabeças dos animais abatidos e no transporte imediato destas ao laboratório, imersas em solução salina isotônica. A dissecação e enucleação dos olhos deve ser realizada e os mesmos devem ser alocados em um aparato de perfusão, sendo expostos à substância teste (0,03mL ou 0,03g) por 10 segundos (Figura 3). Após a exposição, os olhos devem ser avaliados nos tempos de 30, 75, 120, 180 e 240 minutos, sendo observadas alterações na córnea como opacidade, *swelling* ou inchaço tecidual e permeabilidade, mediante utilização de solução de fluoresceína. Tais alterações são utilizadas para a classificação da substância teste como pertencente à Categoria 1 ou não irritante (OECD, 2013a; PRINSEN et al., 2017). Adicionalmente, a

avaliação histopatológica da córnea após o término do ensaio pode ser realizada, contribuindo para uma melhor distinção de substâncias pertencentes às Categorias 1 e 2A (CAZELLE et al., 2014).

Figura 3: Representação esquemática do ensaio de irritação ocular com olho isolado de galinha (ICE).



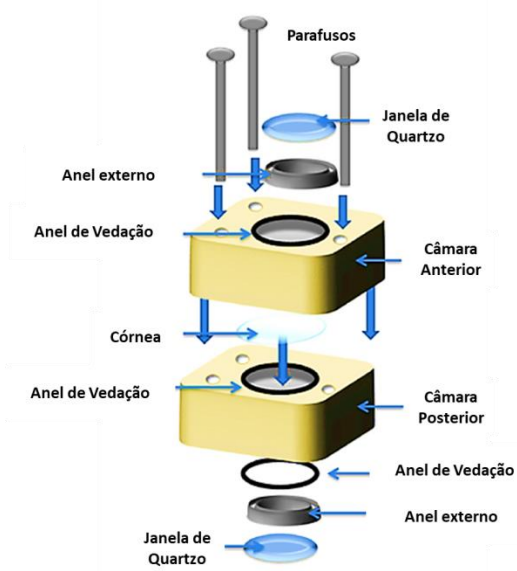
Fonte: Adaptado de WILSON; AHEARNE; HOPKINSON (2015).

O Teste da Opacidade e permeabilidade da Córnea Bovina (BCOP – *Bovine Cornea Opacity and Permeability*) consiste em outro método organotípico empregado na avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular de substâncias, que constitui o Guia de Teste n. 437 da OECD. Do mesmo modo que o ensaio de ICE mencionado anteriormente, o BCOP baseia-se na utilização de olhos bovinos oriundos de abatedouros, os quais são coletados imediatamente após o abate dos animais. Contudo, diferentemente do ICE, para o ensaio de BCOP apenas a córnea isolada é utilizada para a realização da exposição à substância teste, sendo colocada em um *holder* específico que é composto por uma câmara anterior e uma posterior, as quais são preenchidas com meio de cultura no momento de realização do ensaio (Figura 4) (OECD, 2013b).

A amostra a ser testada é adicionada na câmara anterior do aparato, permanecendo em contato com a porção epitelial da córnea, de modo que o período de exposição pode variar quando se considera o estado físico da substância-teste. Após a exposição, a opacidade da córnea é avaliada em um dispositivo denominado

opacitômetro, que projeta um feixe de luz através do tecido e detecta a luminosidade que consegue atravessar o mesmo, fornecendo um valor numérico de opacidade. Adicionalmente, alterações na permeabilidade da córnea devem ser avaliadas mediante a adição de solução de fluoresceína na câmara anterior no *holder*, cuja difusão para câmara posterior é quantificada mediante coleta do meio presente nesse compartimento após a incubação e também se correlaciona diretamente à severidade do dano tecidual (VERSTRAELEN et al., 2013; VERSTRAELEN et al., 2017). A opacidade em conjunto com a permeabilidade permite o cálculo do *In Vitro Score* (IVIS), utilizado para a classificação da substância teste. Após o término do ensaio, a córnea bovina pode ser ainda fixada e processada para avaliação histopatológica, o que aumenta a sensibilidade e o poder preditivo do método (OECD, 2013b; VERSTRAELEN et al., 2013; VERSTRAELEN et al., 2017).

Figura 4: Esquema de montagem do *holder* para o ensaio de Opacidade e Permeabilidade da Córnea Bovina (BCOP).



Fonte: Adaptado de WILSON; AHEARNE; HOPKINSON (2015).

Outro modelo organotípico, porém que não se baseia na utilização de tecidos oculares para avaliação, consiste no uso da Membrana Corioalantóide de ovos de galinha embrionados, denominado HET-CAM (*Hen's Egg Test on Chorioallantoic Membrane*). A membrana corioalantóide é formada mediante a permanência dos ovos embrionados em incubadora a 35°C por 9-10 dias e possui um arranjo vascular semelhante ao encontrado na mucosa da conjuntiva ocular. Desse modo, o método fundamenta-se na exposição da

membrana a agentes irritantes com posterior observação dos eventos vasculares desencadeados, sendo observada a ocorrência de alterações como lise, hemorragia e coagulação, durante um período de observação de cinco minutos. Com base na observação no padrão de alterações vasculares em função do tempo, a substância teste pode ser classificada como irritante ou não irritante. Apesar de não ser mundialmente aceito do ponto de vista regulatório por todas as agências regulatórias, o HET-CAM é recomendado pelo ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*), possuindo relevância científica para a obtenção de dados referentes ao potencial de irritação ocular de substâncias e misturas. Contudo, tal metodologia encontra-se sob validação formal, a qual foi proposta pelo Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM) e está sendo executada pela Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA) (STEILING et al., 1999; ESKES et al., 2005; ICCVAM 2010; WILSON; AHEARNE; HOPKINSON, 2015).

1.2.3.1 – Métodos *in vitro*:

Os métodos *in vitro* para avaliação da toxicidade ocular baseiam-se na utilização de modelos experimentais que dispensam o uso de órgãos ou tecidos de origem animal para sua realização. Tais ensaios têm como princípio a avaliação de parâmetros da função celular após a exposição a agentes irritantes, fornecendo indícios do potencial citotóxico de tais substâncias, o qual, geralmente se correlaciona diretamente ao potencial de irritação (LOTZ et al., 2016).

Dentre os testes *in vitro* utilizados para a identificação de substâncias que ocasionam dano ocular (Categoria 1) ou não irritantes, o *Short Time Exposure* (STE) integra o Guia de Teste n. 491 da OECD e baseia-se na utilização da linhagem de corneócitos de coelho SIRC, tendo como princípio a avaliação da viabilidade celular após um curto tempo de exposição à substância teste. A amostra deve ser preparada em duas concentrações distintas (5 e 0,05%) e as células, previamente distribuídas em placas de 96 poços, estando com cerca de 80-90% de confluência, devem ser expostas por cinco minutos às diluições supracitadas. Após a exposição, a viabilidade celular deve ser imediatamente avaliada utilizando-se o método de redução do MTT, e os valores de viabilidade celular calculados em relação ao controle negativo são utilizados para a classificação da substância. O teste de STE permite a identificação de substâncias que ocasionam dano ocular (Categoria 1) caso a viabilidade celular correspondente a ambas as concentrações seja maior que 70%, e não irritantes (Não

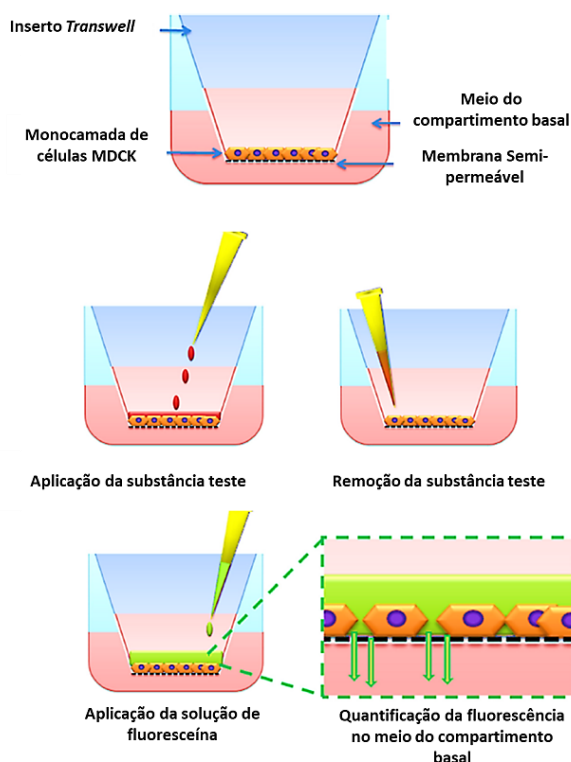
categorizadas) caso esses valores sejam menores que 70% (TAKAHASHI et al., 2008; TAKAHASHI et al., 2011; OECD, 2017b; ADRIAENS, 2017).

Outro método *in vitro* utilizado para avaliação de irritantes oculares é a avaliação da atividade metabólica da linhagem de fibroblastos murinos L929 após a exposição a tais agentes. Tal verificação é feita utilizando-se um equipamento específico denominado *Cytosensor Microphysiometer* (CM), o qual quantifica a taxa metabólica mediante detecção de alterações nos gradientes de pH do meio extracelular. Desse modo, as células são expostas a diferentes concentrações da substância-teste e, com base na variação das respostas, a concentração que ocasiona redução de 50% na taxa metabólica (MRD₅₀) deve ser calculada, a qual é utilizada para a classificação da amostra (OECD, 2012a; LOTZ, et al., 2016). O método CM foi publicado em 2012 como um *draft* da OECD e está sob avaliação para aceitação regulatória, sendo considerado o primeiro método alternativo para irritação ocular cujo desenvolvimento aliou a análise de evidência com base em dados obtidos retrospectivamente, a uma plataforma biotecnológica quantitativa, contribuindo para o desenvolvimento de abordagens baseadas em evidência para a avaliação de toxicidade ocular (HARTUNG et al., 2010).

O ensaio de liberação de fluoresceína (FL) (*Fluoresceine Leakage*), apesar de também utilizar um sistema de cultivo celular em monocamada, permite a avaliação da função de barreira epitelial após a exposição a agentes irritantes. O método consiste no cultivo da linhagem de células epiteliais tubulares MDCK CB997 em insertos semipermeáveis até a obtenção de uma monocamada confluenta, a qual apresenta junções intercelulares semelhantes às encontradas no epitélio da córnea. Depois de obtida, a monocamada de células é exposta à substância ou mistura teste em cinco diferentes concentrações por 1 minuto, sendo em seguida incubada com solução de fluoresceína no compartimento apical do sistema por 30 minutos. Após esse período, o meio presente no compartimento basal é coletado e o percentual de fluoresceína que transpôs a barreira epitelial é quantificado, sendo, geralmente, diretamente proporcional ao potencial irritante da substância (Figura 5) (COTTIN; ZANVIT, 1997; OECD, 2012b).

O princípio do método de FL baseia-se na ação nociva de agentes irritantes sobre a função de barreira epitelial, mediante ação sobre a viabilidade celular e/ou comprometimento das interações intercelulares. Tal metodologia permite a identificação limitada de substâncias pertencentes à Categoria 1, integrando o Guia de Teste n. 460 da OECD (COTTIN; ZANVIT, 1997; OECD, 2012b; VERSTRAELEN et al., 2017).

Figura 5: Fluxograma do teste de liberação de fluoresceína aplicado à classificação de substâncias que promovem dano ocular (Categoria 1) e não irritantes.



Fonte: Adaptado de WILSON; AHEARNE; HOPKINSON (2015).

Dentre os métodos *in vitro* existem ainda testes que, apesar de não terem sido formalmente validados, possuem relevância científica e aplicabilidade para avaliação da toxicidade ocular. Por exemplo, o ensaio hemolítico feito com eritrócitos humanos permite a avaliação de efeitos nocivos de substâncias ou misturas sobre a membrana plasmática, mediante a quantificação de oxi-hemoglobina liberada após a exposição dessas células a concentrações decrescentes da amostra, a qual deve ser realizada por espectrofotometria UV/Vis. Mediante uma resposta concentração-dependente, a concentração da amostra que causa lise de 50% dos eritrócitos (H_{50}) pode ser determinada e utilizada para posterior correlação com o *score in vivo* fornecido pelo teste de Draize (PAPE et al., 1987; PAPE et al., 1999; LOTZ et al., 2016).

Ensaio *in vitro* que tenham como princípio o efeito tóxico de substâncias irritantes sobre os elementos de matriz extracelular, sem a utilização de elementos celulares, também podem ser aplicados na avaliação da toxicidade ocular. O teste IRRITECTION® encontra-se sob validação e consiste em uma mistura complexa de macromoléculas composta por glicoproteínas, lipídeos, carboidratos e outros componentes de baixo peso

molecular que, mediante reconstituição, adquire propriedades ópticas semelhantes à da córnea humana íntegra (ESKES et al., 2014). Mediante exposição a irritantes oculares, nota-se o desenvolvimento de turbidez na dispersão que outrora mostrava-se translúcida, o que ocorre em decorrência da desnaturação proteica que compromete o arranjo tridimensional e, conseqüentemente, interfere negativamente nas propriedades ópticas da mistura. Tal efeito simula a opacidade observada na córnea após a exposição a substâncias que ocasionam dano ocular ou a agentes irritantes, a qual pode ser quantificada por espectrofotometria de UV/Vis e correlacionada com a classificação da substância teste. Apesar de não ser ainda aceito do ponto de vista regulatório, o estudo europeu de validação do ensaio IRRITECTION[®] demonstrou boa reprodutibilidade intra e interlaboratorial, sendo adequado para identificação de irritantes severos e corrosivos (Categoria 1) (ESKES et al., 2014; WILSON; AHEARNE; HOPKINSON, 2015).

Considerando-se os métodos alternativos disponíveis para a avaliação da toxicidade ocular (Tabela 2), nota-se que nenhuma metodologia isolada é capaz de substituir integralmente o teste em animais. Contudo, tais ensaios podem ser agrupados em plataformas multiparamétricas de avaliação para análise de substâncias mediante uma abordagem em camadas ou *tiered approach*, cujo objetivo consiste na associação metodológica visando otimizar a resolução dos resultados, possibilitando as corretas predição e classificação de amostras desconhecidas (VERSTRAELEN; ROMPAY, 2017).

Existem duas estratégias básicas a serem seguidas para a execução de uma abordagem em camadas no contexto da avaliação de irritação/corrosão ocular. A estratégia *Top-down* deve ser utilizada quando, de posse de informações pré-existent, espera-se que a amostra teste apresente um acentuado perfil de irritação. A abordagem *Bottom-up*, por outro lado, é utilizada quando não se espera uma resposta irritante da substância teste, ou acredita-se que a mesma seja presente um leve ou moderado perfil de toxicidade ocular. Tal associação aumenta a exatidão, precisão e, conseqüentemente, a capacidade preditiva dos métodos alternativos, contribuindo para a correta classificação e rotulagem de substâncias isoladas e misturas (ESKES et al., 2014; VERSTRAELEN; ROMPAY, 2017).

Baseando-se no conceito de abordagem em camadas, em 2017 a OECD publicou um Guia de Teste e Avaliação em Abordagem Integrada (IATA - *Integrated Approach on Testing and Assessment*) para a avaliação do potencial de irritação ocular de substâncias e misturas. Tal guia estabelece que a avaliação da toxicidade ocular deva ser

planejada em três partes sequenciais, sendo consideradas todas as informações já disponíveis na literatura para a substância teste (OECD, 2017c).

A primeira parte da avaliação consiste na avaliação dos dados já existentes sobre a amostra, considerando-se a existência de estudos animais ou *in vitro* previamente realizados, a disponibilidade de dados humanos oriundos de exposições acidentais, bem como da avaliação das propriedades físico-químicas do material a ser testado. Caso a primeira parte conduza a resultados inconclusivos, a segunda parte da IATA baseia-se na avaliação das evidências de risco para a amostra, as quais fornecem subsídio para a execução da terceira parte. Na terceira etapa, as informações oriundas da análise de evidências são utilizadas para selecionar a estratégia de teste a ser empregada na avaliação, de modo que, para substâncias que se espera uma resposta irritante severa ou corrosiva, a abordagem *Top-down* deve ser utilizada e, caso se presuma um perfil não irritante, deve-se adotar a estratégia *Bottom-up* (ESKES et al., 2014; OECD, 2017c; VERSTRAELEN; ROMPAY, 2017).

Para a realização da avaliação, devem ser preferencialmente empregados os métodos alternativos que compõem os guias de teste da OECD. Caso os resultados obtidos não permitam a classificação da substância, métodos alternativos, mesmo que não aceitos pela OECD, devem ser empregados e, em último caso o teste de Draize pode ser utilizado para avaliação (OECD, 2017c).

Tabela 2: Principais métodos alternativos para avaliação de toxicidade ocular de substâncias químicas e misturas.

Método	Domínio de Aplicabilidade	Vantagens	Limitações	Validação	Referências
Teste com Olho Isolado de Galinha – (ICE)	Substâncias Categoria 1 e Não Categorizadas	Método Organotípico; Fácil Execução; Possibilidade de teste de vários tipos de substâncias isoladas ou misturas; Os <i>endpoints</i> são avaliados diretamente na córnea, a qual é a porção do sistema ocular que mais contribui para a obtenção do <i>score in vivo</i> ; Associação com avaliação histopatológica permite uma maior distinção entre substâncias das Categorias 1 e 2.	Impossibilidade de avaliação da reversibilidade do dano; Observações subjetivas, o que requer um analista experiente para a condução do teste; Elevada taxa de resultados falso-negativos para substâncias que ocasionam dano ocular (Categoria 1).	OECD TG 483 (2013)	PRINSEN ET AL., 2017 CAZELLE ET AL., 2014

Teste da Opacidade e Permeabilidade da Córnea Bovina - BCOP	Substâncias Categoria 1 e Não Categorizadas	Método Organotípico; Fácil execução; Avaliação objetiva; Possibilidade de associação com avaliação histopatológica para o aumento da sensibilidade.	Permite a avaliação apenas da córnea isolada; Não permite avaliação de parâmetros de reversibilidade; A córnea bovina apresenta diferenças consideráveis em relação à córnea humana; Limitações para o teste de substâncias sólidas e providas de cor.	OECD TG 437 (2013)	PRINSEN ET AL., 2017 VERSTRAELEN ET AL., 2017
HET-CAM	Não estabelecido	Fácil execução; Baixo custo; Permite a avaliação de parâmetros vasculares mediante exposição aguda.	Limitações para o teste de substâncias insolúveis e providas de cor; Não permite avaliação de parâmetros de reversibilidade/irreversibilidade; Necessidade de um analista experiente.	Sob validação pelo BraCVAM	ICCVAM 2010; WILSON; AHEARNE; HOPKINSON, 2015; PRINSEN ET AL., 2017.
<i>Short Time Exposure (STE)</i>	Substâncias Categoria 1 e Não Categorizadas	Curto período de exposição, mimetizando de modo mais realístico a exposição humana; Permite a avaliação de alguns solventes orgânicos não voláteis (álcoois e cetonas).	Requer testes adicionais para a classificação final; Limitado para se testar substâncias sólidas e insolúveis; Inadequado para o teste de substâncias voláteis.	OECD TG 491 (2017)	TAKAHASHI et al., 2008; TAKAHASHI et al., 2011; ADRIAENS, 2017; OECD, 2017.

<i>Cytosensor Microphysiometer</i>	Substâncias Categoria 1 e Não Categorizadas	Avaliação de parâmetros celulares metabólicos, contribuindo para a elucidação mecanística do efeito tóxico; Desenvolvido com base em levantamento de dados pré-existentes inerentes ao potencial de irritação ocular das substâncias de referência, contribuindo para o desenvolvimento da toxicologia baseada em evidências.	Não permite a avaliação de substâncias insolúveis no meio de cultura; Elevada taxa de resultados falso-negativos; Requer aparelhagem específica para a execução do teste; Alto custo inicial.	Draft OECD sob avaliação (2012)	HARTUNG et al., 2010. LOTZ et al., 2016.
<i>Florescein Leakage (FL)</i>	Categoria 1	Não requer testes adicionais mediante a classificação da substância teste como indutora de dano ocular (Categoria 1); Permite a obtenção de parâmetros mecanísticos ao avaliar a ação da substância teste as junções intercelulares; Fácil implementação e execução.	Não permite a avaliação de substâncias insolúveis, sólidas ou viscosas; Não aplicável para ácidos e bases fortes, fixadores e substâncias voláteis; Limitações para o teste de substâncias providas de cor; Modelo experimental não possui correlação morfofuncional com o tecido ocular; Impossibilidade de avaliação de parâmetros de reversibilidade Elevada taxa de resultados falso negativos.	OECD TG 460 (2017)	ESKES et al., 2005; LOTZ et al., 2016; PRINSEN et al., 2017.

Modelos Biomiméticos de Córnea	Substâncias Não Categorizadas	Elevada reprodutibilidade; Aplicável a substâncias solúveis ou não; Possibilidade de avaliação de substâncias sólidas e líquidas; Empregam células humanas, possibilitando avaliações mecanísticas do processo de toxicidade ocular.	Custo elevado; Não permitem a avaliação de parâmetros de reversibilidade;	OECD TG 492 (2017)	ALÉPÉE et al., 2013; KANDAROVA et al., 2017
Ensaio Hemolítico	Não estabelecido	Fácil execução; Baixo custo.	Modelo experimental não possui correlação morfofuncional com o tecido ocular; Não permite a avaliação de substâncias insolúveis.	Não validado	PAPE et al., 1987; PAPE et al., 1999; ESKES et al., 2005; LOTZ et al., 2016; PRINSEN et al., 2017.
Teste IRRITECTION®	Categoria 1	Fácil execução; Boa reprodutibilidade; Baseado na composição do tecido ocular.	Limitações para o teste de substâncias providas de cor; Subestimação de surfactantes catiônicos; Superestimação de misturas compostas por magnésio e carboxilatos;	Sob validação	ESKES et al., 2005; ESKES et al., 2014; WILSON; AHEARNE; HOPKINSON, 2015.

1.3 – Modelos 3D como ferramenta de avaliação toxicológica

A cultura de células integra um conjunto de técnicas extensivamente empregadas nos mais variados campos da ciência, cujo princípio baseia-se na remoção de células de um determinado tecido e propagação destas *in vitro* em um ambiente artificial, sob condições controladas (ALVES; GUIMARÃES, 2009).

Desde que foi proposta no século XIX, essa técnica passou por inúmeras adequações que permitiram uma melhora na reprodutibilidade, bem como a obtenção de resultados acerca da genômica, proteômica, metabolômica e transcriptômica relacionadas a toxicantes e fármacos (JAROCH; JAROCH; BOJKO, 2018). Nesse contexto, a cultura de células contribuiu de modo direto para o desenvolvimento do conceito de Toxicologia do Século XXI, o qual estabelece que a substituição dos testes em animais pelo uso de sistemas de experimentação com maior poder preditivo, em relação à exposição humana, conduz à obtenção de resultados mais fidedignos (HARTUNG, 2009).

Os sistemas convencionais de cultivo em 2D se destacam pela praticidade, facilidade de manipulação e padronização, homogeneidade da cultura, possibilidade de inserção em plataformas de HTS (*High Throughput Screening*) e reprodutibilidade dos resultados obtidos (ESKES et al., 2017; JAROCH; JAROCH; BOJKO, 2018). Tais sistemas permitem a condução de uma abrangente pluralidade de estudos, como a avaliação da citotoxicidade, permeação de fármacos e toxicantes, expressão gênica, fisiologia e metabolismo celular, entre outros parâmetros que subsidiam o avanço da toxicologia e farmacologia pré-clínicas (AMELIAN et al., 2017).

Não obstante, dada a complexidade da fisiologia tecidual *in vivo*, os sistemas 2D de cultivo celular apresentam limitações que comprometem a similaridade das respostas obtidas *in vitro* em relação às encontradas no organismo humano. Estas limitações baseiam-se na simplicidade desses modelos, que mantêm as células em monocamadas sobre superfícies poliméricas, as quais são desprovidas de diversos fatores presentes no microambiente tecidual original. A baixa densidade celular obtida, a imobilidade do meio de cultivo, a possibilidade de crescimento em um único plano, bem como a inexistência de contato com a matriz extracelular e de estímulos mecânicos, neurais, imunológicos e hormonais são exemplos de fatores que não são idealmente simulados nesses sistemas, mas que, contudo contribuem relevantemente para a capacidade preditiva dos modelos experimentais (AMELIAN et al., 2017; ESKES et al., 2017).

Diante das limitações descritas, o cultivo celular em 3D surgiu como uma alternativa mais elaborada ao sistema convencional, o qual visa suprir as deficiências deste possibilitando a obtenção de modelos experimentais *in vitro* que representem mais fielmente a microarquitetura tecidual. Esse conceito foi inicialmente introduzido na literatura por Emerman e Pitelka (1977), os quais propuseram o cultivo de células epiteliais de glândulas mamárias de roedores em fragmentos flutuantes de gel de colágeno. De acordo com esses autores, o cultivo dessas células em uma interface ar-líquido, em conjunto com estímulos hormonais adicionados ao meio, induziu um maior grau de diferenciação celular, bem como diferenças ultraestruturais que incluíram alterações nos padrões de distribuição organelar. Adicionalmente, esse estudo evidenciou ainda a importância da adição de elementos de matriz extracelular ao sistema de cultivo, salientando a importância das interações célula-matriz para a diferenciação, função e polarização epitelial (EMERMAN; PITELKA, 1977).

Desde então, os métodos de cultura celular em 3D foram aprimorados e, ao longo das últimas décadas, diferentes modelos foram propostos para utilização nas diferentes áreas das ciências biomédicas, de modo que várias modalidades da técnica podem ser empregadas de acordo com a finalidade almejada. Tais modelos são construídos utilizando-se *scaffolds* compostos por biopolímeros e/ou elementos de matriz extracelular, cuja função é fornecer sustentação para o crescimento celular em diferentes planos, bem como maximizar o contato célula-célula e célula-matriz (LELIÈVRE; KWOK; CHITTIBOYINA, 2017). Diferentes tipos de *scaffolds* podem ser atualmente empregados para esse fim, destacando-se os hidrogéis, as matrizes derivadas de células e os tecidos e órgãos descelularizados (FITZGERALD et al., 2015).

Em relação às plataformas de cultivo celular em 3D disponíveis atualmente, os esferoides celulares, a cultura em *scaffolds* porosos e os sistemas microfluídicos são os mais utilizados no âmbito da toxicologia experimental (FITZGERALD et al., 2015).

Os esferoides celulares consistem em agregados esféricos compostos por células em diferentes estágios proliferativos e que podem ou não conter biopolímeros ou elementos de matriz extracelular que viabilizem sua obtenção. A construção desses modelos pode ser feita com um ou mais tipos celulares, de modo que o contato célula-célula é maximizado nesse sistema de cultivo, devendo ser considerada a capacidade de organização de cada linhagem celular empregada nesse tipo de arranjo tridimensional (ZANONI et al., 2016). Os esferoides têm sido principalmente empregados no estudo da

biologia do câncer pelo fato de mimetizarem o microambiente tumoral, inclusive pela formação de centros necróticos que se formam em decorrência da hipóxia ocasionada pela alta taxa de proliferação celular periférica, o que conduz à heterogeneidade do tecido e, conseqüentemente pode comprometer o *drug delivery* e a eficácia terapêutica dos agentes quimioterápicos (KUNZ-SCHUGHART et al., 2004).

Na toxicologia experimental, os esferoides têm perdido aplicabilidade por não mimetizarem a polarização e a microarquitetura tecidual, por se tratarem apenas de aglomerados celulares. Contudo, tais modelos são ainda preferíveis em relação aos sistemas 2D, sendo utilizados principalmente na investigação do metabolismo e hepatotoxicidade de substâncias, mediante a utilização de esferoides de hepatócitos, bem como da neurotoxicidade de xenobióticos, através de testes conduzidos com organoides cerebrais (TONG et al., 2015; TERRASSO et al., 2015).

Os modelos teciduais biomiméticos, por sua vez, mostram-se estruturalmente mais complexos e refletem com maior autenticidade o microambiente tecidual. Obtidos geralmente mediante o cultivo celular em interface ar-líquido com a utilização de insertos *transwell*, tais modelos são compostos por um ou mais tipos celulares, bem como por componentes de matriz próprios do tecido original, o que combinado ao cultivo com meios quimicamente definidos confere ao sistema características morfofuncionais muito semelhantes às encontradas *in vivo* (AMELIAN, 2017). Diversos tipos de tecido epitelial já foram reconstruídos *in vitro* e empregados em estudos farmaco-toxicológicos, incluindo o epitélio oral (KLAUSNER et al., 2007), respiratório (REN; DAINES, 2011), ocular (ALEPPE et al., 2013), vaginal (COSTIN et al., 2011), intestinal (JIROVA et al., 2015) e cutâneo (ZHANG; MICHNIAK-KOHN, 2012).

Esses modelos, além de utilizados no meio acadêmico, são também comercializados por empresas de biotecnologia internacionais, sendo produzidos sob elevados padrões de boas práticas de cultivo celular, o que garante reprodutibilidade e aceitação regulatória dos resultados obtidos mediante utilização dos mesmos (AMELIAN et al., 2017).

Com os avanços tecnológicos dos campos da microfluídica, fotolitografia, impressão de microcontato e bioimpressão, os modelos teciduais biomiméticos passaram por um processo de miniaturização e atualmente podem ser reconstruídos em chips, de modo a constituir os *organs-on-chip*. Além dos elementos celulares e extracelulares, esses modelos possuem o diferencial de serem mantidos em sistemas dinâmicos de

cultivo, nos quais os meios são constantemente substituídos, mimetizando a biodistribuição tecidual de nutrientes e outros elementos *in vivo* (HUH; HAMILTON; INGBER, 2011; SHULER, 2017). Adicionalmente, é possível realizar a inserção de estímulos mecânicos a esses microssistemas, de modo a simular a dinâmica do tecido original, o que tem se mostrado crucial para o desenvolvimento e diferenciação celular (ALFORD et al., 2010; SHULER, 2017).

Uma vez que esses sistemas possuem a microarquitetura e a funcionalidade semelhantes às do tecido primário, atualmente busca-se a integração de vários desses compartimentos, para a criação do conceito de *human-on-a-chip*. Dessa forma, vários microssistemas, cada qual construído com os elementos representantes de diferentes órgãos, são integrados por meio de canais microfluídicos que simulam o sistema circulatório, de modo a possibilitar a avaliação dinâmica da absorção, metabolismo e excreção de xenobióticos, bem como possíveis efeitos e mecanismos de ação destes simultaneamente em sistemas biológicos distintos (SUNG et al., 2010; HUH; HAMILTON; INGBER, 2011; ZHANG; RADISIC, 2017).

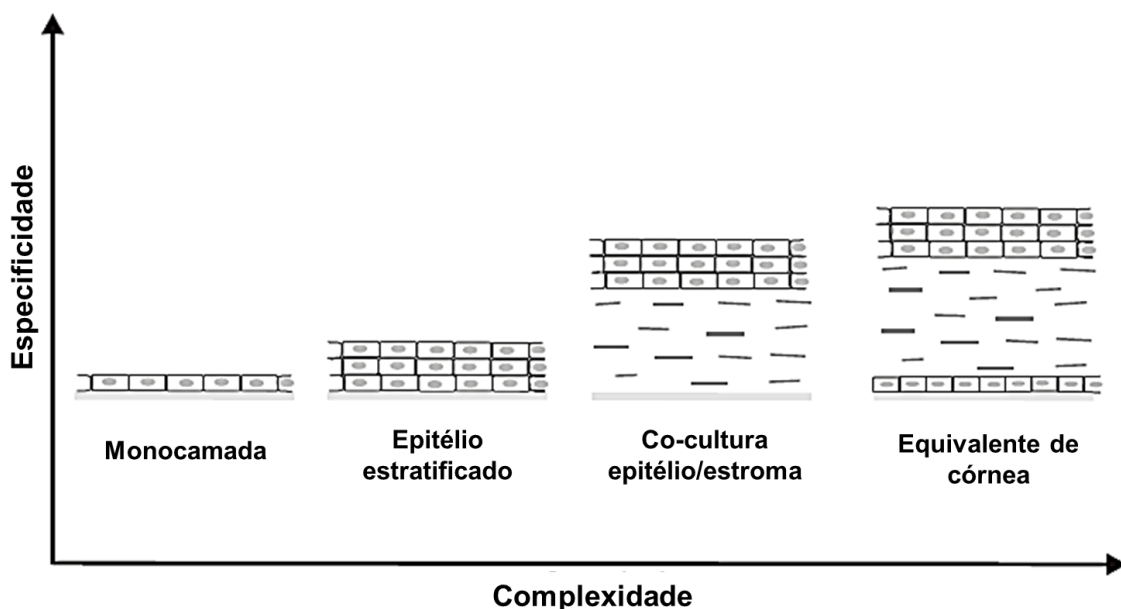
1.3.1 - Modelos epiteliais 3D no contexto da avaliação da toxicidade ocular:

Considerando-se a aplicabilidade dos métodos de cultivo em 3D, tais modelos têm sido extensivamente empregados para a avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular de substâncias isoladas e misturas, tanto para fins científicos quanto regulatórios (VERSTRAELEN; ROMPAY, 2017). Considerando-se o grau de complexidade tecidual, vários modelos biomiméticos de córnea já foram descritos na literatura, desde sistemas epiteliais estratificados monocelulares até co-culturas de epitélio e estroma, bem como equivalentes de córnea nos quais são cultivadas as três principais camadas desse tecido (epitélio, estroma e endotélio). Vale ressaltar ainda que, quanto maior a complexidade dos modelos 3D, maior a especificidade destes em identificar agentes irritantes, com base na avaliação dos efeitos sobre os diferentes componentes teciduais (Figura 6) (HUHTALA et al., 2008).

O primeiro modelo epitelial produzido para tal finalidade foi proposto pela empresa americana de biotecnologia MatTek, denominado EpiOcular™, o qual é construído com queratinócitos epidérmicos primários humanos mantidos em condições *serum-free*, os quais mediante o cultivo em interface ar-líquido se organizam de modo a formar um epitélio estratificado, morfológicamente semelhante ao encontrado na córnea humana

(Figura 7) (STERN et al., 1998). Apesar de ser produzido com células não provenientes do sistema ocular, tal modelo apresenta características morfofuncionais do epitélio da córnea e tem sido utilizado com êxito para a avaliação, classificação e rotulagem de substâncias e misturas em relação ao potencial de toxicidade ocular (KANDAROVA et al., 2017).

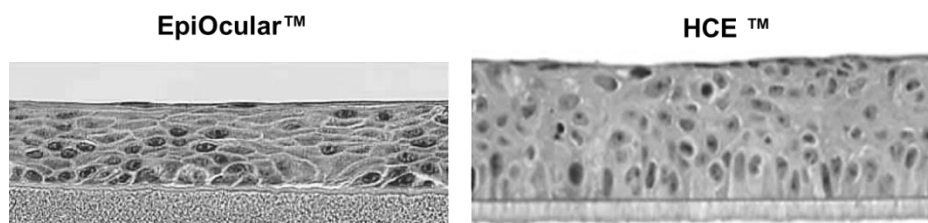
Figura 6: Variação do poder preditivo dos modelos biomiméticos de córnea em função da complexidade tecidual obtida *in vitro*.



Fonte: Adaptado de HUHTALA et al., 2008.

O modelo HCE™, por sua vez, produzido e comercializado pela empresa SkinEthic também tem sido empregado internacionalmente para a avaliação de risco e rotulagem de produtos. Diferentemente do EpiOcular™, o HCE™ é construído com células epiteliais de córnea humana imortalizadas cultivadas em uma interface ar-líquido, as quais se organizam sob a forma de epitélio estratificado semelhante ao encontrado na superfície ocular (Figura 7) (ALÉPÉE et al., 2013).

Figura 7: Fotomicrografias dos modelos biomiméticos de córnea EpiOcular™ e HCE™, produzidos e comercializados pelas empresas internacionais MatTek e SkinEthic, respectivamente.



Fonte: Adaptado de VERSTRAELEN; ROMPAY, 2017.

Devido à ampla utilização dos modelos EpiOcular™ e HCE™ internacionalmente tanto no meio acadêmico quanto industrial, esses modelos foram submetidos ao processo de validação formal e hoje integram o Guia de Teste n. 492 da OECD, adotado em outubro de 2017, sendo aceitos do ponto de vista regulatório para a classificação e rotulagem de substâncias que não requerem classificação no sistema UN GHS (não irritantes) (OECD, 2017d). O teste baseia-se na exposição direta da superfície epitelial dos modelos às substâncias teste, líquidas ou sólidas, com subsequente avaliação da viabilidade tecidual, de modo que a classificação da amostra é feita mediante os resultados fornecidos por esse parâmetro (ALÉPÉE et al., 2013; KANDAROVA et al., 2017; OECD, 2017d).

Além dos modelos supracitados que já passaram por validações e são hoje regulatoriamente aceitos, a utilização de diferentes sistemas 3D para a avaliação de toxicidade ocular já foi relatada na literatura. A construção de modelos de epitélio estratificado com células epiteliais primárias e imortalizadas de córnea já foi relatada tanto para avaliação de toxicidade ocular quanto para estudos de permeação e absorção transepitelial, nos quais se constatou elevada similaridade com o tecido original (TOROPAINEN et al., 2001; JUNG et al., 2011; KATOH et al., 2012).

De modo mais complexo, modelos biomiméticos denominados de hemi-córnea são obtidos mediante o co-cultivo de células epiteliais sobre o estroma, o qual possui geralmente fibroblastos inseridos em uma matriz de colágeno tipo I (PARNIGOTTO et al., 1998; GERMAIN et al., 1999; MEWES et al., 2017). Tais sistemas mostram-se mais complexos que os modelos epiteliais e, em alguns casos, permitem a distinção de substâncias irritantes nas três categorias do UN GHS, diferentemente dos modelos epiteliais que, em sua maioria, classificam indubitavelmente apenas substâncias não irritantes (ZORN-KRUPPA, 2014; BARTOK et al., 2015; OECD, 2017d).

Os modelos equivalentes de córnea, por sua vez, mimetizam todas as camadas desse tecido, incluindo epitélio, estroma e endotélio, sendo construídos por meio de estratégias de engenharia tecidual que garantem a obtenção de tecidos artificiais com características morfofuncionais muito semelhantes às do tecido primário. O primeiro modelo organotípico de córnea foi proposto por Minami e colaboradores (1993), o qual foi construído com células bovinas e mimetizou de maneira bem sucedida os três estratos teciduais.

Desde então, outros modelos foram proposto utilizando células primárias bovinas (TEGTMEYER et al., 2001; TEGTMEYER et al., 2004), células primárias suínas (SCHNEIDER; MAIER-REIF; GRAEVE, 1997; SCHNEIDER; MAIER-REIF; GRAEVE, 1999; REICHL; MULLER-GOYMANN, 2001), células primárias humanas (ZIESKE et al., 2004) e por fim com células imortalizadas humanas (GRIFFITH et al., 1999; ZORN-KRUPPA et al., 2005). Apesar da obtenção desses modelos ser mais laboriosa, estes apresentam a vantagem de simular muitas das interações célula-célula e célula-matriz encontradas no tecido ocular, o que possibilita a obtenção de respostas mais fidedignas e resolutivas considerando a avaliação de risco (HUHTALA et al., 2008).

Além da avaliação da viabilidade tecidual, os modelos 3D apresentam ainda a vantagem de permitir a investigação mecanística do processo de irritação ocular, por meio de análises que incluem a histopatologia, quantificação de citocinas pró-inflamatórias, alterações na permeabilidade tecidual e expressão gênica. Estes endpoints somados aos parâmetros de morte celular comumente avaliados podem fornecer informações complementares e relevantes sobre o mecanismo de ação tóxica de agentes irritantes, contribuindo para a estratificação de risco e fundamentando as bases da toxicologia mecanística no âmbito da toxicidade ocular (ESKES et al., 2005; HUHTALA et al., 2008).

Contudo, apesar de facilmente comercializados e adquiridos pela comunidade científica ou por empresas privadas no território internacional, esses modelos não são passíveis de aquisição no território brasileiro devido a questões burocráticas e alfandegárias que se tornam empecilhos para a obtenção dos mesmos. Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento e a padronização dessa tecnologia no Brasil, de forma a possibilitar seu emprego na avaliação da toxicidade ocular de produtos farmacêuticos tanto pelo setor privado, quanto nas atividades de pesquisa acadêmica.

2.1 – Objetivo geral

Desenvolver, caracterizar e verificar a aplicabilidade de um modelo biomimético de córnea para avaliação do potencial de toxicidade ocular de substâncias químicas e misturas, bem como proceder com a avaliação mecanística do processo de irritação ocular mediante avaliação de *endpoints* de inflamação.

2.2 – Objetivos específicos

- Realizar a seleção de diferentes substâncias, classificadas de acordo com o *Global Harmonization System* (GHS) em diferentes graus de irritação ocular, bem como avaliar a citotoxicidade das mesmas sobre a linhagem de queratinócitos Hacat;
- Avaliar o perfil de citocinas produzido pela linhagem Hacat cultivada em monocamada após a exposição às substâncias selecionadas visando correlacionar a classificação das mesmas com biomarcadores inflamatórios de maneira qualitativa e quantitativa;
- Padronizar a obtenção do modelo biomimético de córnea utilizando-se a linhagem de queratinócitos HaCat, de modo a determinar a cinética de crescimento epitelial em função do tempo de cultivo;
- Proceder com a caracterização histológica dos modelos 3D, bem como avaliar o padrão de expressão de biomarcadores epiteliais;
- Avaliar a viabilidade tecidual e o perfil de citocinas obtido após exposição do modelo epitelial obtido às diferentes substâncias teste previamente selecionadas;
- Verificar a aplicabilidade do modelo epitelial para avaliação do potencial de toxicidade ocular de misturas, por meio da avaliação de amostras comerciais de Hena de sobancelha.

3.1 – Cultivo celular:

Os queratinócitos humanos HaCat foram obtidos do “*American Type Culture Collection*” (ATCC) (Rockville, MA, EUA), e mantidos em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 2mM de L-Glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 1% de Penicilina/Estreptomicina (Gibco, Waltham, MA, EUA), permanecendo em estufas de cultivo celular a 37,0°C, atmosfera de 5,0% de CO₂ e umidade controlada.

Para a realização do subcultivo da linhagem ou utilização da mesma em experimentos, quando as células encontravam-se em 80-90% de confluência, o meio presente nos frascos de cultivo era descartado e as células lavadas com 10 mL de *Phosphate-Buffered Saline* (PBS), sendo posteriormente incubadas com 2 mL de solução de Tripsina/EDTA TripLE Express (Gibco, Waltham, MA, EUA) por 10 – 15 minutos para desagregação químico-enzimática. Após esse período, a neutralização foi feita com 5 mL de meio completo e as células transferidas para tubos cônicos, nos quais eram centrifugadas a 1000 RPM por 5 minutos. Para se realizar a contagem e monitorar a viabilidade das células, ressuspensava-se o *pellet* obtido em 1 mL de meio e, posteriormente, misturava-se 10µL da suspensão celular obtida com 10µL de solução de azul de tripan a 0,2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), realizando-se a contagem das células em contador automático TC20™ (BioRad, Hercules, CA, EUA).

3.2 – Seleção e preparo das substâncias-teste:

Para a condução do presente estudo, foram elencadas 13 substâncias-teste com diferentes classificações inerentes ao perfil de irritação ocular, de modo a serem selecionadas substâncias representantes de cada categoria do GHS (Categoria 1, 2A e 2B), bem como substâncias não-categorizadas. A seleção foi baseada nas listas de proficiência dos guias da OECD (OECD TG 491 – *Short Time Exposure In Vitro Test Method*; OECD TG 437 - *Bovine Corneal Opacity and Permeability Test*), bem como na

base de dados do ECETOC (*European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals*), que consiste em um banco de dados que contém a classificação do potencial de irritação ocular *in vivo* de várias substâncias químicas. As substâncias selecionadas estão representadas na Tabela 3.

As substâncias supracitadas foram preparadas mediante solubilização direta no próprio meio de cultura ou, em caso de substâncias com baixa hidrossolubilidade, uma solução-estoque foi preparada em DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e posteriormente diluída em meio DMEM no momento dos testes, de modo a se obter as concentrações de interesse. Nesse caso, o veículo (DMSO 0,5%) foi utilizado como controle negativo dos experimentos.

3.3 – Determinação da citotoxicidade das substâncias-teste frente aos queratinócitos HaCat:

A avaliação da citotoxicidade dos compostos-teste foi feita empregando-se o método de redução do sal [brometo de 3-(4,5 dimetiltiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT). Tal metodologia, descrita inicialmente por Mossman (1983), tem como princípio a redução mitocondrial do sal de tetrazólio pela enzima succinato desidrogenase, o qual é convertido em formazan pelas células metabolicamente ativas e pode ser quantificado por espectrofotometria UV/Vis. Nesse contexto, substâncias que conduzam à perda da viabilidade celular comprometem a formação desse composto, o que é utilizado para avaliar o potencial citotóxico de xenobióticos (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

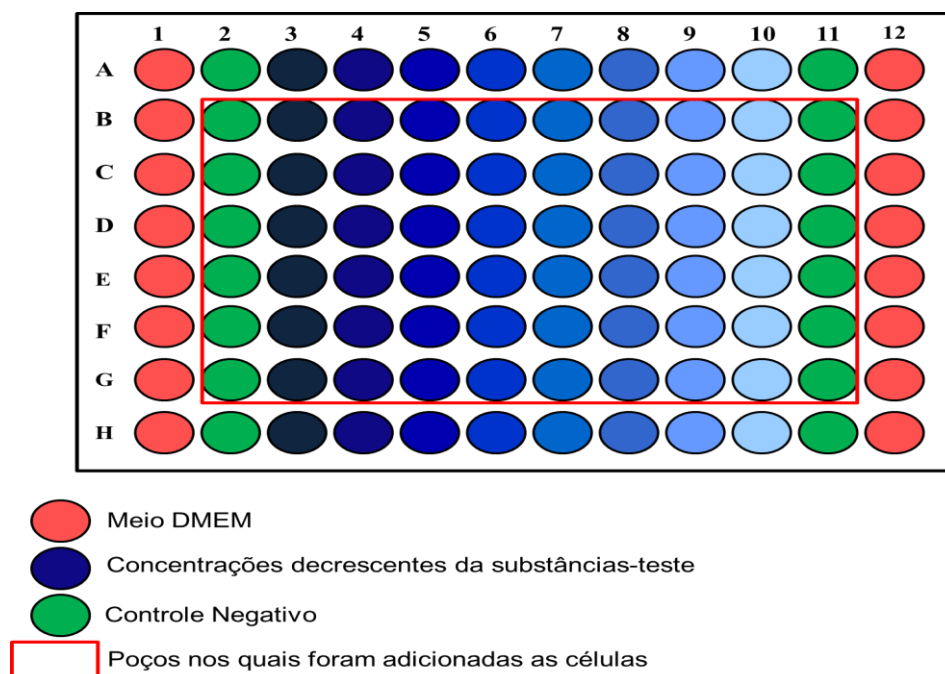
Inicialmente, as células HaCat foram removidas dos frascos de cultivo, centrifugadas e contadas conforme descrito na seção 3.1. Após a contagem, uma suspensão celular foi preparada na concentração de $1,5 \times 10^5$ células/mL e foram distribuídos 100µL da mesma em placas de 96 poços ($1,5 \times 10^4$ células/poço), exceto nas extremidades da placa, nas quais foram adicionados 100µL de meio DMEM. Após o plaqueamento, as células foram incubadas *overnight* em estufa de cultivo para adesão, sendo em seguida expostas a diferentes concentrações das substâncias-teste (10,0 – 0,078mg/mL) por 24 horas, conforme ilustrado na Figura 8.

Tabela 3: Descrição das substâncias-teste selecionadas e classificação *in vivo* das mesmas de acordo com o *Global Harmonization System* (GHS).

Código	Substância	Classe Química	Estado Físico	CAS	Classificação <i>In vivo</i> (Draize)	Referência
1	Cloreto de Benzalcônio	Tensoativo Catiônico	Sólido	63449-41-2	Categoria 1	OECD TG 491/ OECD TG 437
2	Imidazol	Composto Heterocíclico	Sólido	288-32-4	Categoria 1	OECD TG 437
3	Ácido Tricloroacético	Ácido Carboxílico	Sólido	76-03-9	Categoria 1	OECD TG 437
4	1-Octanol	Álcool	Líquido	111-87-5	Categoria 2A	OECD TG 491
5	Hidróxido de sódio	Base Inorgânica	Sólido	1310-73-2	Categoria 2A	ECETOC
6	Nitrato de Amônio	Sal Inorgânico	Sólido	6484-52-2	Categoria 2A	OECD TG 437
7	Cloreto de 2,6-Diclorobenzoil	Haletos de Acila	Líquido	4659-45-4	Categoria 2A	OECD TG 437
8	Etil – 2 – metilacetoacetato	Cetona/Éster	Líquido	609-14-3	Categoria 2B	OECD TG 437
9	Ácido Glicólico	Ácido carboxílico	Líquido	79-14-1	Categoria 2B	ECETOC
10	Ciclopentanol	Álcool	Líquido	96-41-3	Categoria 2B	OECD TG 491
11	EDTA dissódico	Amina, ácido carboxílico	Sólido	6381-92-6	Não categorizado	OECD TG 437
12	Glicerol	Álcool	Líquido	56-81-5	Não categorizado	OECD TG 491
13	PEG 400	Álcool	Líquido	25322-68-3	Não categorizado	ECETOC

OECD: *Organization for Economic Co-operation and Development*; TG: *Test Guideline*; ECETOC: *European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals*.

Figura 8: Representação esquemática do teste de citotoxicidade feito para as substâncias-teste frente a linhagem HaCat, através do método de redução do MTT. As células foram distribuídas apenas no quadrante central da placa, de modo que os poços periféricos foram utilizados como branco a ser descontado após a leitura espectrofotométrica. As células das colunas 2 e 11 foram destinadas ao controle negativo (meio suplementado ou DMSO a 0,5% quando aplicável). Nas colunas de 3 a 10 foram adicionadas as oito concentrações decrescentes das substâncias-teste (10,0 – 0,078mg/mL). Os ensaios foram realizados em sextuplicata, sendo os resultados expressos como a média de três experimentos independentes.



Depois de expostas, as células foram lavadas duas vezes com 150µL de PBS/poço, sendo subsequentemente incubadas com 100µL/poço de meio DMEM contendo MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 0,5 mg/mL por 3 horas em estufa de cultivo celular. Em seguida, o meio presente nos poços foi removido por inversão e os cristais de formazan formados foram solubilizados em 100µL de DMSO, mediante agitação de 30 RPM por 20 minutos. Por fim, a absorbância do conteúdo dos poços foi determinada em espectrofotômetro de placas (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) no comprimento de onda de 560 nm. Após a determinação da absorbância, a viabilidade celular foi calculada em relação ao controle negativo (células não expostas) empregando-se a Equação 1.

Equação 1: Cálculo da viabilidade celular da linhagem HaCat após exposição às diferentes concentrações das substâncias-teste.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{(Média da absorbância correspondente a cada concentração - Branco correspondente a cada concentração)}}{\text{(Média da absorbância do controle negativo - Branco correspondente ao controle negativo)}} \times 100$$

3.4 – Determinação do perfil de citocinas da linhagem HaCat mediante exposição às substâncias-teste:

Com o objetivo de se avaliar possíveis alterações inflamatórias induzidas nos queratinócitos HaCat pelas substâncias teste, bem como estabelecer relações quantitativas entre a exposição e a produção de biomarcadores de inflamação, verificou-se a produção de cinco citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p70 e TNF- α) e de uma anti-inflamatória (IL-10) após a exposição da linhagem a algumas das substâncias-teste selecionadas. A avaliação foi feita mediante utilização da técnica de CBA, a qual permite a detecção e quantificação simultânea desses biomarcadores em uma mesma amostra.

O método consiste na conjugação de citocinas solúveis nas amostras a *Beads* revestidas com o anticorpo específico para o marcador de interesse, as quais possuem diferentes intensidades de fluorescência intrínseca. Após a conjugação, os anticorpos de detecção conjugados à ficoeritrina (PE) são adicionados aos complexos, conferindo fluorescência adicional à amostra, a qual pode ser quantificada empregando-se a citometria de fluxo. Dessa forma, a fluorescência intrínseca de cada *bead* somada à fluorescência do anticorpo de detecção permitem a identificação simultânea, bem como a quantificação das citocinas de interesse (TÁRNOK et al., 2003; MORGAN et al., 2004).

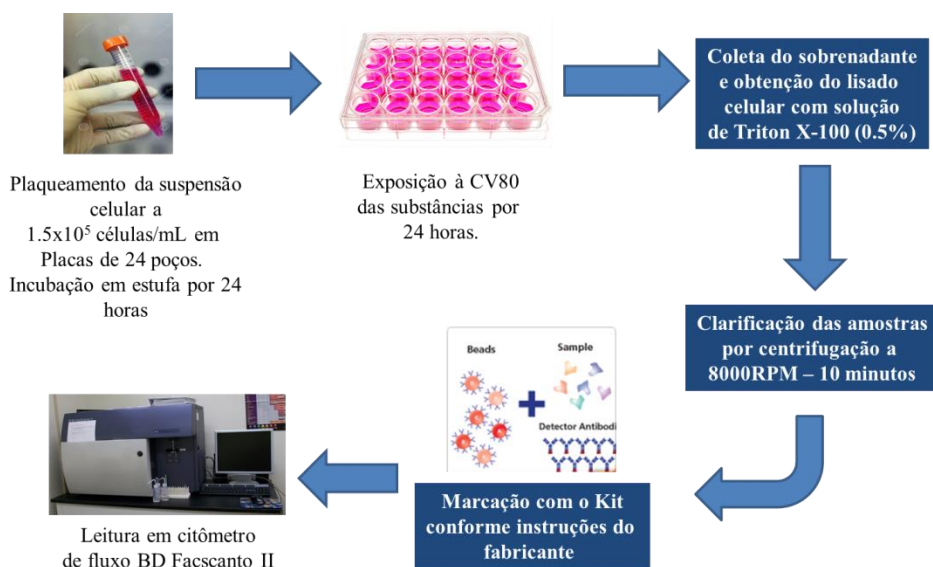
Para tal avaliação, os queratinócitos HaCat foram distribuídos em placas de 24 poços na densidade de $7,5 \times 10^4$ células/poço, e incubadas *overnight* para adesão. Posteriormente, as células foram expostas a algumas das substâncias-teste selecionadas na concentração de 80% de viabilidade celular (CV₈₀), por 24 horas, conforme descrito por Corsini e colaboradores (2009). Em seguida, o sobrenadante foi coletado e as células foram lavadas por duas vezes com 2 mL de PBS/poço, sendo subsequentemente incubadas com tampão de lise por 5 minutos sob agitação de 20 RPM, o qual consiste em PBS acrescido de 0,5% de Triton X-100 (AMRESCO, Solon, OH, EUA) e de coquetel

inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Após esse período, o lisado foi coletado e armazenado em freezer a -80°C e, no momento das avaliações, foi centrifugado a 8000 RPM por 10 minutos antes da retirada das alíquotas para o teste. Os experimentos foram realizados em duplicata (Figura 9).

Nessa etapa, a concentração dos mediadores inflamatórios foi feita em ambos os espécimes (lisado celular e sobrenadante), utilizando-se o kit *BD Cytometric Bead Array Human Inflammatory Cytokines* (BD Biosciences, NJ, EUA), conforme instruções do fabricante. Foram selecionadas 7 substâncias-teste dentre as apresentadas na Tabela 1 para a condução da avaliação preliminar empregando-se essa metodologia, sendo elas: Cloreto de Benzalcônio, Imidazol, Ácido Tricloroacético, 1-Octanol, Etil-2-metilacetoacetato, EDTA e Glicerol.

Inicialmente, o volume necessário de cada *bead* foi calculado e transferido para um tubo cônico, no qual as mesmas foram homogeneizadas e centrifugadas a 1200 RPM por 5 minutos a 21°C. Em seguida, o sobrenadante foi removido por aspiração e o *pellet* formado foi ressuspensionado no mesmo volume inicial com o reagente *Serum Enhancement Buffer*, provido no kit, com o qual as *beads* permaneceram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. Após isso, foram distribuídos 25µL da suspensão de *beads* em cada poço de uma placa de 96 poços fundo “V”, de modo que cada poço recebeu ainda 25µL de cada amostra testada ou das diluições da curva-padrão e 25µL do reagente de detecção, os quais permaneceram incubados sob agitação por 3 horas ao abrigo da luz. Por fim, as amostras foram lavadas por duas vezes com 150µL/poço do tampão de lavagem provido no kit, centrifugadas a 1000 RPM por 5 minutos e ressuspensionadas em 200µL desse mesmo tampão, sendo posteriormente avaliadas em citômetro de fluxo (BD FACSCANTO II, BD Biosciences, NJ, EUA). Após a quantificação, a concentração de citocinas foi corrigida pela quantidade de proteínas totais presente nas amostras, a qual foi determinada utilizando-se o kit *BCA Protein Quantitation* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), conforme instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em produção relativa de cada citocina, em relação ao controle negativo.

Figura 9: Fluxograma do ensaio de CBA para a determinação do perfil de citocinas produzido pela linhagem HaCat após exposição às substâncias-teste.



Fonte: O autor.

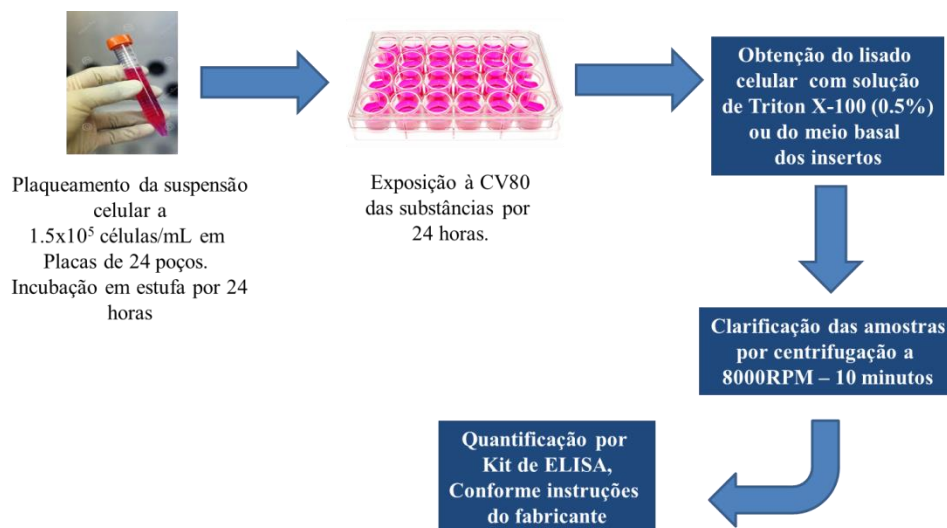
3.5 – Avaliação da produção de IL-1 β pelos queratinócitos HaCat e pelo modelo epitelial 3D mediante exposição às substâncias-teste:

Após a avaliação preliminar do perfil de citocinas produzido pela linhagem HaCat em resposta à exposição às diferentes substâncias-teste, bem como seleção da IL-1 β como biomarcador de exposição a irritantes oculares, optou-se por quantificar essa citocina no lisado celular, expandindo os testes para as demais substâncias não testadas na etapa anteriormente descrita. Dessa forma, os queratinócitos HaCat foram plaqueados, expostos à CV₈₀ de todas as substâncias listadas na Tabela 3 por 24 horas e o lisado celular foi obtido, conforme descrito na seção 3.4. Após a obtenção dos lisados, a concentração de IL-1 β nestes foi determinada por meio do ensaio imunoenzimático de ELISA, utilizando-se o kit BD OptEIA™ Set Human IL-1 β (BD Biosciences, NJ, EUA), conforme instruções do fabricante, cujas etapas e períodos de incubação estão demonstrados na Tabela 4. A produção desse marcador inflamatório também foi quantificada no meio basal dos insertos após a exposição dos modelos 3D às mesmas substâncias teste (Figura 10).

Após a condução do ensaio, a absorbância dos conteúdos dos poços foi determinada em espectrofotômetro leitor de placas (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) no comprimento de onda de 450 nm. A quantificação de IL-

1 β foi feita utilizando-se a curva-padrão construída com 8 diluições seriadas do padrão dessa citocina fornecido no kit (250 – 1,9 pg/mL). Adicionalmente, a concentração de citocinas foi expressa em razão à quantidade de proteínas totais nas amostras, a qual foi determinada utilizando-se o kit *BCA Protein Quantitation* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), conforme instruções do fabricante.

Figura 10: Fluxograma do ensaio de ELISA para a quantificação de IL-1 β no lisado celular e no meio basal do modelo 3D.



Fonte: O autor.

Tabela 4: Descrição das etapas do ensaio de ELISA realizado para quantificação de IL-1 β nas amostras de lisado celular da linhagem HaCat, após 24 horas de exposição às substâncias-teste.

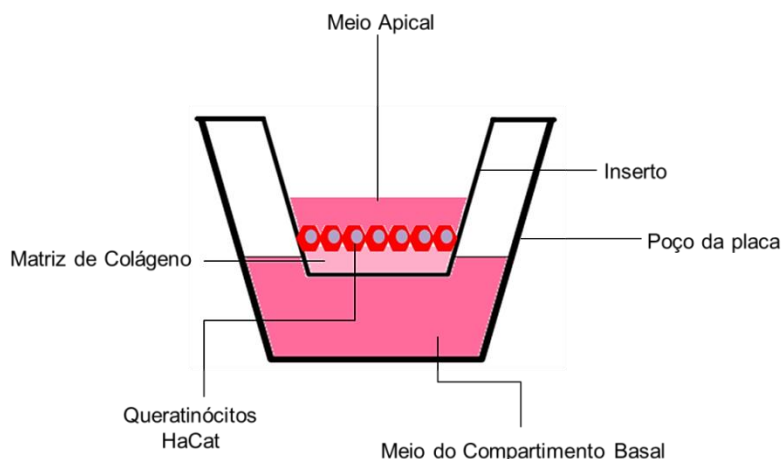
Etapas	Descrição	Reagente	Tempo de Incubação
1	Sensibilização da Placa	Anticorpo de captura (1:250)*	<i>Overnight</i>
2	Lavagem	Tampão de Lavagem	-
3	Bloqueio	Diluyente de Ensaio	1 hora
4	Incubação com a amostra/padrão	Amostras de lisado diluídas (1:30)*/ Diluições da Curva-padrão	2 horas
5	Lavagem	Tampão de Lavagem	-
6	Incubação com Anticorpo de Detecção	Anticorpo de Detecção (1:1000)*	1 hora
7	Lavagem	Tampão de Lavagem	-
8	Incubação com o Reagente Enzimático	Reagente enzimático (1:250)*	30 minutos
9	Lavagem	Tampão de Lavagem	-
10	Incubação com o Substrato	Substrato Cromogênico	30 minutos
11	Parada da Reação	Solução de Parada	5 minutos

*As amostras, bem como os reagentes utilizados no ensaio foram diluídos no diluyente de ensaio provido no kit.

3.6 – Obtenção dos modelos epiteliais 3D:

Os modelos de epitélio estratificado foram construídos mediante o cultivo da linhagem de queratinócitos HaCat em uma interface ar-líquido, obtida mediante a utilização de insertos *transwell* (Falcon, Tewksbury, MA, EUA) com poros de 0,4 μ M de diâmetro, em placas de 24 poços (BD Biosciences, NJ, EUA) sobre uma matriz de Colágeno Tipo I até a obtenção do grau de estratificação desejado (Figura 11). O cultivo dos tecidos foi realizado em meio quimicamente definido MEM-F12 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), em condições livre de Soro Fetal Bovino. O Colágeno Tipo I utilizado neste trabalho foi produzido e gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Gregory Thomas Kitten, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

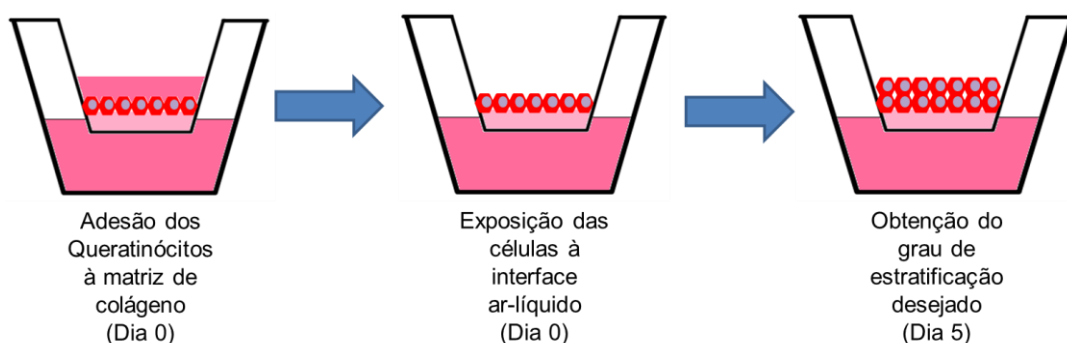
Figura 11: Representação esquemática da configuração inicial do sistema de cultivo empregado para a obtenção dos modelos biomiméticos de córnea.



Fonte: O autor.

Os queratinócitos HaCat foram dissociados dos frascos de cultivo, lavados por duas vezes com 10 mL meio de cultura livre de soro, centrifugados e contados, conforme descrito na seção 3.1, sendo obtida uma suspensão celular na concentração de $2,5 \times 10^6$ células/mL, a qual foi preparada em meio MEM-F12. Em seguida, o meio presente sobre o gel de colágeno foi substituído por 200 μ L da suspensão celular preparada, de modo que cada inserto recebeu 5×10^5 células. As placas foram mantidas em estufa de cultivo por 4 horas e, transcorrido esse tempo, o meio apical presente nos insertos foi removido, expondo as células à interface ar-líquido. O dia do plaqueamento foi considerado como Dia 0, de modo que os experimentos foram, em sua maioria, realizados no Dia 5 (Figura 12).

Figura 12: Fluxograma de obtenção dos modelos epiteliais 3D.



Fonte: O autor.

3.7 – Caracterização dos modelos epiteliais e da córnea humana:

A caracterização dos modelos reconstruídos foi feita juntamente com uma amostra de córnea cedida pela Fundação Banco de Olhos do Estado de Goiás, com anuência da Central de Transplantes Estadual. Tal material seria encaminhado para descarte por não atender os critérios mínimos exigidos para ser transplantado, nos sendo concedido mediante aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa da UFG (Parecer nº: 2.176.858). Foram avaliadas tanto a morfologia epitelial quanto a expressão de biomarcadores comumente expressos no epitélio ocular, de modo que tais padrões foram comparados aos da córnea humana para avaliação do grau de similaridade do tecido obtido com o original.

3.7.1 – Processamento das amostras para avaliação histológica:

Os modelos 3D, bem como a amostra de córnea humana foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% (pH 7,4) (30 minutos para os epitélios reconstruídos e *overnight* para a córnea humana) e em seguida desidratados, diafanizados e incluídos em *Paraplast* (Leica Microsystems, Bannockburn, EUA), conforme a sequência descrita a seguir:

- Desidratação
 - Etanol 70% - 30 minutos
 - Etanol 80% - 30 minutos
 - Etanol 95% - 30 minutos
 - Etanol Absoluto I – 30 minutos
 - Etanol Absoluto II – 30 minutos
 - Etanol Absoluto III – 30 minutos
- Diafanização
 - Xilol I – 30 minutos
 - Xilol II – 30 minutos
- Infiltração
 - *Paraplast* I – 30 minutos a 60°C
 - *Paraplast* II – 30 minutos a 60°C
- Inclusão
 - *Paraplast* – 60°C

Uma vez incluídos, foram obtidos cortes de 3µm de espessura dos tecidos os quais foram transferidos para lâminas de microscopia e corados com Hematoxilina/Eosina para avaliação da organização estrutural dos mesmos. A avaliação, bem como a fotodocumentação foram realizadas em microscópio óptico (DM 2000, Leica Microsystems, Bannockburn, EUA).

3.7.2 – Avaliação da expressão das proteínas Pan-citoqueratina, CD44 e Ki-67 por imunofluorescência indireta:

Os tecidos foram caracterizados empregando-se a técnica de imunofluorescência indireta, seguindo o protocolo descrito por Castro (2006). Os anticorpos empregados, bem como as diluições de trabalho utilizadas estão descritos na Tabela 5.

Inicialmente, os tecidos foram desparafinizados em três banhos de xilol e posteriormente hidratados em concentrações graduais crescentes de álcool etílico (100, 95%, 80%, 70% e 50% - 5 minutos cada), sendo por fim incubadas com PBS por 10 minutos. Depois de hidratados, os cortes foram submetidos ao processo de recuperação antigênica, no qual foram incubados em tampão-citrato (10mM) por 30 minutos em banho-maria a 96°C. Em seguida, as lâminas foram resfriadas à temperatura ambiente e lavadas por duas vezes com PBS, sendo posteriormente incubadas por 1 hora com a solução de bloqueio, composta por PBS acrescido de 1% de soro-albumina bovina (BSA) e 0,1% de Tween 20. Após o bloqueio, as secções foram incubadas *overnight* em câmara úmida a 4°C com os anticorpos primários correspondentes a cada proteína avaliada nas concentrações descritas na Tabela 5, sendo então lavadas quatro vezes com PBS e incubadas por 1 hora com os anticorpos secundários específicos para cada espécie utilizada. Cabe ressaltar que os anticorpos utilizados foram preparados na solução de bloqueio diluída 10 vezes (BSA 0,1% e Tween 20 0,01%). Por fim, as lâminas foram lavadas adicionalmente por 4 vezes e montadas com meio de montagem para microscopia de fluorescência (90% de Glicerol acrescido de 10% de PBS). A avaliação e obtenção das imagens foram realizadas em microscópio de fluorescência (DMI 4000 B, Leica Microsystems, Bannockburn, EUA) acoplado ao software LAS-AF, filtro A4 (cor azul), filtro N21 (cor vermelha) e filtro L5 (cor verde).

Tabela 5: Descrição dos anticorpos primários e secundários utilizados para a caracterização dos tecidos pela técnica de imunofluorescência indireta.

Anticorpos Primários			
Descrição	Espécie	Diluição utilizada	Fabricante
Monoclonal Anti - Pan- citoqueratina	Camundongo	1:100	Invitrogen
Monoclonal Anti - CD44	Camundongo	1:200	Millipore
Monoclonal Anti - α -tubulina	Coelho	1:300	Invitrogen
Monoclonal Anti-Ki-67	Camundongo	Pronto para uso	Leica Biosystems
Monoclonal Anti - Colágeno I	Coelho	1:200	Rockland
Anticorpos Secundários			
Descrição	Espécie	Diluição utilizada	Fabricante
Monoclonal Anti- Coelho	Cabra	1:500	Invitrogen
Monoclonal Anti- Camundongo	Cabra	1:500	Invitrogen

3.8 – Mensuração da Resistência Transepitelial (TEER) dos modelos 3D:

A Resistência Elétrica Transepitelial (*Transepithelial Electrical Resistance – TEER*), é um parâmetro quantitativo que pode ser avaliado de modo a determinar a resistência elétrica através de biomembranas, consistindo em um indicador sensível e preciso para se determinar a função de barreira de tecidos construídos *in vitro*. O princípio dessa avaliação consiste na aplicação de uma corrente elétrica alternada em um sistema de eletrodos, de maneira a determinar a condutância de íons através da via paracelular do epitélio, possibilitando estimar quantitativamente a integridade das junções comunicantes do mesmo (Srinivasan et al., 2015).

A verificação da função de barreira dos epitélios reconstruídos foi realizada diariamente durante 7 dias visando determinar padrões de aumento e/ou diminuição desse parâmetro, mediante a utilização do sistema Millicell® ERS-2 (Millipore corporation, MA, EUA). Para tal, os eletrodos do sistema foram posicionados nos compartimentos superior e inferior do inserto *transwell*, sendo estes preenchidos com 800µL e 1,5 mL de PBS no momento das medições, respectivamente. O branco adotado para as medidas consistiu em um inserto que continha apenas a matriz de colágeno, sem adição das células, de forma que o valor final do TEER obtido para os tecidos foi subtraído do valor da resistência fornecida pelo gel. A medida fornecida no display do equipamento foi registrada, de modo que as mensurações foram realizadas em triplicada para cada tecido avaliado.

3.9 – Avaliação da aplicabilidade do modelo epitelial para a identificação de substâncias irritantes oculares:

Visando-se determinar a capacidade preditiva do modelo biomimético de córnea em relação à classificação de agentes irritantes e não irritantes, a aplicabilidade do mesmo foi avaliada mediante sua exposição às substâncias com classificação conhecida, as quais encontram-se elencadas na Tabela 6.

Inicialmente, os modelos epiteliais foram construídos, conforme descrito na seção 3.6 e cultivados, de modo que as exposições foram conduzidas no dia 5 após o plaqueamento. As substâncias foram expostas puras ou nas concentrações descritas nas referências bibliográficas utilizadas para seleção, conforme descrito na Tabela 6.

Para os compostos líquidos, foram depositados 50µL da substância ou solução diretamente sobre a superfície epitelial. Em contrapartida, para os sólidos foram adicionados 50mg da substância e, logo em seguida, 50µL de PBS para aumentar o contato do composto com o epitélio, conforme descrito por Bartok e colaboradores (2015). Os controles negativos e positivos foram expostos a 50µL de PBS e 50µL de solução de Cloreto de Benzalcônio a 5%, respectivamente. A exposição foi realizada em temperatura ambiente por 5 minutos e, em seguida, a superfície epitelial dos modelos foi lavada por três vezes com 600µL de PBS. O tempo de exposição foi escolhido com base no tempo empregado pelo guia de teste n. 491 da OECD (*Short Time Exposure test*), que se baseia na avaliação do potencial de toxicidade ocular de substâncias após um curto período

de exposição. Após as lavagens, os modelos foram cultivados adicionalmente por 24 horas antes de serem submetidos à avaliação da viabilidade tecidual, visando-se contemplar eventos de reversibilidade do dano induzido pelas substâncias-teste.

Tabela 6: Descrição das substâncias-teste, bem como concentrações empregadas na exposição dos modelos biomiméticos de córnea.

Código	Descrição	Estado Físico	Concentração Testada
1	Cloreto de Benzalcônio	Sólido	5%
2	Imidazol	Sólido	Puro
3	Ácido Tricloroacético	Sólido	30%
4	1-Octanol	Líquido	Puro
5	Hidróxido de sódio	Sólido	1%
6	Nitrato de Amônio	Sólido	Puro
7	Cloreto de 2,6-Diclorobenzoil	Líquido	Puro
8	Etil – 2 – metilacetoacetato	Líquido	Puro
9	Ácido Glicólico	Líquido	10%
10	Ciclopentanol	Líquido	Puro
11	EDTA sal dissódico	Sólido	Puro
12	Glicerol	Líquido	Puro
13	PEG 400	Líquido	Puro

A verificação da viabilidade dos modelos foi feita por meio do método de redução do MTT, conforme o protocolo utilizado por Jung e colaboradores (2011), conduzido com algumas adaptações no presente estudo. Para tal, o meio do compartimento basal dos insertos foi coletado e armazenado a -80°C para a quantificação de IL-1 β por ELISA conforme descrito no item 4.5, sendo substituído por meio de cultura acrescido de MTT a 0,5mg/mL. As placas foram incubadas em estufa de cultivo celular por 3 horas e, em seguida, os tecidos foram removidos dos insertos, sendo submetidos à extração do formazan mediante incubação por 3 horas em temperatura ambiente com 1 mL de Isopropanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), sob agitação de 20 RPM. Por fim, a solução de formazan obtida foi transferida para placas de 96 poços (100 μ L/poço) e a absorbância foi determinada em espectrofotômetro leitor de placas (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) a 560 nm. Os experimentos foram conduzidos em

duplicata e a viabilidade tecidual dos epitélios expostos foi calculada em relação à viabilidade do controle negativo (PBS).

3.10 – Utilização da plataforma em monocamada e do modelo epitelial para a avaliação do potencial de toxicidade ocular de Henas de sobrelha:

Uma vez delineada a capacidade preditiva do modelo para avaliação de substâncias químicas isoladas, verificou-se a aplicabilidade deste para a análise do perfil de toxicidade ocular de misturas (*“real life mixtures”*) com baixo potencial de irritação ocular, como o objetivo de se investigar o domínio de aplicação do método. Foram selecionadas cinco amostras de hena de sobrelha comercializadas no Brasil, as quais não continham no rótulo informações sobre possíveis danos mediante contato com os olhos sendo, portanto consideradas como não irritantes. As amostras foram avaliadas tanto em relação ao perfil pró-inflamatório em monocamada mediante a quantificação de IL-1 β , quanto ao efeito sobre os modelos epiteliais 3D.

Para as avaliações em monocamada, primeiramente procedeu-se com a avaliação da citotoxicidade das amostras sobre os queratinócitos HaCat, conforme descrito com detalhes na seção 3.3. Posteriormente, tais células foram expostas à CV₈₀ das misturas por 24 horas, sendo o lisado celular coletado para a quantificação de IL-1 β por ELISA (seção 3.5).

Para a exposição dos modelos 3D, uma dispersão a 10% de cada amostra foi preparada e os mesmos foram expostos a 50 μ l desta, por 5 minutos. A avaliação da viabilidade tecidual foi realizada conforme descrito na seção 4.9.

3.11 – Análise estatística:

Os resultados foram expressos como valor de média $\pm$ desvio padrão dos valores obtidos nas diferentes réplicas dos experimentos executados. Considerando os ensaios de citotoxicidade, os valores de CI₅₀ e CV₈₀ foram determinados por meio de regressão não linear. Para os experimentos relacionados ao perfil inflamatório e à determinação da viabilidade tecidual, os valores foram comparados utilizando-se o teste One-Way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey para a determinação de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos avaliados. Tal condição foi verificada quando o valor de “p” mostrou-se inferior a 0,05, considerando um intervalo de confiança de 95%. Todas as análises supracitadas foram executadas utilizando-se o software Graphpad Prism 5.0.

4.1 - Citotoxicidade das substâncias teste frente os queratinócitos HaCat:

A citotoxicidade das substâncias foi determinada com o objetivo se verificar a concentração ideal das mesmas a serem utilizadas nos ensaios posteriores, bem como avaliar a existência de uma possível correlação entre a viabilidade celular obtida após a exposição e o potencial irritante dos agentes avaliados. Os valores da CI_{50} (Concentração Inibitória de 50% do crescimento celular) e da CV_{80} (Concentração na qual a viabilidade celular é de 80%) de cada substância estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Classificação das substâncias-teste conforme os diferentes graus de irritação ocular e valores de CI_{50} e CV_{80} obtidos no do ensaio de citotoxicidade. Os valores foram obtidos por meio do método de redução do MTT, mediante a avaliação de três experimentos independentes realizados em triplicata.

Código	Substância	Classificação <i>In vivo</i> (Draize)	CI_{50} (mg/mL)	CV_{80} (mg/mL)
1	Cloreto de Benzalcônio	Categoria 1	0,0027	0,0016
2	Imidazol	Categoria 1	2,98	1,28
3	Ácido Tricloroacético	Categoria 1	2,01	1,10
4	1-Octanol	Categoria 2A	0,12	0,07
5	Hidróxido de sódio	Categoria 2A	1,63	0,73
6	Nitrato de Amônio	Categoria 2A	2,48	1,08
7	Cloreto de 2,6-Diclorobenzoil	Categoria 2A	0,25	0,04
8	Etil – 2 – metilacetoacetato	Categoria 2B	4,38	1,78
9	Ácido Glicólico	Categoria 2B	3,43	0,63
10	Ciclopentanol	Categoria 2B	3,03	1,38
11	EDTA dissódico	Não categorizado	1,08	0,58
12	Glicerol	Não categorizado	>10,0	>10,0
13	PEG 400	Não categorizado	>10,0	>10,0

Categoria 1: Substâncias que ocasionam dano ocular grave; Categoria 2A: Irritante moderado; Categoria 2B: Irritante leve; Não categorizado: Não irritante; CI_{50} : Concentração Inibitória de 50% do crescimento celular; CV_{80} : Concentração na qual a viabilidade celular é de 80%.

4.2 - Determinação do perfil de citocinas da linhagem HaCat mediante exposição às substâncias-teste:

Com o intuito de investigar possíveis alterações inflamatórias induzidas nos queratinócitos humanos frente à exposição a irritantes oculares, bem como estabelecer correlações qualitativas e quantitativas entre potencial de irritação e produção de biomarcadores de inflamação, o perfil de citocinas produzido pela linhagem foi determinado por meio da técnica de CBA, a qual possibilitou a quantificação simultânea de um painel de seis citocinas (IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β , TNF e IL-12p70) no sobrenadante e no lisado celular após 24 horas de exposição às substâncias teste.

Mediante tal quantificação no sobrenadante da cultura, verificou-se que apesar de algumas substâncias ocasionarem aumentos pontuais da secreção de citocinas pelos queratinócitos, não foi observada nenhuma correlação entre o potencial irritante e a produção desses biomarcadores, conforme demonstrado na Figura 13. Contudo, considerando-se o conteúdo intracelular, o qual foi avaliado mediante análise do lisado celular, observou-se diferenças no padrão de produção de algumas das citocinas.

Conforme demonstrado nas Figuras 14A e 14B a exposição às substâncias que ocasionam dano ocular grave (Subst. 1, 2 e 3), induziu um aumento na produção intracelular das interleucinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6, o qual não está vinculado a um aumento na secreção das mesmas para o meio extracelular, uma vez que tal parâmetro não foi proporcionalmente alterado nas amostras de sobrenadante correspondentes a tais substâncias. Entretanto, comparando-se esses dois marcadores, nota-se que a produção de IL-6 apresentou aumento significativo para uma das substâncias não irritantes, demonstrando menor especificidade em relação à IL-1 β , que por sua vez teve a produção aumentada apenas mediante exposição a irritantes severos, moderados ou leves. Paralelamente, para as substâncias da Categoria 1, observou-se uma tendência de aumento na produção intracelular da citocina anti-inflamatória IL-10, tanto individualmente (Figura 14D) quanto após o agrupamento das substâncias nas diferentes categorias do UN GHS (Figura 15D). Considerando as demais citocinas avaliadas, alterações pontuais foram obtidas para algumas das substâncias, as quais não se correlacionaram com o potencial irritante e, conseqüentemente foram inconclusivas, não sendo consideradas nas análises posteriores.

Adicionalmente, por meio do agrupamento dos resultados oriundos das substâncias em suas respectivas categorias do UN GHS (Figura 15), observa-se um

aumento gradual na produção de IL-1 β de acordo com o potencial de irritação, de modo que as substâncias que ocasionam dano ocular grave induziram aumento superior quando comparadas aos irritantes moderados/leves, seguidos pelas substâncias não irritantes, que apresentaram níveis de produção comparáveis aos do controle negativo (Figura 15A). Para a IL-6, por outro lado, tal proporcionalidade não foi observada, de modo que a IL-1 β foi selecionada como biomarcador para as avaliações subsequentes referentes às alterações inflamatórias induzidas pelos agentes irritantes oculares avaliados.

Figura 13: Produção das citocinas IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-8 (C), IL-10 (D), IL-12p70 (E) e TNF- α (F) por queratinócitos HaCat após exposição à CV₈₀ das substâncias teste selecionadas para a análise preliminar. A quantificação foi realizada por meio da técnica de CBA nas amostras de sobrenadante coletado 24 horas após a exposição. Os resultados estão expressos como média e desvio padrão obtidos com a avaliação de dois experimentos independentes, realizados em duplicata. (* p < 0,05; **p<0,01; *** p < 0,001 quando comparado ao controle negativo).

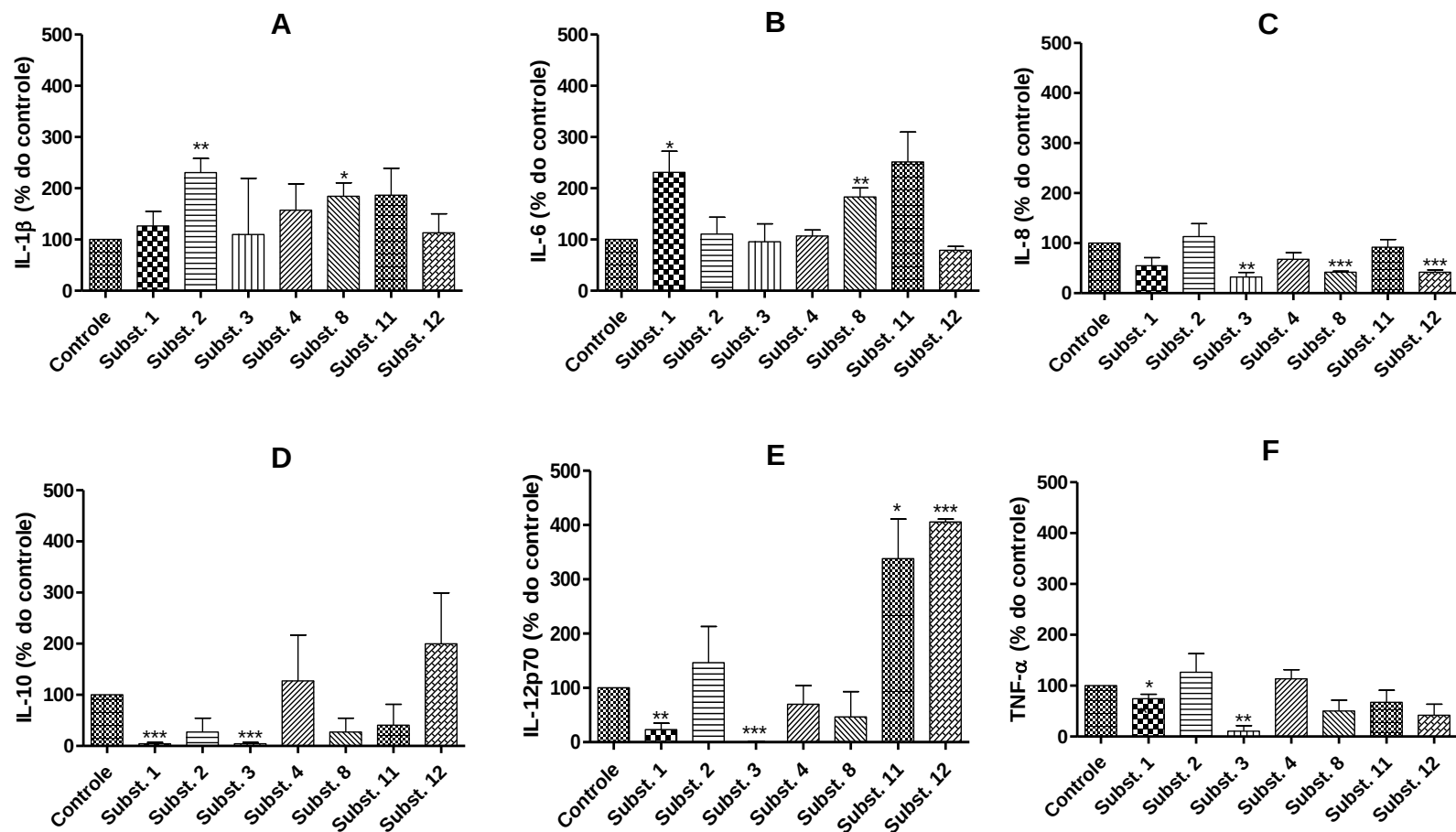


Figura 14: Produção das citocinas IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-8 (C), IL-10 (D), IL-12p70 (E) e TNF- α (F) por queratinócitos HaCat após exposição à CV₈₀ das substâncias teste selecionadas para a análise preliminar. A quantificação foi realizada por meio da técnica de CBA nas amostras de lisado celular coletado 24 horas após a exposição. Os resultados estão expressos como média e desvio padrão obtidos com a avaliação de dois experimentos independentes, realizados em duplicata. (* p < 0,05; **p<0,01; *** p < 0,001 quando comparado ao controle negativo).

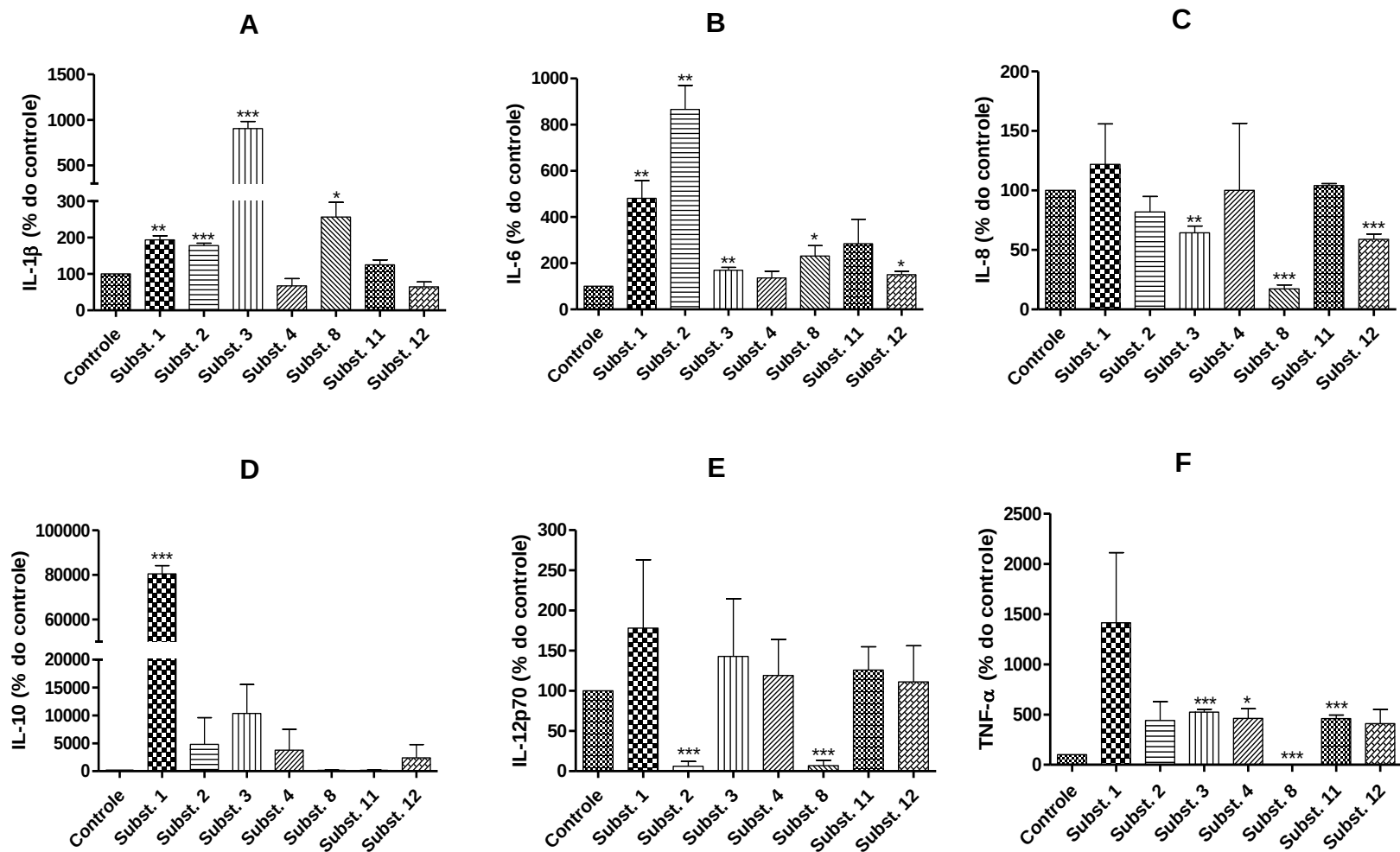
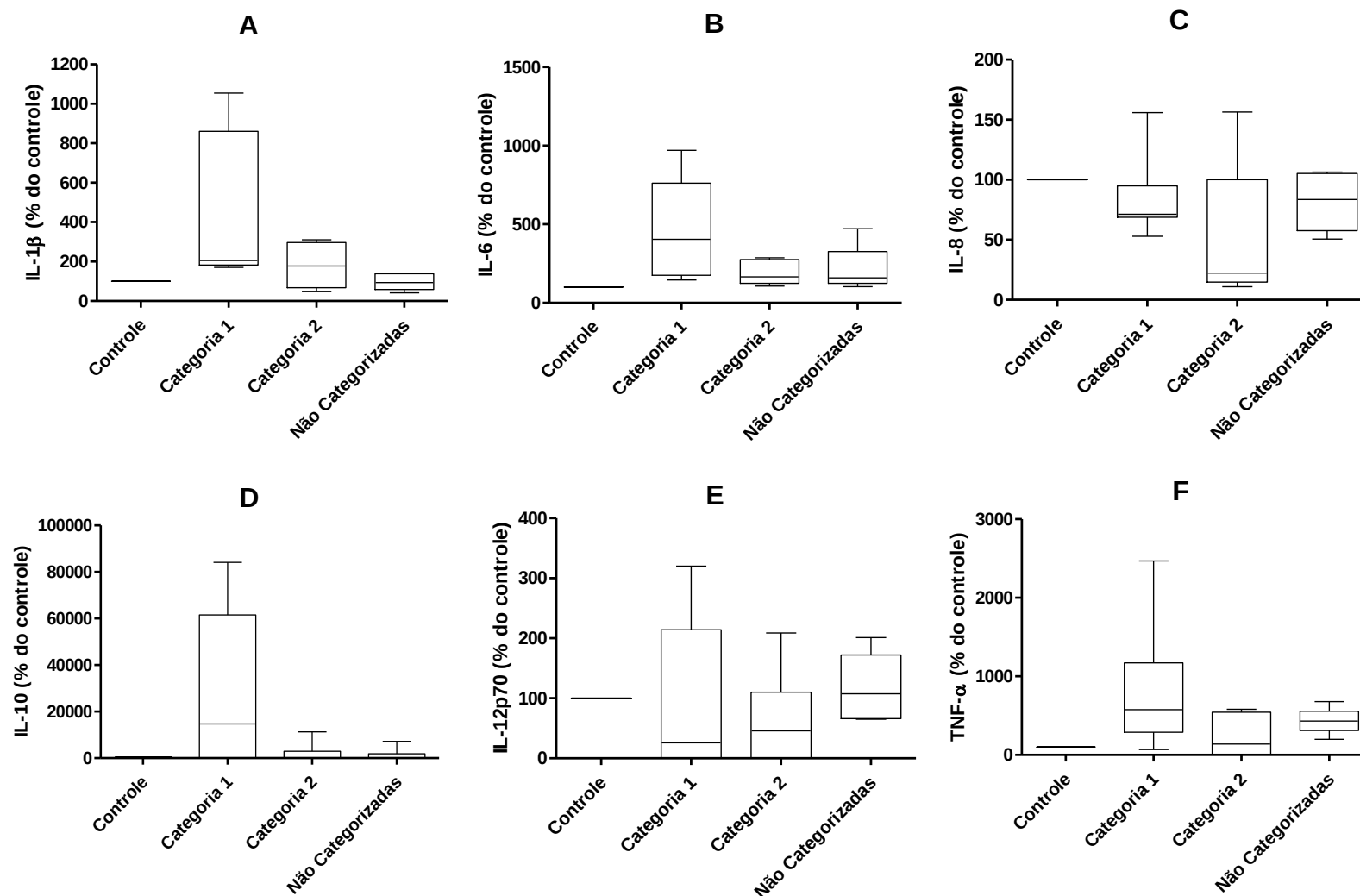


Figura 15: Produção das citocinas IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-8 (C), IL-10 (D), IL-12p70 (E) e TNF- α (F) por queratinócitos HaCat após exposição à CV₈₀ das substâncias agrupadas nas diferentes categorias do UN GHS conforme o potencial de irritação ocular. A quantificação foi realizada por meio da técnica de CBA nas amostras de lisado celular coletado 24 horas após a exposição. Categoria 1: Substâncias que ocasionam dano ocular grave; Categoria 2: Irritantes moderados/leves; Não categorizadas: Não irritantes.



4.3 - Produção de IL-1 β pelos queratinócitos HaCat mediante exposição às substâncias teste:

Após a seleção da Interleucina IL-1 β como biomarcador inflamatório, a produção dessa citocina foi, em segunda instância, avaliada no por meio da técnica de ELISA, de modo que a análise foi estendida a todas as substâncias teste, contemplando as que não haviam sido avaliadas pela técnica de CBA. O objetivo dessa avaliação foi aumentar o número de substâncias pertencentes a cada categoria do UN GHS de forma a avaliar se o padrão de produção observado no ensaio supracitado se manteria o mesmo ou seria alterado pela inserção de amostras adicionais.

Confirmando o perfil observado no teste de CBA, a exposição dos queratinócitos à CV₈₀ das substâncias ocasionou alterações no padrão de produção da citocina avaliada, conforme demonstrado na Figura 16 e na Tabela 8. Considerando as substâncias que ocasionam dano ocular (Categoria 1), todas conduziram a um aumento significativo na produção de IL-1 β (Figura 16A), de modo a se verificar diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo. Por outro lado, para as substâncias irritantes moderadas, observou-se aumento significativo apenas para duas das substâncias avaliadas, sendo elas o Hidróxido de Sódio e o Nitrato de Amônio. Tal fato deve-se, provavelmente à natureza volátil das demais substâncias pertencentes a essa categoria (1-Octanol e Cloreto de 2,6-Diclorobenzoil), as quais possivelmente foram volatilizadas durante o período de incubação, não permanecendo na concentração e no tempo adequados para ocasionarem alterações inflamatórias nos queratinócitos.

Observou-se ainda um resultado semelhante para as substâncias da Categoria 2B, das quais apenas o Ácido Glicólico conduziu ao aumento significativo da produção do biomarcador inflamatório, dada a volatilidade das outras duas amostras (Etil-2-metilacetoacetato e Ciclopentanol). Considerando-se as substâncias não irritantes, não foi observado aumento após a exposição às mesmas sendo, contudo, observada uma diminuição significativa da produção de IL-1 β induzida pelo Glicerol e pelo PEG 400.

Tabela 8: Produção de IL-1 β pelos queratinócitos HaCat após 24 horas de exposição à CV₈₀ das diferentes substâncias teste. Os resultados foram obtidos por meio da técnica de ELISA, sendo expressos sob a forma de média $\pm$ desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em duplicata. Os valores relativos foram calculados em relação ao controle negativo.

Código	Substância	Classificação <i>In vivo</i> (Draize)	Produção Relativa de IL-1β (% do controle negativo) Média $\pm$ Desvio Padrão
1	Cloreto de Benzalcônio	Categoria 1	265,6 $\pm$ 14,8
2	Imidazol	Categoria 1	221,8 $\pm$ 23,6
3	Ácido Tricloroacético	Categoria 1	2216,0 $\pm$ 142,3
4	1-Octanol	Categoria 2A	36,17 $\pm$ 23,5
5	Hidróxido de sódio	Categoria 2A	510,4 $\pm$ 102,8
6	Nitrato de Amônio	Categoria 2A	530,4 $\pm$ 77,7
7	Cloreto de 2,6-Diclorobenzoil	Categoria 2A	235,8 $\pm$ 47,6
8	Etil – 2 – metilacetoacetato	Categoria 2B	91,0 $\pm$ 16,1
9	Ácido Glicólico	Categoria 2B	310,7 $\pm$ 24,5
10	Ciclopentanol	Categoria 2B	0,4 $\pm$ 0,2
11	EDTA dissódico	Não categorizado	82,71 $\pm$ 21,6
12	Glicerol	Não categorizado	17,02 $\pm$ 12,4
13	PEG 400	Não categorizado	16,80 $\pm$ 8,6

Categoria 1: Substância que ocasiona dano ocular grave; Categoria 2A: Irritante moderado; Categoria 2B: Irritante leve; Não categorizado: Não irritante;

Uma vez analisadas as alterações individuais promovidas pelas substâncias teste, os resultados foram agrupados nas diferentes categorias do UN GHS para possibilitar a verificação de possíveis correlações quantitativas entre o potencial irritante e indução de aumento na expressão de IL-1 β . Diante dos resultados, verificou-se que, conforme observado no teste de CBA, houve um aumento gradual na produção da citocina conforme a severidade do irritante avaliado. Estatisticamente, observou-se diferença entre as substâncias das categorias 1 e não categorizadas; 2A e 2B; 2A e não categorizadas (Figura 17). Tais dados sugerem que, baseando-se na produção de IL-1 β após a exposição à CV₈₀ é possível distinguir substâncias que promovem dano ocular grave e irritantes moderados em relação a substâncias não irritantes.

Figura 16: Produção de IL-1 β pela linhagem de queratinócitos HaCat após 24 horas de exposição às diferentes substâncias-teste, de acordo com a classificação pelo sistema UN GHS, obtida por meio da técnica de ELISA. (A) Substâncias que induzem dano ocular grave (Categoria 1); (B) Substâncias irritantes moderadas (Categoria 2A); (C) Substâncias irritantes leves (Categoria 2B); (D) Substâncias não irritantes (Não categorizadas). Os resultados estão expressos como média e desvio padrão obtidos com a avaliação de dois experimentos independentes, realizados em duplicata. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparado ao controle negativo).

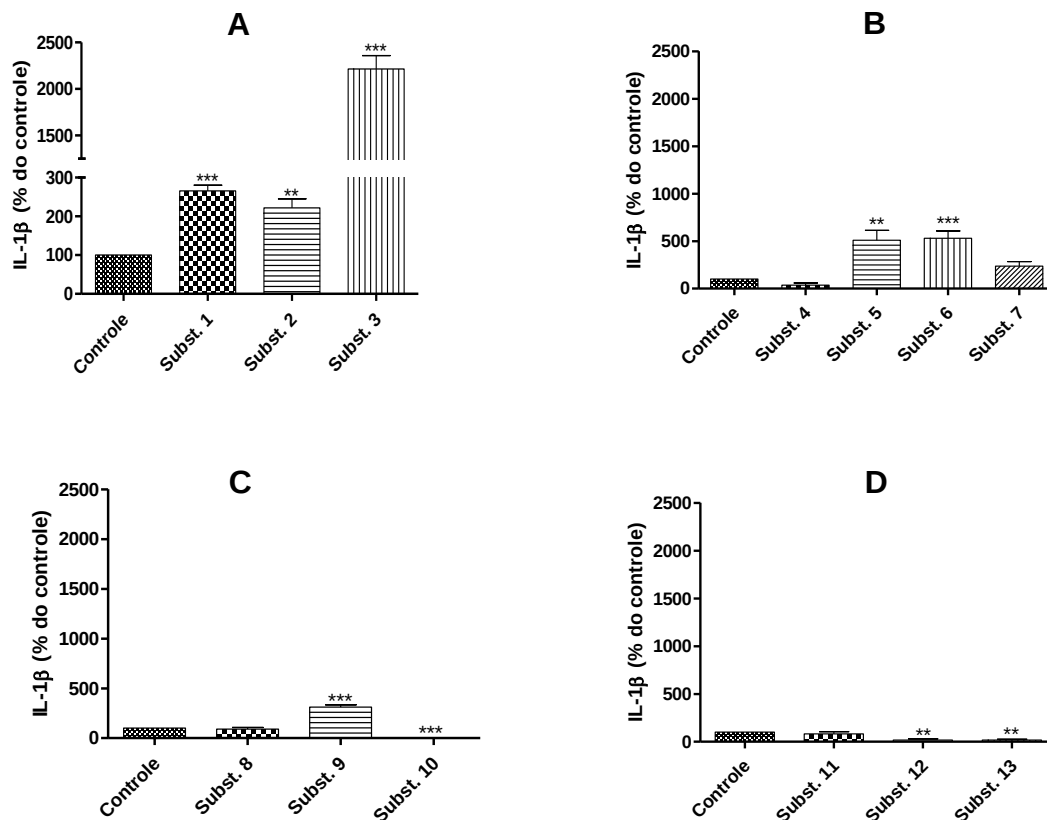
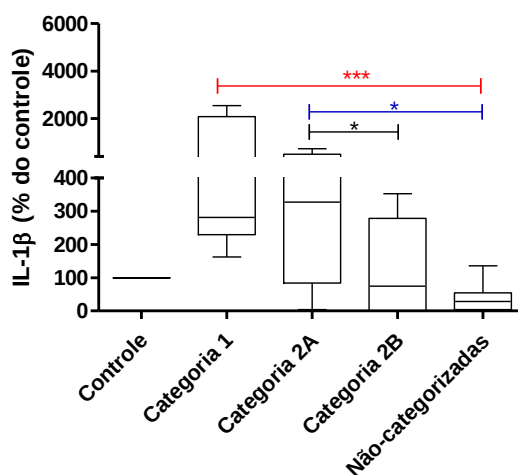


Figura 17: Produção de IL-1 β por queratinócitos HaCat após exposição à CV₈₀ das substâncias teste agrupadas nas diferentes categorias do UN GHS conforme o potencial de irritação ocular. A quantificação foi realizada por meio do ensaio de ELISA nas amostras de lisado celular coletado 24 horas após a exposição. Categoria 1: Substâncias que induzem dano ocular; Categoria 2: Irritantes moderados/leves; Não categorizadas: Não irritantes. (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ quando comparado ao controle negativo).



4.4 – Caracterização dos modelos biomiméticos de córnea:

Mediante a caracterização histológica dos modelos epiteliais, verificou-se que as condições empregadas possibilitaram a obtenção de um epitélio cuja estratificação pôde ser observada no terceiro dia de cultivo dos queratinócitos em interface ar-líquido, no qual foram observadas cerca de 2-3 camadas de células (Figura 18A). No quinto dia de cultivo, pôde-se notar a presença de 4-5 camadas de células epiteliais, conforme observado também para a córnea humana, sendo a espessura epitelial também comparável à do tecido original (Figura 18B). A partir do sétimo dia, o tecido apresentou sinais de degeneração celular como, por exemplo, intenso pleomorfismo nuclear, vacuolização citoplasmática e descamação epitelial, os quais mostraram-se mais evidentes no décimo dia de cultivo, de modo que no décimo segundo dia o epitélio apresentou total descamação (Figura 18A). Com base em tais observações, optou-se pela execução dos testes posteriores no quinto dia após o início do cultivo dos modelos 3D, no qual o epitélio mostrou-se com a integridade celular e tecidual adequadas, bem como morfológicamente semelhante ao da córnea humana.

A expressão de biomarcadores epiteliais, por sua vez, foi feita por meio da técnica de imunofluorescência indireta, sendo avaliadas as proteínas pan-citoqueratina, CD44 e Ki-67. Os marcadores colágeno I e α -tubulina foram utilizados para a delimitação da porção basal do epitélio, bem como do citoplasma das células epiteliais, respectivamente, com o objetivo de determinar precisamente a imunolocalização das proteínas avaliadas. Conforme demonstrado na Figura 19, o epitélio apresentou expressão citoplasmática de Pan-citoqueratina sob um padrão muito semelhante ao observado para o epitélio da córnea humana, o que denota o fenótipo epitelial das células constituintes do modelo 3D. Em relação ao CD44 (Figura 20), responsável pelas interações célula-célula, tal proteína foi expressa predominantemente na membrana plasmática dos queratinócitos, com marcação evidente nas regiões de contato intercelular. O marcador de proliferação celular Ki-67, por sua vez, foi a única proteína cuja expressão diferiu visivelmente em relação ao tecido original, sendo observada a expressão em todas as camadas do epitélio, diferentemente da córnea humana, na qual foi observada uma baixa expressão, que se limitou apenas à camada basal (Figura 20).

Figura 18: Fotomicrografias demonstrando a cinética de crescimento epitelial dos modelos biomiméticos de córnea (A), bem como a comparação histomorfológica do mesmo com a córnea humana (B). As imagens foram obtidas após a coloração dos cortes por Hematoxilina-eosina, sendo adquiridas em microscópio óptico em objetiva de 40x.

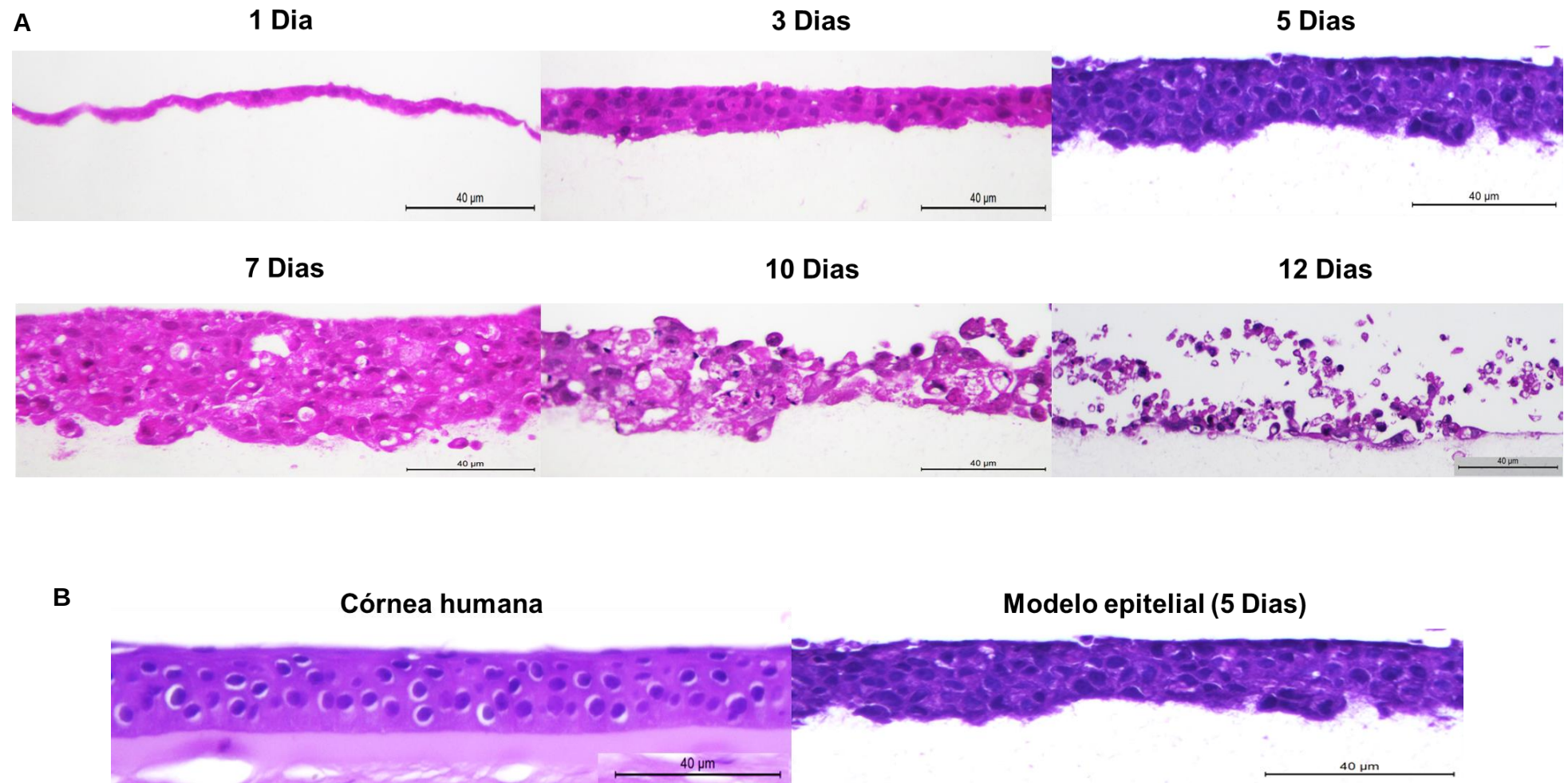


Figura 19: Fotomicrografias demonstrando a imunolocalização da proteína Pan-citoqueratina no modelo 3D e no tecido epitelial de córnea humana. As imagens foram obtidas por meio da técnica de imunofluorescência indireta, sendo adquiridas em microscópio de fluorescência na objetiva de 20x.

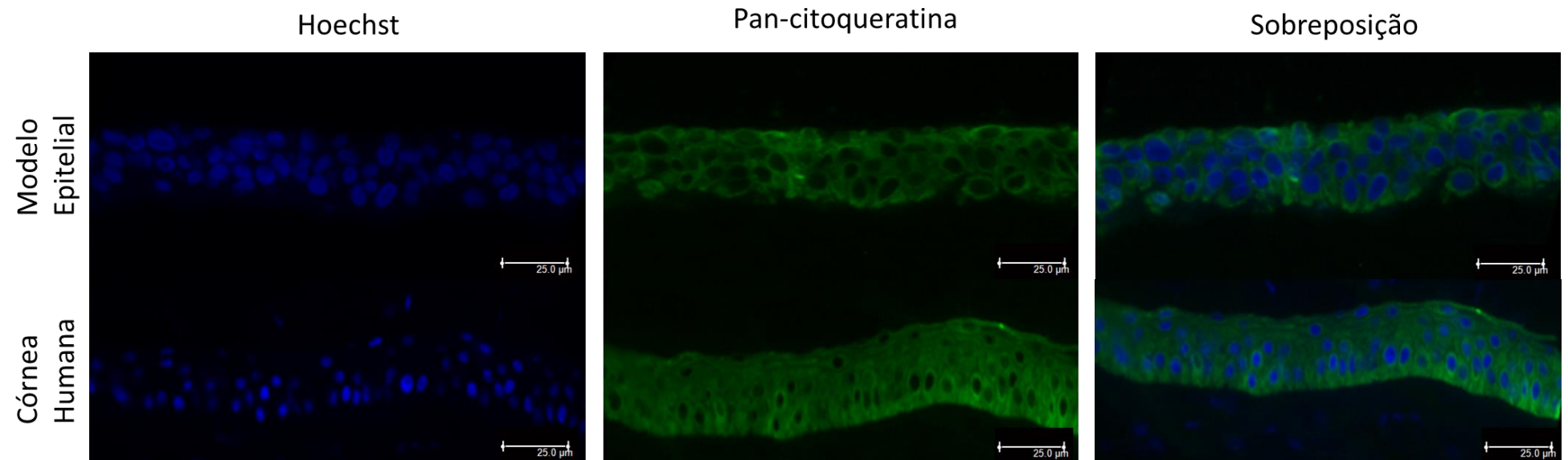
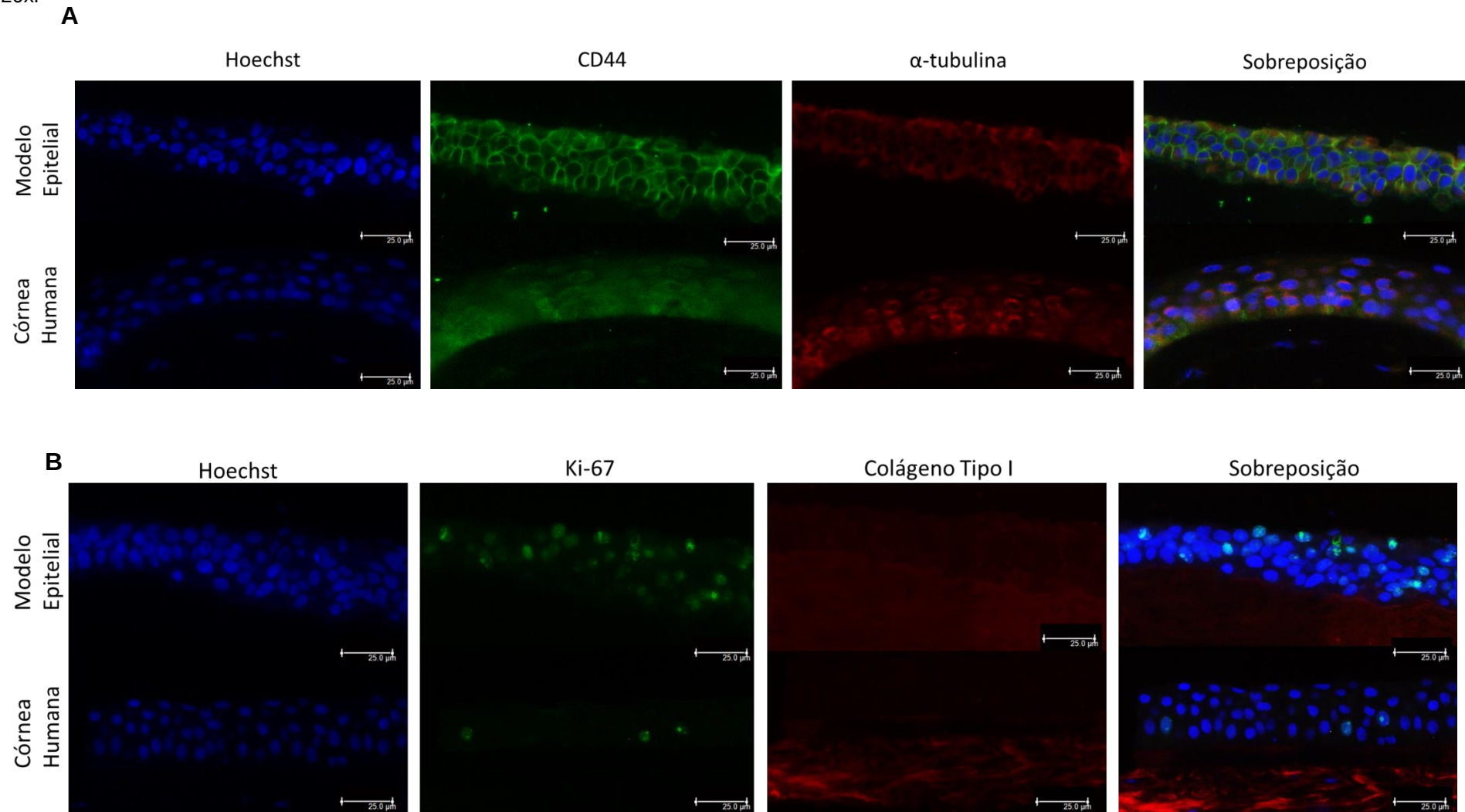
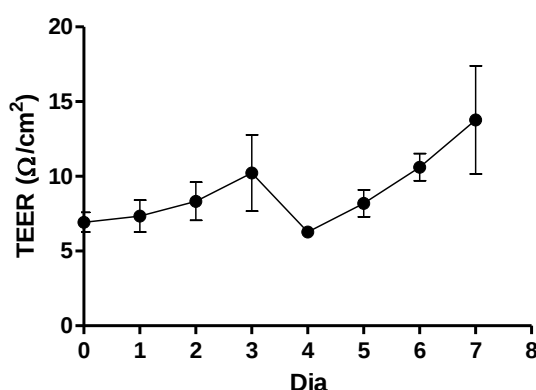


Figura 20: Fotomicrografias demonstrando a imunolocalização das proteínas CD44 e α -tubulina (A); Ki-67 e colágeno tipo I (B) no modelo 3D e no tecido epitelial de córnea humana. As imagens foram obtidas por meio da técnica de imunofluorescência indireta, sendo adquiridas em microscópio de fluorescência na objetiva de 20x.



Somada aos resultados anteriormente descritos, a resistência transepitelial (TEER) também foi diariamente avaliada durante sete dias para avaliar a função de barreira do epitélio reconstruído. Conforme evidenciado na Figura 21, o modelo apresentou valores positivos de resistência desde o primeiro dia de cultivo, os quais demonstraram um discreto aumento até o terceiro dia, que foi retomado no quinto dia de crescimento e se mantiveram constantes até o fim da avaliação.

Figura 21: Representação gráfica da resistência transepitelial (TEER) do modelo biomimético de córnea durante sete dias de avaliação. Os resultados foram obtidos mediante utilização do sistema Millicel® ERS-2, sendo as medidas realizadas diariamente, em duplicata.



4.5 - Avaliação da aplicabilidade do modelo epitelial para a detecção de substâncias irritantes:

A viabilidade tecidual dos modelos foi utilizada como parâmetro para avaliar a capacidade preditiva destes em relação à classificação de agentes irritantes oculares. Para tal, os mesmos foram expostos a substâncias pertencentes às diferentes categorias do UN GHS, tendo a viabilidade tecidual determinada 24 horas após a exposição, mediante utilização do método de redução do MTT.

Após a avaliação dos resultados, verificou-se que diferenças na viabilidade dos modelos foram observadas após exposição às diferentes substâncias, resguardando-se diferenças em relação às diferentes categorias, as quais estão representadas na Tabela 9 e na Figura 22.

Tabela 9: Valores de viabilidade tecidual obtidos após a exposição dos modelos 3D às substâncias oriundas das diferentes categorias do UN GHS. Os testes foram realizados em duplicata e os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão, sendo obtidos mediante o método de redução do MTT 24 horas após a exposição.

Código	Substância	Classificação <i>In vivo</i> (Draize)	Viabilidade Tecidual (% em relação ao controle negativo) Média $\pm$ Desvio padrão
1	Cloreto de Benzalcônio 5%	Categoria 1	3,81 $\pm$ 0,28
2	Imidazol	Categoria 1	1,13 $\pm$ 0,06
3	Ácido Tricloroacético 30%	Categoria 1	2,95 $\pm$ 0,18
4	1-Octanol	Categoria 2A	2,27 $\pm$ 1,42
5	Hidróxido de sódio 1%	Categoria 2A	0,75 $\pm$ 0,35
6	Nitrato de Amônio	Categoria 2A	21,47 $\pm$ 3,61
7	Cloreto de 2,6-Diclorobenzoil	Categoria 2A	24,84 $\pm$ 13,40
8	Etil – 2 – metilacetoacetato	Categoria 2B	93,37 $\pm$ 12,36
9	Ácido Glicólico 10%	Categoria 2B	0,96 $\pm$ 1,35
10	Ciclopentanol	Categoria 2B	2,04 $\pm$ 0,45
11	EDTA dissódico	Não categorizado	112,87 $\pm$ 6,34
12	Glicerol	Não categorizado	79,85 $\pm$ 24,36
13	PEG 400	Não categorizado	63,27 $\pm$ 8,89

Categoria 1: Substância que induz dano ocular grave; Categoria 2A: Irritante moderado; Categoria 2B: Irritante leve; Não categorizado: Não irritante;

Após a avaliação individual dos valores de viabilidade tecidual obtidos mediante exposição dos modelos às diferentes substâncias, os resultados foram agrupados de modo a possibilitar avaliações referentes à correlação desse *endpoint* com o potencial irritante dos agentes testados (Tabela 10). Mediante avaliação estatística, constatou-se que os resultados obtidos para as Categorias 1, 2A e 2B diferiram significativamente dos valores encontrados para as amostras não categorizadas, o que evidencia a capacidade do método proposto em distinguir substâncias irritantes de não irritantes (Figura 23).

Figura 22: Viabilidade tecidual dos modelos epiteliais 24 horas após exposição às diferentes substâncias-teste, de acordo com a classificação pelo sistema UN GHS. (A) Substâncias que induzem dano ocular grave (Categoria 1); (B) Substâncias irritantes moderadas (Categoria 2A); (C) Substâncias irritantes leves (Categoria 2B); (D) Substâncias não irritantes (Não categorizadas). Os resultados estão expressos como média e desvio padrão obtidos com a avaliação de ensaios realizados em duplicata. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparado ao controle negativo), sendo obtidos por meio da utilização do método de redução do MTT.

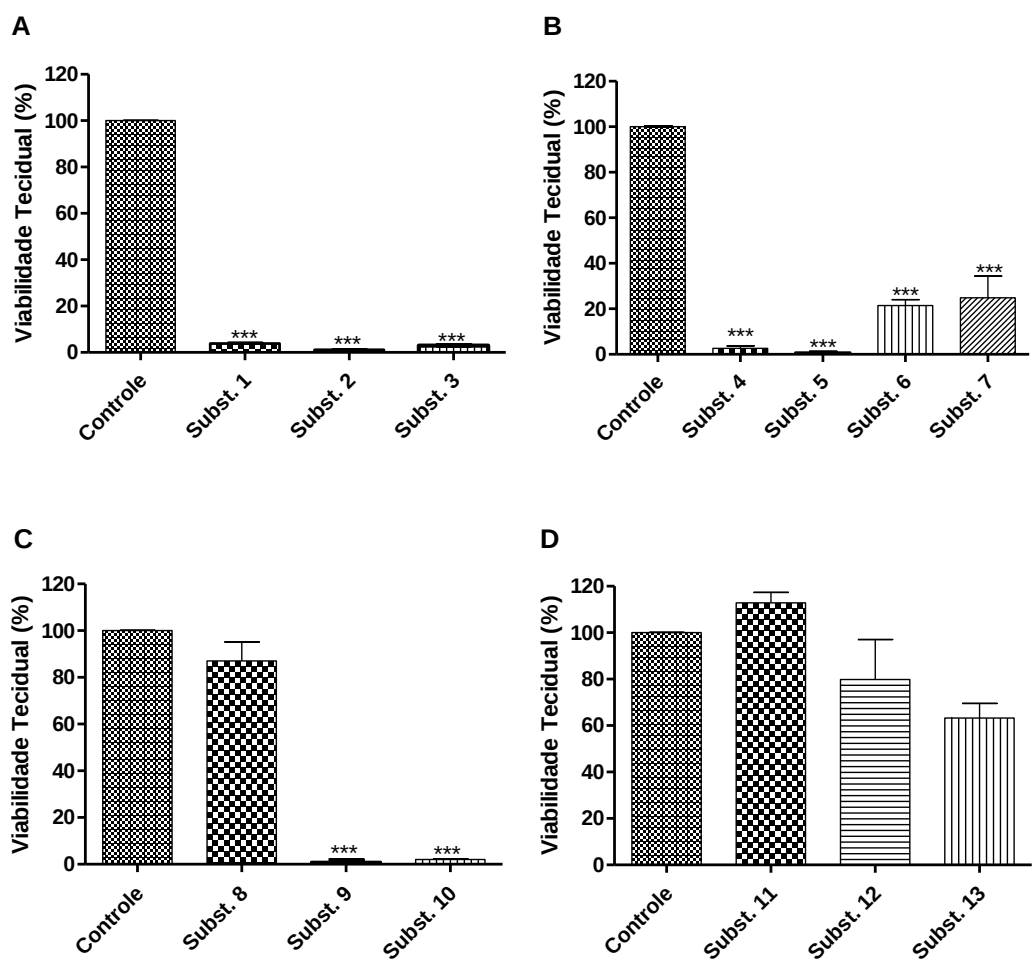
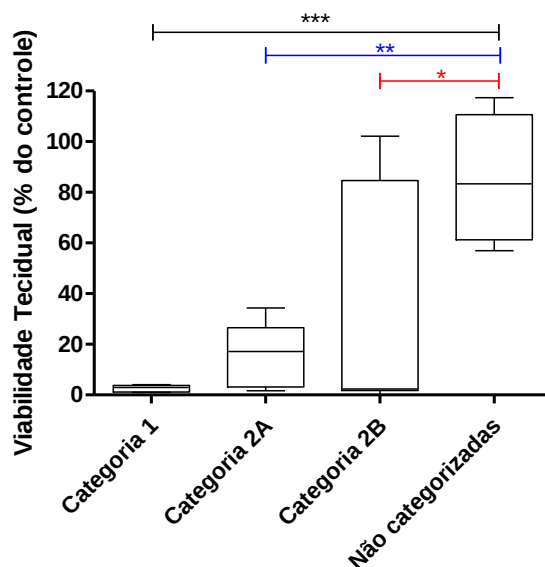


Tabela 10: Resultados obtidos frente o agrupamento dos valores de viabilidade tecidual nas diferentes categorias do UN GHS, de acordo com a classificação das substâncias-teste avaliadas. A avaliação foi realizada 24 horas após a exposição dos modelos às amostras, por meio do método de redução do MTT.

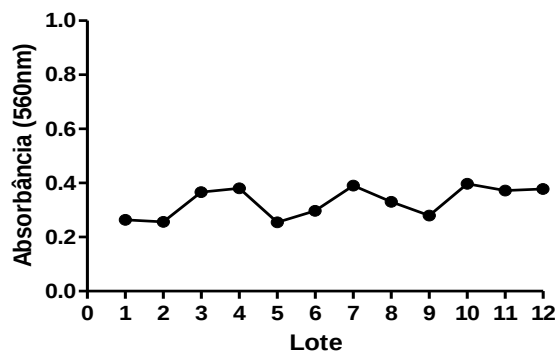
Categoria UN GHS	Valor Mínimo (% do controle)	Valor Máximo (% do controle)	Média	Desvio Padrão
1	1,10	4,01	2,63	1,24
2A	1,70	34,32	16,34	12,36
2B	0,00	102,10	38,18	46,46
Não categorizadas	56,99	117,4	85,33	25,55

Figura 23: Viabilidade tecidual dos modelos epiteliais 24 horas após exposição às diferentes substâncias-teste agrupadas nas diferentes categorias do UN GHS, conforme o potencial de irritação ocular, avaliada por meio do método de redução do MTT. Categoria 1: Substâncias que induzem dano ocular grave; Categoria 2: Irritantes moderados/leves; Não categorizadas: Não irritantes. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparado ao controle negativo).



Adicionalmente, objetivando-se avaliar a reprodutibilidade da obtenção dos modelos epiteliais, a viabilidade tecidual de 12 diferentes lotes dos mesmos foi avaliada para verificar possíveis flutuações nos valores basais de absorbância fornecidos pela análise dos controles negativos. Tal resultado (Figura 24) mostra que tais valores variam dentro do intervalo de 0,2 a 0,4, não apresentando grande variabilidade dentro dessa faixa, o que denota a reprodutibilidade desse *endpoint*, bem como do método de obtenção utilizado para a construção dos tecidos.

Figura 24: Representação gráfica dos valores de absorbância obtidos mediante a avaliação de 12 diferentes lotes do modelo biomimético de córnea, obtidos por meio da técnica de redução do MTT.



4.6 – Avaliação da produção de IL-1 β pelo modelo 3D após exposição às substâncias teste

Com o objetivo de comparar os resultados referentes ao perfil inflamatório dos queratinócitos HaCat frente à exposição aos compostos testados, o ensaio de ELISA para quantificação de IL-1 β foi conduzido com o meio presente no compartimento basal dos insertos, 24 horas após a exposição dos modelos epiteliais às substâncias-teste. Conforme observado na Figura 25 e na Tabela 11, as substâncias que promovem dano ocular grave (Categoria 1) em sua totalidade ocasionaram uma diminuição na produção desse biomarcador, o que de certa forma era previsível, uma vez que tais substâncias conduziram à completa perda da viabilidade tecidual. Resultado semelhante foi obtido para o NaOH 1% (Categoria 2A), que suscitou na diminuição da produção de IL-1 β associada à ausência de viabilidade celular detectável. Para as demais substâncias, observou-se aumento significativo ou ausência de alterações significativas para tal alteração inflamatória (Figura 25).

Da mesma forma como foi feito para os demais *endpoints* avaliados, a produção de IL-1 β pelo modelo biomimético de córnea também foi avaliada mediante o agrupamento dos resultados nas respectivas categorias do UN GHS. Conforme ilustrado na Figura 26, com exceção da Categoria 1 todas as demais categorias, bem como as substâncias não categorizadas, conduziram a um aumento na produção desse biomarcador, não sendo constatadas diferenças significativas entre os diferentes grupos.

Tabela 11: Produção de IL-1 β pelos modelos biomiméticos de córnea 24 horas após a exposição às substâncias pertencentes às diferentes categorias do UN GHS. Os ensaios foram conduzidos em duplicata e realizados por meio da técnica de ELISA, sendo os resultados expressos como Média $\pm$ Desvio Padrão.

Código	Substância	Classificação <i>In vivo</i> (Draize)	Produção de IL-1β pelos modelos 3D (% do controle negativo) Média $\pm$ Desvio padrão
1	Cloreto de Benzalcônio 5%	Categoria 1	*
2	Imidazol	Categoria 1	*
3	Ácido Tricloroacético 30%	Categoria 1	*
4	1-Octanol	Categoria 2A	860,67 $\pm$ 110,27
5	Hidróxido de sódio 1%	Categoria 2A	1,76 $\pm$ 2,48
6	Nitrato de Amônio	Categoria 2A	997,56 $\pm$ 354,48
7	Cloreto de 2,6-Diclorobenzoil	Categoria 2A	119,66 $\pm$ 54,08
8	Etil – 2 – metilacetoacetato	Categoria 2B	1083,69 $\pm$ 192,10
9	Ácido Glicólico 10%	Categoria 2B	185,93 $\pm$ 57,70
10	Ciclopentanol	Categoria 2B	779,91 $\pm$ 49,38
11	EDTA dissódico	Não categorizado	472,07 $\pm$ 127,10
12	Glicerol	Não categorizado	1229,43 $\pm$ 74,89
13	PEG 400	Não categorizado	252,75 $\pm$ 67,98

* Valores abaixo do limite de detecção do método. Categoria 1: Substância que induz dano ocular grave; Categoria 2A: Irritante moderado; Categoria 2B: Irritante leve; Não categorizado: Não irritante;

Figura 25: Produção de IL-1 β pelo modelo epitelial 24 horas após a exposição às diferentes substâncias-teste, de acordo com a classificação pelo sistema UN GHS. (A) Substâncias que induzem dano ocular grave (Categoria 1); (B) Substâncias irritantes moderadas (Categoria 2A); (C) Substâncias irritantes leves (Categoria 2B); (D) Substâncias não irritantes (Não categorizadas). Os resultados estão expressos como média e desvio padrão obtidos com a avaliação de dois experimentos independentes. (**p<0,01; *** p < 0,001 quando comparado ao controle negativo).

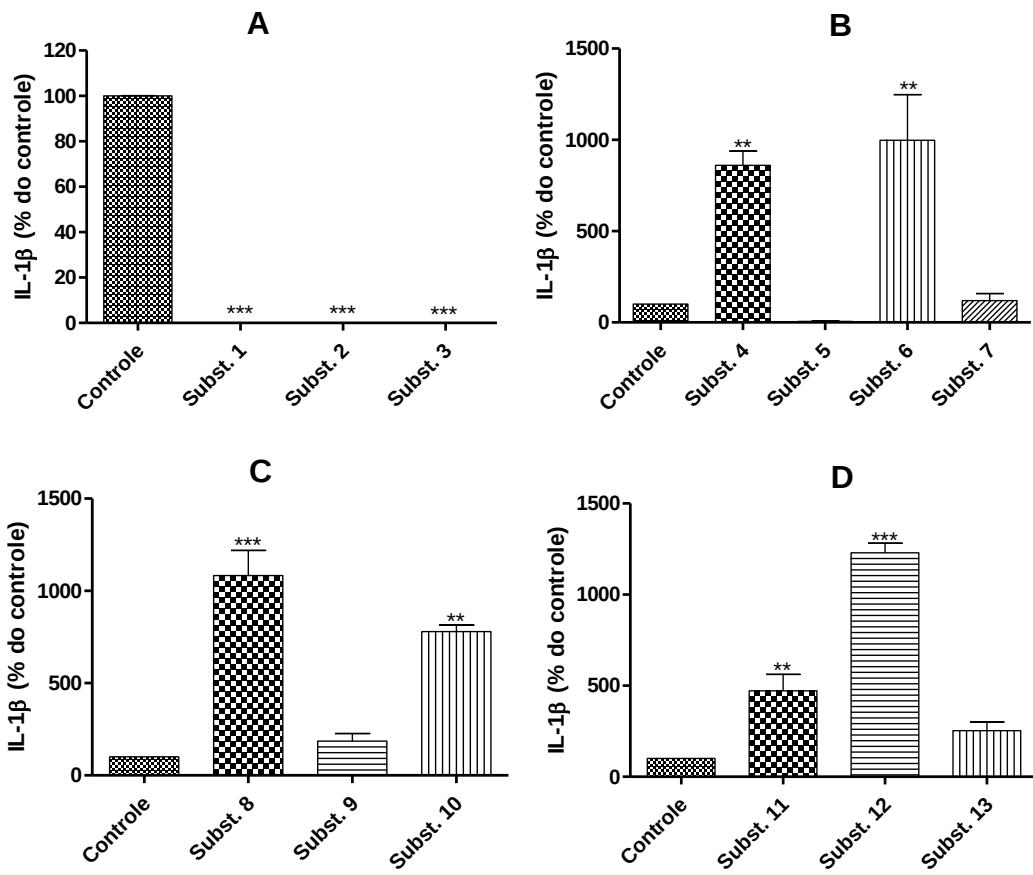
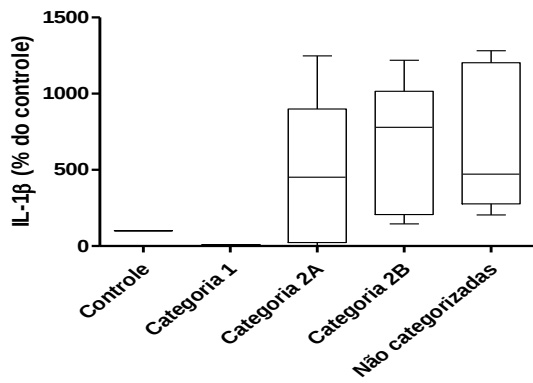


Figura 26: Produção de IL-1 β pelo modelo epitelial 24 horas após exposição as substância teste agrupadas nas diferentes categorias do UN GHS, de acordo com o potencial de irritação ocular, a qual foi obtida empregando-se o método de ELISA.



4.7 – Avaliação do potencial de irritação ocular das amostras de Hena mediante utilização da plataforma em monocamada e do modelo epitelial 3D:

A aplicabilidade dos métodos propostos considerando-se a avaliação das chamadas “*real life mixtures*” ou misturas da vida real foi verificada mediante a condução de testes com cinco amostras de Hena de sobrancelha comercializadas localmente, as quais não continham no rótulo nenhuma advertência sobre possíveis riscos de irritação ocular frente à exposição. Dessa forma, o potencial citotóxico das mesmas foi avaliado sobre os queratinócitos HaCat em monocamada para a determinação da CV_{80} , de modo a possibilitar a avaliação da produção de IL-1 β após o tratamento com essa concentração referente a cada produto.

Avaliando-se a atividade citotóxica, constatou-se que todas as amostras apresentaram citotoxicidade de modo concentração-dependente após 24 horas de exposição, conforme representado na Figura 27, de modo que os valores das CI_{50} e da CV_{80} estão descritos na Tabela 12.

Tabela 12: Valores de CI_{50} e CV_{80} das amostras comerciais de Hena de sobrancelha, obtidos por meio do método de redução do MTT após 24 horas de exposição às concentrações de 10 – 0,078mg/mL. Foram avaliadas as médias de três experimentos independentes, realizados em triplicata.

Amostra	CI_{50} (mg/mL)	CV_{80} (mg/mL)
Hena 1	0,34	0,24
Hena 2	1,45	0,58
Hena 3	1,23	0,68
Hena 4	0,15	0,06
Hena 5	0,14	0,02

CI_{50} : Concentração Inibitória de 50% do crescimento celular; CV_{80} : Concentração na qual a viabilidade celular é de 80%.

Após a avaliação do perfil citotóxico das amostras, a produção de IL-1 β pela linhagem HaCat foi investigada para avaliação do possível efeito pró-inflamatório destas, conforme demonstrado pelos ensaios conduzidos com as substâncias-teste. Entretanto, de posse dos resultados verificou-se que, em relação ao controle negativo, as misturas não promoveram alterações significativas na produção desse biomarcador inflamatório, conforme demonstrado na Tabela 13 e na Figura 28.

Figura 27: Citotoxicidade das amostras comerciais de Hena de sobancelha 1(A), 2(B), 3 (C), 4 (D) e 5(D) sobre os queratinócitos HaCat, obtida por meio do método de redução do MTT. As amostras foram expostas por 24 horas nas concentrações de 10,0 – 0,078mg/mL, sendo avaliadas a média de três experimentos independentes, realizados em triplicata.

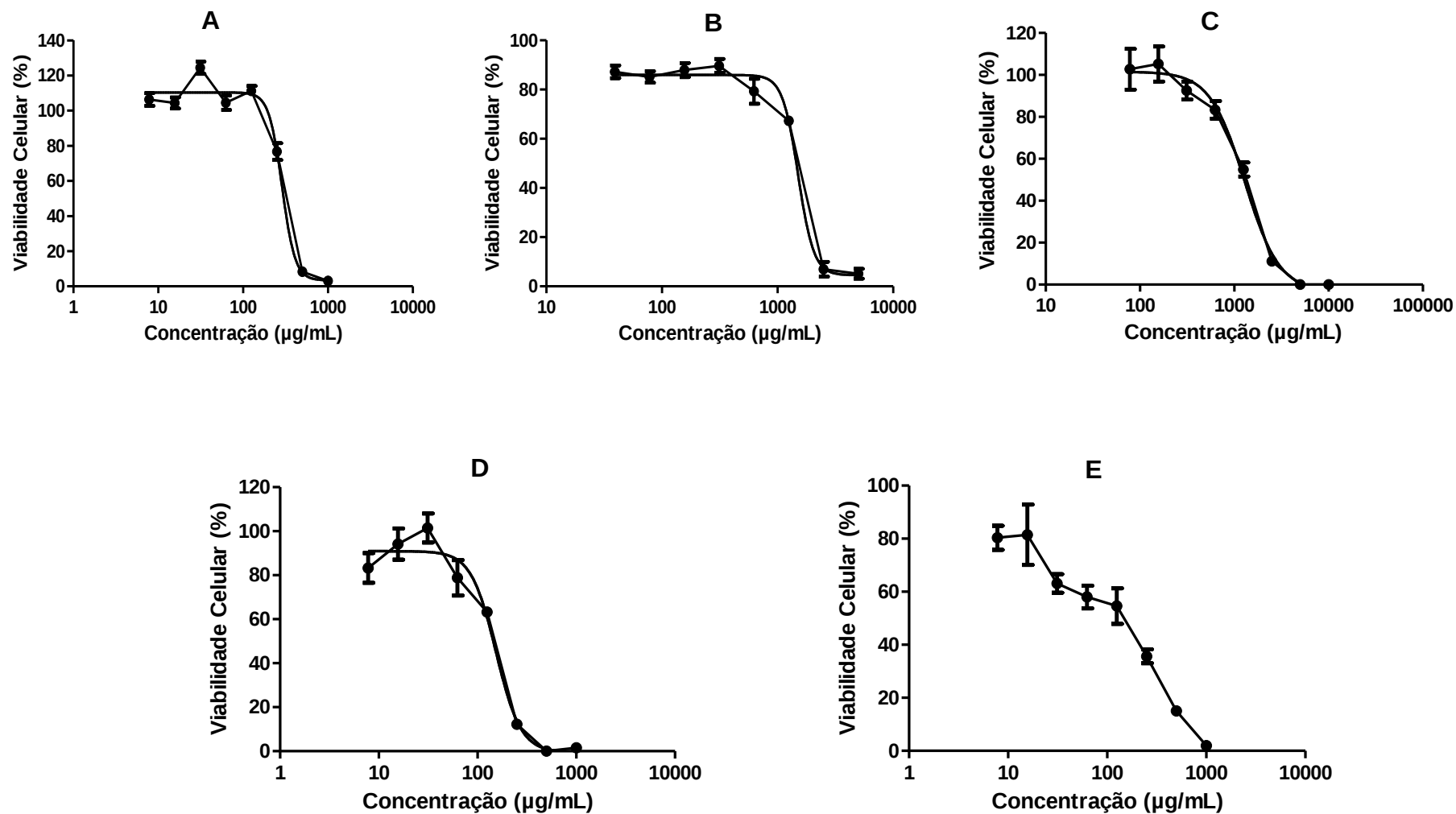
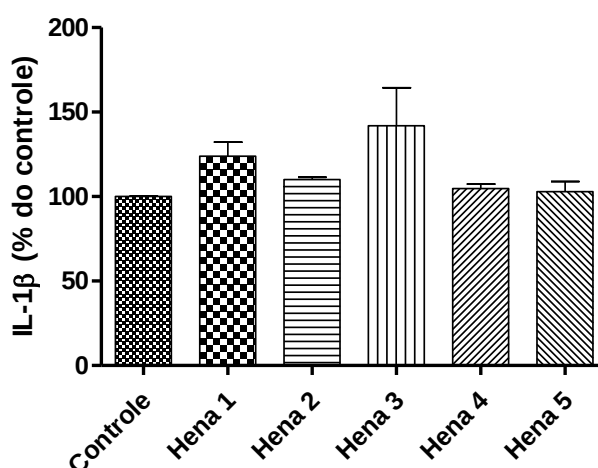


Tabela 13: Produção de IL-1 β pelos queratinócitos HaCat após 24 horas de exposição à CV₈₀ das diferentes amostras de Hena de sobrancelha. Os resultados foram obtidos por meio da técnica de ELISA, sendo expressos sob a forma de média $\pm$ desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em duplicata. Os valores relativos foram calculados em relação ao controle negativo.

Amostra	Produção Relativa de IL-1 β (% do controle negativo) Média $\pm$ Desvio Padrão
Hena 1	123,9 $\pm$ 8,4
Hena 2	110,0 $\pm$ 1,4
Hena 3	141,9 $\pm$ 22,6
Hena 4	104,8 $\pm$ 2,7
Hena 5	102,9 $\pm$ 6,0

Figura 28: Produção de IL-1 β pela linhagem de queratinócitos HaCat após 24 horas de exposição à CV₈₀ das diferentes amostras de Hena de sobrancelha.



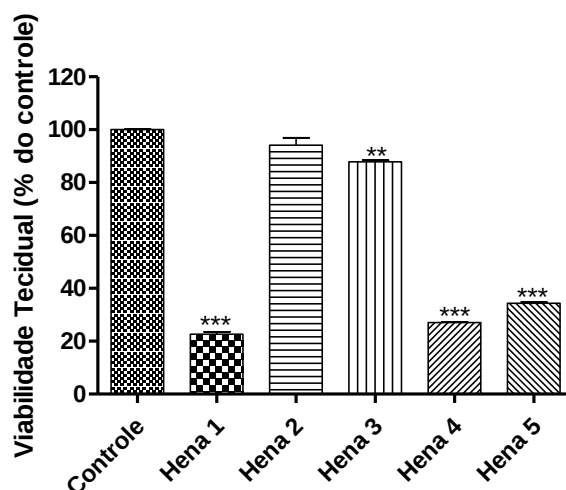
Apesar das alterações na produção de IL-1 β não terem sido estatisticamente significativas, observou-se uma tendência ao aumento de 23,9% e 41,9% ocasionado pelas amostras de Hena 1 e 3, respectivamente, o que de acordo com os intervalos obtidos mediante a avaliação das substâncias teste, as classificaria como irritantes moderados ou leves considerando-se esse *endpoint*.

Além da avaliação feita com as células em monocamada, tais misturas foram também avaliadas empregando-se o modelo biomimético de córnea para a comparação das duas plataformas de avaliação. Em concordância com o demonstrado na Tabela 14 e na Figura 29, das cinco amostras analisadas quatro ocasionaram uma diminuição significativa da viabilidade tecidual após a exposição.

Tabela 14: Valores de viabilidade tecidual obtidos após a exposição dos modelos 3D às dispersões das amostras de Hena de sobrancelha (10%). Os testes foram realizados em duplicata e os valores estão expressos como Média $\pm$ Desvio Padrão, sendo obtidos por meio do método de redução do MTT 24 horas após a exposição.

Amostra	Viabilidade Tecidual (% do controle negativo) Média $\pm$ Desvio Padrão
Hena 1	22,7 $\pm$ 0,8
Hena 2	94,2 $\pm$ 2,8
Hena 3	87,8 $\pm$ 0,6
Hena 4	27,1 $\pm$ 0,2
Hena 5	34,4 $\pm$ 0,4

Figura 29: Viabilidade tecidual dos modelos epiteliais 24 horas após exposição às amostras comerciais de Hena de sobrancelha. Os resultados estão expressos como média e desvio padrão obtidos com a avaliação de ensaios realizados em duplicata. (**p<0,01; *** p < 0,001 quando comparado ao controle negativo).



De acordo com os resultados supracitados, nota-se que as amostras de Hena 1, 3, 4 e 5 conduziram a valores de viabilidade tecidual que, considerando-se os valores obtidos para as substâncias-teste previamente descritos, atribuiriam a esses produtos a classificação de irritantes moderados ou leves, principalmente para as amostras 1, 4 e 5, cujos valores mostraram-se inferiores a 40%.

Dada a crescente necessidade da avaliação toxicológica de substâncias e misturas de um modo geral, a toxicidade ocular se posiciona como parâmetro de avaliação obrigatória que, nas últimas décadas foi rotineiramente avaliado mediante utilização do Teste de Draize, feito em coelhos. Contudo, devido aos avanços científicos e tecnológicos, bem como o banimento do uso de animais para avaliação toxicológica de produtos cosméticos, a utilização de tal metodologia não se justifica dadas suas limitações científicas e preditivas (HARTUNG, 2009). Diante disso, o presente estudo se propôs a avaliar parâmetros mecanísticos do processo de toxicidade ocular, bem como correlacionar estes ao grau de severidade de substâncias químicas e misturas.

A citotoxicidade é um parâmetro já utilizado para avaliação do potencial de irritação ocular. Esse *endpoint* correlaciona-se com o dano celular no tecido ocular ocasionado pelo contato deste com agentes irritantes, os quais levam a uma citotoxicidade local que está estritamente correlacionada com o processo de irritação/corrosão (MAURER; PARKER; JESTER, 2002). Diversos trabalhos evidenciam que o uso de linhagens celulares em monocamada, provenientes ou não do tecido ocular, apresentam aplicabilidade para o *screening* de agentes irritantes, não sendo, contudo suficientes para a classificação definitiva destes (TACHON et al., 1989; CHIBA et al., 1999; YANG et al., 2012; WILSON, AHEARNE, HOPKINSON, 2015).

Entretanto, conforme observado no presente estudo, esse parâmetro não apresentou correlação com a severidade das substâncias teste avaliadas, uma vez que os valores de CI_{50} não foram necessariamente menores quanto maior o potencial de irritação. Resultado semelhante foi encontrado em um estudo conduzido por Czajkowska-Kosnik e colaboradores (2014), no qual foram avaliados a citotoxicidade e a irritação ocular *in vivo* de agentes surfactantes comumente encontrados na composição de produtos farmacêuticos. Mediante avaliação, os autores constataram que os valores de viabilidade celular não se correlacionaram com o *score* obtido no teste de Draize para tais substâncias, nos tempos de 24 e 48 horas de exposição.

Dessa forma, apesar dos métodos que se baseiam na utilização de linhagens celulares em monocamada serem úteis para a identificação preliminar de irritantes e corrosivos, a

citotoxicidade frente à linhagem de queratinócitos HaCat não permitiu tal inferência tomando-se esse como único parâmetro de avaliação. Porquanto, optou-se por seguir com a compreensão da participação de outros indicadores de dano no processo de toxicidade ocular, sendo as alterações inflamatórias selecionadas para as avaliações subsequentes.

A inflamação é um dos componentes determinantes do processo de irritação ocular, cujas alterações culminam na via final dessa alteração de cunho patológico. O globo ocular possui uma estrutura imunológica particular que permite esse sistema responder prontamente a danos promovidos por agentes agressores externos de origem química, física ou microbiológica (CASPI, 2013). Considerando-se a toxicidade ocular induzida por químicos, a inflamação é considerada a via final do processo de irritação, a qual ocorre mediante a produção de mediadores inflamatórios pelas células epiteliais, bem como pela infiltração de células inflamatórias no sistema óptico (MICHAEL; WAGONER, 1997).

Entretanto, apesar da relevância mecanística, a inflamação ainda não é um parâmetro avaliado em nenhum método alternativo validado e utilizado para investigação do potencial de irritação ocular. Diante disso, no presente estudo o perfil inflamatório dos queratinócitos HaCat foi verificado após exposição às diferentes substâncias teste com o objetivo de identificar a participação de biomarcadores pró-inflamatórios na resposta celular a agentes irritantes.

Conforme descrito, as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 tiveram sua produção aumentada em resposta à exposição a irritantes oculares. A IL-6 é uma interleucina multifuncional, que atua como agente quimiotático de leucócitos, bem como regula a proliferação e diferenciação de linfócitos T e B e regula a produção de várias classes de imunoglobulinas (IgA, IgG e IgM) (AKDIS et al., 2016). Apesar da correlação quantitativa insuficiente com a severidade das substâncias irritantes testadas, a IL-6 mostrou-se um elemento positivamente modulado, confirmando a instauração de alterações inflamatórias a nível celular em decorrência da exposição a agentes irritantes.

A IL-1 β , por outro lado, é um componente da resposta imune inata produzido por vários tipos de células em resposta ao reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (*PAMPs - Pathogen Associated Molecular Pattern*) ou de padrões moleculares associados a perigo (*DAMPs - Danger Associated Molecular Pattern*), sendo estes últimos biomoléculas endógenas liberadas mediante o dano celular e tecidual (LOPEZ-CASTEJON; BROUGH, 2011). Biologicamente, essa citocina regula a produção e secreção de outras citocinas inflamatórias, bem como participa de manifestações clínicas como febre, hipotensão,

alterações hormonais que contribuem para o estabelecimento e manutenção do processo inflamatório (LI et al., 2008). Conforme mencionado, os níveis intracelulares desse biomarcador se correlacionaram quantitativamente com o potencial irritante das substâncias teste, o que foi constatado tanto pelo método de CBA quanto pela técnica de ELISA.

Apesar da ausência de métodos que relacionem a toxicidade ocular à inflamação, outros autores já se propuseram a investigar esse *endpoint*, bem como seu papel nesse processo. Sladowski e colaboradores (2005) propuseram a utilização de células primárias do epitélio da córnea, oriundas de material de descarte de bancos de olhos, como modelo para avaliação do potencial de irritação ocular. Nesse estudo, verificou-se que os corneócitos aumentaram a produção de IL-1 β em resposta à exposição ao Lipopolissacarídeo (LPS), demonstrando que tais células são imunologicamente competentes para responderem a estímulos inflamatórios e que esse biomarcador é modulado em tais circunstâncias (SLADOWSKI et al., 2015).

Em contrapartida, Kim e colaboradores (2016) publicaram um estudo no qual corneócitos humanos imortalizados com o vetor SV40 foram expostos a diferentes substâncias irritantes, tendo o perfil de citocinas e a citotoxicidade avaliados. Apesar da IL-1 β não ter sido avaliada no trabalho supracitado, as citocinas IL-6, TNF- α e IFN- γ foram positivamente moduladas em decorrência dessa exposição, reiterando a participação do componente inflamatório na fisiopatologia da irritação ocular (KIM et al., 2016).

Paralelamente, foi ainda observada uma tendência de aumento na produção da citocina anti-inflamatória IL-10, após exposição às substâncias pertencentes à Categoria 1. A IL-10 é uma interleucina que possui papel fundamental na supressão da resposta inflamatória, bem como no reparo tecidual durante e após a instauração do processo inflamatório. Os queratinócitos são células capazes de expressar esse biomarcador em diversas condições patológicas e fisiológicas, contribuindo para a manutenção da integridade epitelial em resposta à inflamação (OUYANG et al., 2011; IYER; CHENG, 2012; DIEZ; MIRANDA-SAAVEDRA, 2018). Nesse contexto, os queratinócitos HaCaT expostos às substâncias que induzem dano ocular (Categoria 1) demonstraram uma tendência no aumento da produção desse biomarcador, diferentemente do observado para as substâncias irritantes (Categoria 2). Tais resultados sugerem que, em associação à produção de IL-1 β , esse marcador de exposição possa auxiliar na distinção e classificação de substâncias nas categorias 1 e 2.

Além das avaliações feitas empregando-se a linhagem HaCaT em monocamada, tais células foram empregadas para a construção de um modelo epitelial, cuja

caracterização e avaliação do desempenho deste em identificar agentes irritantes oculares foram realizadas. Os queratinócitos HaCat foram isolados em 1988 por Boukamp e colaboradores, e passaram por um processo de imortalização espontânea devido à ocorrência de alterações cromossômicas sequenciais que ocorreram *in vitro* durante o cultivo dos mesmos. Tais alterações, contudo, não culminaram na instabilidade genômica da linhagem, a qual apesar de imortalizada, não apresenta características tumorais considerando-se o genótipo e o fenótipo (BOUKAMP et al., 1988).

Desde o seu isolamento e caracterização, várias foram as tentativas de utilização dos queratinócitos HaCat na reconstrução de modelos organotípicos de pele, para condução de estudos fármaco-toxicológicos *in vitro*. Todavia, independentemente de possuir o fenótipo de diferenciação celular semelhante ao de queratinócitos humanos primários, a linhagem HaCat apresenta algumas restrições quanto à capacidade de estratificação e queratinização mediante o cultivo em interface ar-líquido (BOELSMA et al., 1999; SCHOOP et al., 1999; LEE et al., 2014).

Apesar de possibilitarem a obtenção de um epitélio estratificado após a permanência por alguns dias em interface ar-líquido, o mesmo não apresenta algumas características morfofuncionais essenciais da epiderme, como a ausência das camadas granulosa e córnea, bem como a baixa produção de glucosilceramidas e ceramidas tipicamente encontradas nesse tecido (BOELSMA et al., 1999). Além disso, apenas um pequeno número de grânulos de querato-hialinos e a degradação incompleta de organelas celulares podem ser observados nas camadas mais superficiais do epitélio, os quais somados ao incompleto empacotamento da queratina e a alterações no metabolismo lipídico comprometem a reprodução fidedigna do estrato epidermal *in vitro* (SCHOOP et al., 1999).

Diante disso, as limitações de diferenciação da linhagem HaCat foram utilizadas no presente trabalho como ferramenta para a obtenção do modelo epitelial proposto. Apesar de não serem células pertencentes ao sistema fotorreceptor, tais queratinócitos proporcionaram a reconstrução de um epitélio com morfologia e expressão de biomarcadores representativos do tecido ocular, o qual apresentou um número adequado de camadas e ausência de queratinização, garantindo a homologia ao tecido original.

Além da caracterização morfológica, a expressão dos marcadores Citoqueratina, CD44 e Ki-67 foram avaliados no tecido reconstruído com o objetivo de se comparar com os padrões de expressão no epitélio da córnea humana. As citoqueratinas consistem em

um grupo de proteínas estruturais encontradas exclusivamente no citoesqueleto de células epiteliais, as quais são compostas por grupamentos de filamentos intermediários e, além de permitirem a diferenciação fenotípica, possuem fundamental importância estrutural na sustentação do arcabouço citoplasmático (MARCEAU; LORANGER, 1995). Tais proteínas possuem características ácidas ou básicas e, geralmente, são expressas sob a forma de heterodímeros compostos por uma proteína de caráter ácido e uma de caráter básico (LIU et al., 1993; LIU et al., 1994). Em relação à córnea humana, as células epiteliais expressam especificamente e majoritariamente um heterodímero composto pelas queratinas 3 e 12 (CK-3/12), o qual advém da diferenciação epitelial e permite a distinção fenotípica destas em relação às demais células epiteliais do organismo (KINOSHITA et al., 2001).

No presente estudo, apesar da expressão da CK-3/12 não ter sido avaliada em decorrência do tipo celular empregado na reconstrução do modelo, o mesmo apresentou um padrão regular de expressão comparável ao encontrado no epitélio da córnea humana, sendo investigadas as citoqueratinas 4, 5, 6, 7, 10, 13, 14, 18 e 19, conforme a especificidade da mistura de anticorpos utilizada. Tal achado justifica-se pelo fato de, além da CK-3/12, o epitélio da córnea também expressar regularmente os tipos 5, 10, 13, 14, 16 e 19 de queratina, os quais também são encontrados em queratinócitos epidermais (MERJAVA et al., 2011). Resultado semelhante foi publicado por Ryder e Weinbert (1990), os quais demonstraram por meio da técnica de imunohistoquímica a expressão de vários tipos de citoqueratina no epitélio da córnea humana.

Além da citoqueratina, a imunolocalização do marcador CD44 foi também avaliada e comparada ao observado na córnea humana. O CD44 é uma proteína transmembrana multifuncional, regularmente expressa na membrana plasmática de vários tipos celulares, tendo como principal função a adesão às células adjacentes, bem como a alguns elementos da matriz extracelular (MORATH; HARTMANN; ORIAN-ROUSSEAU, 2016). Mediante avaliação dos modelos e da córnea humana por imunofluorescência, foi constatada a expressão dessa proteína em ambos os tecidos, sendo que na córnea humana a marcação foi mais evidente nas camadas basais do epitélio, enquanto o modelo 3D apresentou padrão semelhante, estendendo a expressão ainda às camadas mais superficiais.

A expressão de CD44 no epitélio da córnea humana foi primeiramente descrita em um trabalho conduzido por Zhu e colaboradores (1997), no qual os autores verificaram a

localização desse biomarcador nas camadas mais basais da região central do tecido, enquanto a região do limbo apresentou expressão em todas as camadas de células epiteliais (ZHU; NOLLE; DUNCKER, 1997). Essa proteína está intimamente relacionada ao processo de reparo de lesões epiteliais, à resposta inflamatória e à manutenção da função de barreira do epitélio ocular, funções essenciais para a preservação da integridade do sistema óptico mediante exposição a micro-organismos patogênicos, traumas mecânicos e toxinas ambientais (KURPAKUS-WHEATER; KERNACKI; HAZLETT, 2001; LIU; KAO, 2015).

Considerando-se o modelo biomimético reconstruído, a expressão de CD44 associada ao monitoramento da Resistência Transepitelial (TEER) indicam características de coesão intercelular, bem como da função de barreira epitelial, atribuindo ao epitélio a funcionalidade do tecido primário. Resultado semelhante foi encontrado em um trabalho executado por Jung e colaboradores (2011), no qual um modelo epitelial de córnea foi reconstruído com células primárias do limbo ocular. Nesse estudo, foi verificada a expressão de CD44 na membrana plasmática dos corneócitos, reiterando a ocorrência de interações coesas entre as células epiteliais, o que em conjunto com o TEER denota a função de barreira epitelial (JUNG et al., 2011).

Por fim, a atividade proliferativa das células epiteliais foi avaliada por meio da marcação nuclear da proteína Ki-67. O Ki-67 é uma proteína que se distribui no córtex nucleolar e mostra-se detectável no núcleo de células mitoticamente ativas, sendo um excelente biomarcador de proliferação celular tanto em condições fisiológicas quanto em alterações celulares de caráter neoplásico (BOOTH; EARNSHAW, 2017). A análise comparativa da expressão dessa proteína no modelo 3D e na córnea humana evidenciou diferenças nos padrões observados nos dois tecidos. Apesar da imunolocalização da proteína no núcleo das células ter sido comparável, o epitélio da córnea apresenta uma baixa expressão desse biomarcador, a qual limita-se às camadas mais basais desse estrato. O modelo 3D, por sua vez, apresentou marcação nuclear positiva em todas as camadas epiteliais, demonstrando a atividade proliferativa dos queratinócitos HaCat.

Em relação à córnea humana, Joyce e colaboradores realizaram um estudo no qual vários marcadores de proliferação celular, incluindo o Ki-67 foram analisados em tal tecido. Neste trabalho, foi verificado um perfil de expressão semelhante ao apresentado no presente estudo para o estrato epitelial, no qual poucas células das camadas basal e supra-basal demonstraram marcação positiva para tal proteína (JOYCE et al., 1995).

As diferenças no padrão de expressão do Ki-67, contudo, não afetaram a performance do modelo frente aos testes realizados com as substâncias irritantes, bem como à morfologia e aos demais marcadores avaliados. Provavelmente, alterações na composição do meio podem restringir a proliferação celular nas camadas mais superficiais, de modo a mimetizar de maneira mais representativa o tecido original (BOELSMA et al., 1999).

Considerando o desempenho do modelo epitelial reconstruído na identificação de substâncias irritantes oculares, constatou-se que o mesmo, mediante avaliação da viabilidade tecidual, possibilitou a distinção entre tais agentes. Conforme exposto na seção anterior, esse parâmetro permitiu a discriminação de substâncias pertencentes às categorias 1, 2A e 2B em relação às não categorizadas, demonstrando aplicabilidade na identificação de irritantes e não irritantes.

O modelo proposto foi baseado no EpiOcular™, produzido e comercializado pela empresa americana de biotecnologia MatTek, o qual também se baseia no cultivo de queratinócitos humanos em interface ar-líquido, resultando em um epitélio estratificado. Esse modelo foi submetido a uma validação interlaboratorial sob coordenação do Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos (ECVAM), sendo financiada pela Associação Europeia de Cosméticos (COLIPA), na qual a capacidade preditiva do método foi verificada através do teste de 94 substâncias químicas oriundas das diferentes categorias do UN GHS. Nesse estudo, foi verificada a capacidade do método em distinguir substâncias irritantes de não irritantes com base na viabilidade tecidual, o que forneceu subsídio para a inserção do mesmo no Guia de Teste n. 492 da OECD, atribuindo aceitação regulatória às avaliações do potencial de toxicidade ocular conduzidas com modelos epiteliais reconstruídos (KALUZHNY et al., 2011; OECD, 2017d).

Outro modelo que também integra o Guia n. 492 da OECD é o HCE (*Human Corneal Epithelium*), produzido pela empresa francesa SkinEthic™, o qual é construído com corneócitos humanos imortalizados e possui um domínio de aplicabilidade comparável ao do EpiOcular™. Tal modelo também foi submetido ao processo de validação interlaboratorial em 2013, no qual 30 substâncias foram avaliadas conforme a viabilidade tecidual do mesmo. Nesse estudo, verificou-se que o potencial de toxicidade mostrou-se inversamente proporcional à viabilidade epitelial após a exposição, assim como se estabeleceu a reprodutibilidade interlaboratorial do método, subsidiando a

posterior entrada do modelo nos protocolos de validação do ECVAM e a aceitação deste pela OECD (ALÉPEÉ et al., 2013; OECD, 2017).

Apesar do Guia de Teste n. 492 da OECD estabelecer que os modelos biomiméticos de córnea sejam aplicáveis à distinção apenas entre substâncias que induzem dano ocular grave (Cat. 1) daquelas que não requerem classificação (não irritantes), os estudos de validação previamente conduzidos mostram um perfil de categorização semelhante ao encontrado no presente trabalho, o qual consiste na discriminação entre substâncias irritantes (Cat. 1/2) e não irritantes (Não categorizadas). Tal fato pode ser atribuído provavelmente à capacidade de tais métodos permitirem também a detecção de irritantes leves (Cat. 2B), que apesar de não serem diferenciados dos irritantes moderados (Cat. 2A), apresentam um perfil de resposta distinto das substâncias não irritantes (ESKES et. al, 2005; KALUZHNY et al., 2011; ALÉPEÉ et al., 2013). Essa constatação pode ser vista como uma potencial vantagem em relação aos demais métodos alternativos, cujo domínio de aplicabilidade também se limita à detecção de substâncias que promovem dano ocular grave e de substâncias não irritantes.

Conforme mencionado anteriormente, apesar dos modelos supracitados serem mundialmente utilizados para avaliação da toxicidade ocular, os mesmos não são passíveis de utilização no território nacional, uma vez que questões burocráticas limitam a aquisição, bem como a chegada destes no Brasil em condições aceitáveis para a realização de testes. Dessa forma, a proposta do presente estudo foi viabilizar o domínio da tecnologia de obtenção dos modelos biomiméticos de córnea para utilização local, de forma a ampliar o arsenal de métodos alternativos disponíveis para avaliação do potencial de irritação/corrosão ocular de substâncias isoladas e misturas.

Além disso, diferentemente dos modelos comercializados que utilizam células primárias ou que requerem processos de manipulação genética para garantir condições ideais de cultivo, o modelo proposto foi construído com uma linhagem celular estabelecida. Tal fato mostra-se como uma potencial vantagem em relação aos demais métodos, pois a utilização de linhagens estabelecidas garantem uma maior reprodutibilidade interlaboratorial, visto que são desprovidas de variações relacionadas às particularidades de cada doador, bem como apresentam um menor custo e uma maior possibilidade de transferência tecnológica interlaboratorial (BOELSMA et al., 1999).

No contexto da utilização de modelos epiteliais reconstituídos para avaliação de toxicidade ocular, vários outros modelos foram propostos e, apesar de não serem

formalmente validados e regulatoriamente aceitos, podem ser considerados ferramentas valiosas para a investigação farmacológica e toxicológica. Um estudo publicado por Jung e colaboradores (2011) propôs um modelo epitelial construído com células do limbo ocular, o qual apresentou um padrão de expressão dos marcadores CK-3/12, CD44, p63, MUC1 e MUC5AC semelhante ao encontrado no tecido original. Além disso, conforme observado no presente estudo, o modelo apresentou baixa variabilidade na absorbância proveniente da análise de diferentes lotes e, mediante avaliação de 25 substâncias químicas de diferentes classificações, o mesmo permitiu eficientemente a distinção de substâncias irritantes e não irritantes (JUNG et al., 2011). A adequação metodológica para o teste de substâncias sólidas desse mesmo modelo também foi posteriormente proposta, demonstrando aplicabilidade deste na avaliação de amostras em diferentes formas físicas (JANG et al., 2015).

Na tentativa de refinar os resultados fornecidos pelos modelos epiteliais, tecidos reconstruídos mais complexos foram sugeridos de modo a contemplar alterações a nível epitelial e estromal. Os chamados modelos hemi-córnea integram, além das células epiteliais, uma matriz subjacente contendo fibroblastos que permitem a análise nos diferentes estratos do tecido. Nesse contexto, podem ser avaliados dois *endpoints* distintos, sendo um a viabilidade tecidual das diferentes camadas (epitélio e estroma) separadamente e o outro consiste na profundidade de dano induzido pela amostra, avaliada mediante mensuração da viabilidade em função da espessura total do tecido (ENGELKE et al., 2013; ZORN-KRUPPA et al., 2014; BARTOK et al., 2015).

Em comparação aos modelos epiteliais, os modelos hemi-córnea possibilitam uma maior resolução quando se considera a classificação de substâncias em relação ao sistema UN GHS, permitindo em alguns casos, a distinção entre as três categorias deste empregando-se esse único modelo experimental (ZORN-KRUPPA et al., 2014; BARTOK et al., 2015). Dessa forma, a construção de modelos com maior grau de complexidade estrutural pode estar relacionada à superação das limitações preditivas encontradas em tais plataformas de avaliação.

Conforme verificado nos testes em monocamada, a produção de IL-1 β também foi avaliada no modelo 3D após exposição às substâncias-teste. Nesse caso, verificou-se que, excluindo-se as substâncias que ocasionam completa perda de viabilidade tecidual, todas as demais induziram aumento na produção do biomarcador inflamatório. Apesar do resultado fornecido com tal avaliação não permitir uma extrapolação de correlação entre o

potencial irritante e a produção dessa interleucina, o mesmo demonstra a possibilidade de utilização do modelo em estudos que necessitem da investigação de parâmetros inflamatórios.

Apesar de não terem sido encontrados outros trabalhos que associem *endpoints* de inflamação à viabilidade tecidual dos modelos biomiméticos de córnea mediante exposição a irritantes oculares, tais sistemas já foram utilizados em estudos aplicados à imunologia de patógenos que possam acometer a superfície ocular. Thakur e colaboradores (1997) avaliaram o perfil inflamatório do modelo EpiOcular™ mediante exposição a um superantígeno oriundo do micro-organismo *Staphylococcus aureus*, comumente encontrado em infecções oculares advindas do uso inadequado de lentes de contato. Nesse estudo, constatou-se que a exposição ao antígeno induziu um aumento significativo na produção de IL-1 β , IL-6 e IL-8, sugerindo a participação das células epiteliais na fisiopatologia da ulceração periférica da córnea (THAKUR et al., 1997).

Por outro lado, Cao e colaboradores (2015) empregaram o modelo HCE produzido pela empresa SkinEthic™ para a investigação de alterações inflamatórias nos corneócitos humanos induzidas pela exposição ao Lipopolissacarídeo (LPS), o qual consiste em um antígeno presente na parede celular de bactérias Gram-negativas, bem como a partículas de poeira. Os resultados mostraram que, em resposta a tais agentes, o epitélio teve a produção de IL-1 β e IL-8 aumentada, reiterando o envolvimento desses biomarcadores no processo de irritação ocular induzida por agentes físicos e microbiológicos (CAO; BINDSLEV; KJAERGAARD, 2015).

Tais resultados comparados aos obtidos no presente estudo sugerem que o modelo epitelial proposto, além de possibilitar a investigação do potencial de irritação ocular por meio da viabilidade tecidual, permite a obtenção de dados relacionados à inflamação, podendo ser empregado também em estudos que necessitem a compreensão de mecanismos imunológicos de resposta a agentes externos.

Por fim, além de toda a caracterização e avaliação da capacidade preditiva, a possibilidade de aplicação do modelo para testes com misturas e produtos acabados foi avaliada mediante investigação das amostras de Hena de sobrancelha, na qual verificou-se que, apesar de não estarem adequadamente rotuladas, três amostras poderiam ser classificadas como irritantes moderadas ou leves utilizando tal metodologia.

Nesse contexto, os modelos epiteliais já têm sido empregados em tais avaliações, sendo aplicáveis à avaliação de insumos e produtos acabados. Doucet e colaboradores

(2006), propuseram a utilização do modelo HCE da empresa SkinEthic™ para a avaliação do potencial de irritação de diversos produtos cosméticos, os quais incluíram cremes, loções, géis e demaquilantes faciais. Nesse estudo, os resultados obtidos confirmaram a aplicabilidade do sistema para a avaliação das chamadas “*real life mixtures*”, de modo que o mesmo permitiu a classificação dos produtos de maneira satisfatória (DOUCET et al., 2006).

Adicionalmente, Vavilikolanu e colaboradores (2008) realizaram a avaliação do potencial de irritação de tensoativos comumente empregados em shampoos e produtos de limpeza facial, mediante utilização do modelo EpiOcular™. Os resultados obtidos pelo grupo demonstraram a utilidade do mesmo na detecção de substâncias com perfil de irritação ocular leve, sugerindo a potencial aplicabilidade na investigação da segurança toxicológica de insumos farmacêuticos (VAVILIKOLANU et al., 2008).

Na área ocupacional, tais modelos foram empregados por Seaman e colaboradores (2010) para avaliação da toxicidade ocular de insumos e produtos intermediários da indústria farmoquímica. Neste estudo, foram associados *endpoints* de viabilidade tecidual, produção de citocinas e análise histopatológica para predizer a ação nociva de tais substâncias, presente no ambiente ocupacional, sobre o sistema ocular de trabalhadores expostos (SEAMAN, et al., 2010).

Dada a obtenção, caracterização e aplicabilidade dos modelos epiteliais reconstruídos por meio de estratégias de engenharia tecidual, nota-se que os mesmos são sistemas promissores a serem integrados em plataformas multiparamétricas de avaliação do potencial de toxicidade ocular de substâncias isoladas e misturas. Um desafio a ser transposto no desenvolvimento e aplicação destes, e de qualquer outra metodologia alternativa proposta para irritação/corrosão ocular, consiste na escolha correta das substâncias teste de acordo com as diferentes categorias do UN GHS. Tal dificuldade reside no fato de que o método *in vivo* que é adotado como padrão para a classificação é extremamente variável e não fornece resultados precisos em relação à correta classificação de substâncias (BARROSO et al., 2017).

Dessa forma, além de serem comparados com os dados oriundos do Teste de Draize, os resultados provenientes da aplicação de métodos *in vitro* e *ex vivo* devem basear-se ainda em outras informações, como características físico-químicas, relatos de exposição humana e outras evidências que complementem as informações oriundas dos testes (BARROSO et al., 2017).

O presente trabalho possibilitou a obtenção, caracterização e avaliação da aplicabilidade de um modelo biomimético de córnea para investigação da toxicidade ocular, utilizando-se uma linhagem celular contínua de queratinócitos humanos. Além disso, parâmetros relacionados à inflamação foram também avaliados e correlacionados com o potencial irritante de substâncias químicas e misturas. Diante do exposto, o estudo permitiu a obtenção das seguintes conclusões:

- Mediante avaliação do perfil de citocinas produzido pelos queratinócitos HaCat após exposição às substâncias teste, verificou-se que a produção de IL-1 β se correlacionou qualitativamente e quantitativamente ao potencial de irritação ocular das mesmas, sendo eleita como biomarcador de exposição *in vitro* a agentes irritantes;
- O modelo epitelial obtido assemelha-se à córnea humana tanto em relação aos aspectos morfológicos quanto considerando o padrão de expressão de biomarcadores encontrado no tecido original;
- A viabilidade tecidual do modelo avaliada frente à exposição às substâncias teste permitiu a distinção entre substâncias irritantes e não irritantes;
- O perfil inflamatório do modelo epitelial foi alterado mediante a exposição às substâncias irritantes;
- O modelo mostrou-se ainda aplicável para a investigação do potencial de toxicidade ocular de misturas, uma vez que permitiu a identificação de irritantes dentre as amostras de Hena de sobrancelha avaliadas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIAENS, E. et al. Retrospective analysis of the Draize test for serious eye damage/eye irritation: importance of understanding the in vivo endpoints under UN GHS/EU CLP for the development and evaluation of in vitro test methods. **Archives of Toxicology**, Bellem, v. 88, n. 1, p. 701-723, 2014.

ADRIAENS, E. et al. CON4EI: Short Time Exposure (STE) test method for hazard identification and labelling of eye irritating chemicals. **Toxicology In Vitro**, Aalter, v. 44, n. 1, 2017.

ADKIS, M. et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor b, and TNF-a: Receptors, functions, and roles in diseases. **Fundamentals of allergy and immunology**, v. 138, n. 4, p. 984-1010, out. 2016.

ALÈPPE, N. et al. Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the SkinEthic™ reconstituted human corneal epithelium test method for the prediction of eye irritation. **Toxicology In Vitro**, v. 27, n. 5, p. 1467-1488, 2013.

ALFORD, P. W. et al. Biohybrid thin films for measuring contractility in engineered cardiovascular muscle. **Biomaterials**, v. 31, n. 1, p. 3613-3621, 2010.

ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. Cultivo celular. In: MOLINARO, E. M. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 1**. Rio de Janeiro: EPSJV, IOC, 2009, cap. 5, 215-252.

AMELIAN, A. et al. Application of standard cell cultures and 3D in vitro tissue models as an effective tool in drug design and development. **Pharmacology Reports**, Białystok, v. 69, n. 5, p. 861-870, mar. 2017.

BARROSO, J. et al. Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation in vivo data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 1, p. 521-547, 2017.

BARTOK, M. et al. Development of an in vitro ocular test system for the prediction of all three GHS categories. **Toxicology In Vitro**, Bremen, v. 29, n. 1, p. 72-80, 2015.

BOELSMA, E. et al. Reconstruction of a Human Skin Equivalent Using a Spontaneously Transformed Keratinocyte Cell Line (HaCaT). **The journal of investigative dermatology**, v. 112, n. 4, p. 489-498, abr. 1999.

BOOTH, D. G.; EARNSHAW, W. C. Ki-67 and the Chromosome Periphery Compartment in Mitosis. **Trends in Cell Biology**, v. 27, n. 12, p. 906-916, ago. 2017.

BOUCAMP, P. et al. Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell Line. **The Journal of Cell Biology**, v. 106, n. 1, p. 761-771, mar. 1988.

BURTON, A. B. G.; YORK, M.; LAWRENCE, R. S. The in vitro assessment of severe eye irritants. **Food and Cosmetics Toxicology**, Sharnbrook, v. 19, n. 1, p. 471-481, 1981.

CAO, Y; BINDSLEV, D. A.; KJAERGAARD, S. K. Estimation of the in vitro eye irritating and inflammatory potential of lipopolysaccharide (LPS) and dust by using reconstituted human corneal epithelium tissue cultures. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 25, n. 5, p. 402-409, set. 2015.

CASTRO, E. G. **Efeito da deleção genética do receptor da angiotensina - 1-7, mas, na morfologia e expressão de proteínas da matriz extracelular em corações de camundongos adultos e neonatais.** 2006. 73 F. Tese (Doutorado em Biologia Celular) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2006.

CASPI, R. In This Issue: Immunology of the Eye—Inside and Out. **International Reviews in Immunology**, Bethesda, v. 32, n. 1, p. 1-3, fev. 2013.

CAZELLE, E. et al. Suitability of histopathology as an additional endpoint to the Isolated Chicken Eye Test for classification of non-extreme pH detergent and cleaning products. **Toxicology In Vitro**, Brussels, v. 28, n. 1, p. 657-666, fev. 2014.

CHIBA, K. et al. Interlaboratory Validation of the In Vitro Eye Irritation Tests for Cosmetic Ingredients. Evaluation of Cytotoxicity Test on HeLa Cells. **Toxicology In Vitro**, v. 13, n. 1, p. 189-198, 1999.

CORSINI, E. et al. Use of IL-18 production in a human keratinocyte cell line to discriminate contact sensitizers from irritants and low molecular weight respiratory allergens. **Toxicology In Vitro**, v. 23, n. 1, p. 789-796, 2009.

COSTIN, G. E. et al. Vaginal irritation models: the current status of available alternative and in vitro tests. **Alternative Laboratory Animals**, v. 39, n. 4, p. 317-337, 2011.

COTTIN, M.; ZANVIT A. Fluorescein Leakage Test: a Useful Tool in Ocular Safety Assessment. **Toxicology In Vitro**, Aulnay-sous-bois, v. 11, n. 1, p. 399-405, jan. 1997.

CROUCH, R.; LING, Z; HAYDEN, B. J. Corneal oxygen scavenging systems: lysis of corneal epithelial cells by superoxide anions. **Basic Life Science**, v. 49, n. 1, p. 1043-1046, 1988.

CURREN, R. D.; HARBELL, J. W. Ocular safety: a silent (in vitro) success story. **Alternative Laboratory Animals**, v. 30, n. 1, p. 69-74, 2002.

CZAJKOWSKA-KOS´NIK, A. et al. Comparison of cytotoxicity in vitro and irritation in vivo for aqueous and oily solutions of surfactants. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, Bialystok, v. 1, n. 5, p. 1-5, jul. 2014.

DAVILA, J. C. et al. Predictive value of in vitro model systems in toxicology. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 38, n. 1, p. 63-96, 1998.

DIEZ, D.; MIRANDA-SAAVEDRA, D. The IL-10 / STAT3-mediated anti-inflammatory response: recent developments and future challenges. **Briefings in Functional Genomics**, v. 12, p. 489-498, 2018.

- DOUCET, O. et al. Reconstituted human corneal epithelium: A new alternative to the Draize eye test for the assessment of the eye irritation potential of chemicals and cosmetic products. **Toxicology In Vitro**, v. 20, n. 1, p. 499-512, 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. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Washington, v. 82, n. 3, p. 377-390, nov. 1944.
- ENGELKE, M. et al. A human hemi-cornea model for eye irritation testing: Quality control of production, reliability and predictive capacity. **Toxicology In Vitro**, v. 27, n. 1, p. 458-468, ago. 2013.
- EMERMAN, J. T.; PITELKA, D. R. Maintenance and induction of morphological differentiation in dissociated mammary epithelium on floating collagen membranes. **In Vitro**, Berkeley, v. 13, n. 5, p. 316 – 327, 1977.
- ESKES, C. et al. Eye irritation. **Alternative Laboratory Animals**, v. 33, n. 1, p. 47-81, 2005.
- ESKES, C. et al. Validation study on the Ocular Irritation assay for eye irritation testing. **Toxicology In Vitro**, Agno, v. 28, n. 1, p. 1046-1065, mar. 2014.
- ESKES, C. et al. Ocular toxicity. In: BAL-PRICE, A.; JENNINGS, P. *In Vitro toxicology systems*. Humana Press; 2014, cap. 21, p. 583.
- ESKES, C. et al. Good cell culture practices & in vitro toxicology. **Toxicology In Vitro**, v. 25, n. 1, abr. 2016.
- FINI, M. E. Keratocyte and Fibroblast Phenotypes in the Repairing Cornea. **Progress in Retinal and Eye Research**, Boston, v. 18, n. 6, p. 529-551, 1999.
- FITZGERALD, K. A. et al. Life in 3D is never flat: 3D models to optimise drug delivery. **Journal of Controlled Release**, Cork, v. 10, n. 215, p. 39-54, jul. 2015.
- FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, London, v. 160, p. 171 – 177, 2006.
- FUKUDA, T. N. K.; FUKUSHIMA, A. Ocular Surface: Inflammation of the Conjunctiva. In: STAIN, J. **Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology**. Oxford: Elsevier, 2017.
- GERMAIN, L. et al. Reconstructed human cornea produced in vitro by tissue engineering. **Pathobiology**, v. 67, n. 1, p. 140-147, 1999.
- GRANT, W. M. Survey of types of toxic effects involving the eyes or vision. In: THOMAS, C. C. **Toxicology of the Eye**. Illinois: Springer, 1974, cap. 1, p. 5-71.
- GRIFFITH, J. F. et al. Dose-response studies with chemical irritants in the albino rabbit eye as a basis for selecting optimum testing conditions for predicting hazard to the human eye. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 55, n. 1, p. 501-513, 1980.

GRIFFITH, M. et al. Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. **Science**, v. 286, n. 1, p. 2169-2172, 1999.

HAYDEN, B. J. et al. Cytolysis of Cornea1 Epithelial Cells by Hydrogen Peroxide. **Experimental Eye Research**, Charleston, v. 50, n. 1, p. 11-16, 1990.

HARTUNG, T. Toxicology for the twenty-first century. **Nature**, v. 460, n. 1, p. 208-212, 2009.

HARTUNG, T. et al. First Alternative Method Validated by a Retrospective Weight-of-Evidence Approach to Replace the Draize Eye Test for the Identification of Non-Irritant Substances for a Defined Applicability Domain. **ALTEX**, Baltimore, v. 27, n. 1, p. 43-51, fev. 2010.

HERTSENBERG, A. J.; FUNDERBURGH, J. L. Stem Cells in Cornea. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, Pittsburgh, n. 1, v. 134, p. 25-41, fev. 2015.

HUH, D.; HAMILTON, G. A.; INGBER, D. E. From 3D cell culture to organs-on-chips. **Cell Press**, Boston, v. 21, n. 12, p. 745-754, dez. 2011.

HUHTALA, A. et al. Corneal Models for the Toxicity Testing of Drugs and Drug Releasing Materials. In: **Topics in Multifunctional Biomaterials and Devices**. Tampere: N Ashammakhi, 2008, cap. 2, p. 1-24.

ICCVAM, Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. Recommendation to Discontinue Use of the Low Volume Eye Test for Ocular Safety Testing. National Institute of Environmental Health Sciences, Triangle Park, NC NIH Publication, 2010a.

ICCVAM, Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. ICCVAM-Recommended Test Method Protocol: Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method National Institute of Environmental Health Sciences, Triangle Park, NC NIH Publication, 2010b.

IYER, S. S.; CHENG, G. Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. **Critical Reviews in Immunology**, v. 32, p. 23-63, 2012.

JANG, W. et al. Evaluation of Eye Irritation Potential of Solid Substance with New 3D Reconstructed Human Cornea Model, MCTT HCE. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 23, n. 4, p. 379-385, 2015.

JAROCH, K; JAROCH, A.; BOJKO, B. Cell cultures in drug discovery and development: The need of reliable in vitro - in vivo extrapolation for pharmacodynamics and pharmacokinetics assessment. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Bydgoszcz, v. 147, n. 1, 2018.

JESTER, J. V. et al., The cellular basis of corneal transparency: evidence for 'corneal crystallins'. **Journal of Cell Science**, Dallas, v. 1, n. 112, p. 613 – 622, fev. 1999.

JIROVA, D. et al. Safety evaluation of nanosilver using reconstructed human GIT tissues. **World Congress and Expo on Nanotechnology and Materials Science**, 2015.

JOYCE, N. C. et al. Cell Cycle Protein Expression and Proliferative Status in Human Corneal Cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 37, n. 4, p. 645-655, mar. 1995.

JUNG, K. et al. A new 3D reconstituted human corneal epithelium model as an alternative method for the eye irritation test. **Toxicology In Vitro**, Yonjin, v. 25, n. 1, p. 403-410, 2011.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, cap. 23, p. 452-470.

KALUZHNY, Y. et al. Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. **ATLA**, v. 39, n. 1, p. 339-364, 2011.

KANDAROVA, H. et al. CON4EI: EpiOcular™ Eye Irritation Test (EpiOcular™ EIT) for hazard identification and labelling of eye irritating chemicals. **Toxicology In Vitro**, v. 44, n. 1, 2017.

KATOH, M. et al. A new 3D reconstituted human corneal epithelium model as an alternative method for the eye irritation test. **AATEX**, v. 17, n. 1, p. 2-8, 2012.

KIM, C. et al. Application of SV40 T-transformed human corneal epithelial cells to evaluate potential irritant chemicals for in vitro alternative eye toxicity. **Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 80, n. 1, p. 82-89, jul. 2016.

KINOSHITA, S. et al. Characteristics of the Human Ocular Surface Epithelium. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 20, n. 5, p. 639-673, 2001.

KLAUSNER, M. et al. Organotypic human oral tissue model for toxicological studies. **Toxicology In Vitro**, v. 21, n. 5, p. 938-949, 2007.

KREWSKI, D. et al. Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 13, n. 1, p. 51-138, fev. 2010.

KUNZ-SCHUGHART, L. A. et al. The use of 3-D cultures for high-throughput screening: The multicellular spheroid model. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 9, n. 1, p. 273-285, 2004.

KURPAKUS-WHEATER, M.; KERNACKI, K. A.; HAZLETT, L. D. Maintaining Corneal Integrity How the "Window" Stays Clear. **Progresses in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 36, n. 3, p. 179-259, 2001.

LEE, V. et al. Design and Fabrication of Human Skin by Three-Dimensional Bioprinting. **Tissue Engineering**, v. 20, n. 6, p. 473-484, 2014.

LELIÈVRE, S. A.; KWOK, T.; CHITTIBOYINA, S. Architecture in 3D cell culture: An essential feature for in vitro toxicology. **Toxicology In Vitro**, West Lafayette, 2017.

LI, L. et al. Functional imaging of interleukin 1 beta expression in inflammatory process using bioluminescence imaging in transgenic mice. **BMC Immunology**, v. 9, n. 49, p. 1-9, ago. 2008.

- LIU, C. Y. et al. Cornea-specific expression of K12 keratin during mouse development. **Current Eye Research**, v. 12, n. 1, p. 963-974, 1993.
- LIU, C. Y. et al. Characterization and chromosomal localization of the cornea-specific murine keratin gene Krt1.12. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 1, p. 24627-24636, 1994.
- LIU, C. Y. et al. Corneal epithelial wound healing. **Experimental Biology and Medicine**, v. 226, n. 7, p. 653-664, 2015.
- LOPEZ-CASTEJON, G.; BROUGH, D. Understanding the mechanism of IL-1b secretion. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 22, n. 1, p. 189-195, out. 2011.
- LOTZ, C. et al. Alternative Methods for the Replacement of Eye Irritation Testing. **ALTEX**, Würzburg, v. 33, n. 1, p. 55-67, 2016.
- MARCEAU, N.; LORANGER, AN. Cytokeratin expression, fibrillary organization, and subtle function in liver cells. **Biochemical Cell Biology**, v. 73, n. 1, p. 619-625, 1995.
- MAURER, J. K. et al. Pathology of Ocular Irritation with Acetone, Cyclohexanol, Para-uoroaniline, and Formaldehyde in the Rabbit Low-Volume Eye Test. **Toxicologic Pathology**, Ohio, v. 29, n. 2, p. 187-199, 2001.
- MAURER, J. K.; PARKER, R. D.; JESTER, J. 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**, Ohio, v. 36, n. 1, p. 106-117, 2002.
- MCNAMEE P. 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**, Egham, v. 1, n. 54, p. 197-209, abr. 2009.
- MERJAVA, S. et al. The spectrum of cytokeratins expressed in the adult human cornea, limbus, and perilimbal conjunctiva. **Histology and Histopathology**, v. 26, n. 1, p. 323-331, 2011.
- MEWES, K. R. et al. In vitro eye irritation testing using the open source reconstructed hemicornea – a ring trial. **ALTEX**, Bremen, v. 14, n. 1, jan. 2017.
- MINAMI, Y. et al. Reconstruction of cornea in three-dimensional collagen gel matrix culture. **Investigational Ophthalmology and Vision Science**, v. 34, n. 1, p. 2316-2324, 1993.
- MORATH, I; HARTMANN, T. N.; ORIAN-ROUSSEAU. CD44: More than a mere stem cell marker. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 81, n. 1, p. 166-171, dez. 2016.
- MORGAN, E. et al. Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. **Clinical Immunology**, v. 110, n. 3, p. 252-266, 2004.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Methods**, v. 16, n. 65, p. 55-63, 1983.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals, Draft. The Cytosensor Microphysiometer Test Method: An in vitro Method for Identifying Ocular Corrosive and Severe Irritant Chemicals as well as Chemicals not Classified as Ocular Irritants, Paris, 2012a.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 460. Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants, Paris, 2012b.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 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, Paris, 2013a.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 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 Paris, 2013b.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 405. Acute Eye Irritation/Corrosion, Paris, 2017a.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 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, Paris, 2017b.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals. Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for Serious Eye Damage and Eye Irritation Series on Testing & Assessment No. 263, Paris, 2017c.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 492, Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage, Paris, 2017d.

OUYANG, W. et al. Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. **Annual Reviews in Immunology**, v. 29, n. 1, p. 71-109, 2011.

PAPE, W. J. W. et al. Validation of the red blood cell test system as in vitro assay for the rapid screening of irritation potential of surfactants. **Molecular toxicology**, v. 1, n. 4, p. 525-536, 1987.

PAPE, W. J. W. et al. COLIPA validation project on in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients and finished products (phase I): the red blood cell test for the estimation of acute eye irritation potentials: Present status. **Toxicology In Vitro**, v. 13, n. 2, p. 343-354, 1999.

PARNIGOTTO, P. P. et al. . Bovine corneal stroma and epithelium reconstructed in vitro: characterisation and response to surfactants. **Eye**, v. 12, n. 2, p. 304-310, 1998.

PRINSEN, M. K.; KOETER, H. B. Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. **Food and Chemical Toxicology**, v. 31, n. 1, p. 69-76, 1993.

PRINSEN, M. K. et al. The Isolated Chicken Eye test to replace the Draize test in rabbits. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Zeist, v. 85, n. 1, p. 132-149, fev. 2017.

REICHL, S.; MULLER-GOYMANN, C. C. Development of an organotypical cornea construct as an in vitro model for permeation studies. **Ophthalmology**, v. 98, n. 1, p. 853-858, 2001.

REN, D.; DAINES, D. A. Use of EpiAirway model for characterizing long-term host pathogen interactions. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2, n. 55, p. 3261, 2011.

RYDER, M. R.; WEIBERT, R. N. Cytokeratin Patterns in Corneal, Limbal, and Conjunctival Epithelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 31, n. 11, p. 2230-2234, nov. 1990.

SCHNEIDER, A. L. et al. The use of an in vitro cornea for predicting ocular toxicity. **In Vitro Toxicology**, v. 10, n. 1, p. 309-318, 1997.

SEAMAN, C. W. et al. An evaluation of a cultured human corneal epithelial tissue model for the determination of the ocular irritation potential of pharmaceutical process materials. **Toxicology In Vitro**, v. 24, n. 1, p. 1862-1870, mar. 2010.

SEWELL, F. et al. Steps towards the international regulatory acceptance of non-animal methodology in safety assessment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 89, n. 1, p. 50-56, jul. 2017.

SCHNEIDER, A. L.; MAIER-REIF, K. ;GRAEVE, T. Constructing an in vitro cornea from cultures of the three specific corneal cell types. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 35, n. 1, p. 515-526, 1999.

SCHOOP, V. M. et al. Epidermal Organization and Differentiation of HaCaT Keratinocytes in Organotypic Coculture with Human Dermal Fibroblasts. **The journal of investigative dermatology**, v. 112, n. 3, p. 343-353, mar. 1999.

SHULER, M. L. Organ-, body- and disease-on-a-chip systems. **Lab on a Chip**, v. 17, n. 1, p. 2345-2346, 2017.

SLADOWSKI, D. et al. Culture of the primary corneal epithelium as a potential component of test batteries for eye irritancy testing. **Toxicology In Vitro**, v. 19, n. 1, p. 875-878, ago. 2005.

SMERDON, D. Anatomy of the eye and orbit. **Current Anaesthesia & Critical Care**, Middlesbrough, TSI, n. 1, v. 11, p. 286-292, 2000.

SRINIVASAN, B. et al. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. **Journal of Laboratory Automation**, Florida, v. 20, n. 2, p. 107 – 126, abr. 2015.

STEILING, W. et al. The HET-CAM, a Useful In Vitro Assay for Assessing the Eye Irritation Properties of Cosmetic Formulations and Ingredients. **Toxicology In Vitro**, Dusseldorf, v. 13, n. 1, p. 375-384, 1999.

STERN, M. et al. Evaluation of the EpiOcular Tissue Model as an Alternative to the Draize Eye Irritation Test. **Toxicology In Vitro**, Ashland, v. 12, n. 1, p. 455-461, jan. 1998.

SUNG, J. H. et al. A microfluidic device for a pharmacokinetic–pharmacodynamic (PK–PD) model on a chip. **Lab on a Chip**, v. 10, n. 1, p. 446-455, 2010.

TACHON, P. et al. Assessment of surfactant cytotoxicity: comparison with the Draize eye test. **International Journal of Cosmetic Science**, Bois, v. 11, n. 1, p. 233-243, 1989.

TAKAHASHI, Y. et al. Development of the short time exposure (STE) test: An in vitro eye irritation test using SIRC cells. **Toxicology In Vitro**, Akabane, v. 22, n. 1, p. 760-770, jan. 2008.

TAKAHASHI, Y. 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**, Akabane, v. 25, n. 1, p. 1425-1434, abr. 2011.

TÁRNOK, A. et al. Cytometric bead array to measure six cytokines in twenty-five microliters of serum. **Clinical Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 1000-1002, 2003.

TEGTMEYER, S. et al. Reconstruction of an in vitro cornea and its use for drug permeation studies from different formulations containing pilocarpine hydrochloride. **European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals**, v. 51, n. 1, p. 119-125, 2001.

TEGTMEYER, S. et al. Cultivation and characterization of a bovine in vitro model of the cornea. **Pharmazie**, v. 59, n. 1, p. 462-471, 2004.

TERRASSO, A. P. et al. Novel scalable 3D cell based model for in vitro neurotoxicity testing: Combining human differentiated neurospheres with gene expression and functional endpoints. **Journal of Biotechnology**, Oetras, v. 205, n. 1, p. 82-92, jan. 2015.

THAKUR, A. et al. Modulation of cytokine production from an EpiOcular corneal cell culture model in response to Staphylococcus aureus superantigen. **Australian and New Zealand Journal of Ophthalmology**, v. 25, n. 1, p. 43-45, 1997.

TONG, W. H. et al. Constrained Spheroids for Prolonged Hepatocyte Culture. **Biomaterials**, v. 80, n. 1, p. 106-120, dez. 2015.

TOROPAINEN, E. et al. Culture Model of Human Corneal Epithelium for Prediction of Ocular Drug Absorption. **IOVS**, v. 42, n. 12, 2942-2948, nov. 2001.

VAVILIKOLANU, P. et al. The Utilization of the EpiOcular™ Human Tissue Model to Assess and Compare the Irritation Potential of Multiple Surfactant Systems Used in Shampoos and Facial Cleansers. In: 47th Annual Society of Toxicology Meeting, 2008, Seattle. **Anais**.

- VERSTRAELEN, S. et al. Improvement of the Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) assay as an in vitro alternative to the Draize rabbit eye irritation test. **Toxicology In Vitro**, Mol, v. 27, n. 1, p. 1298-1311, mar. 2013.
- VERSTRAELEN, S. et al. CON4EI: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) test for hazard identification and labelling of eye irritating chemicals. **Toxicology In Vitro**, Mol, v. 44, n. 1, p. 122-133, jun. 2017.
- VERSTRAELEN, S.; ROMPAY, A. R. V. CON4EI: Development of serious eye damage and eye irritation testing strategies with respect to the requirements of the UN GHS/EU CLP hazard categories. **Toxicology In Vitro**, Mol, v. 44, n. 1, jun. 2017.
- WAGONER, M. D. Chemical Injuries of the Eye: Current Concepts in Pathophysiology and Therapy. **Survey of Ophthalmology**, Riyadh, v. 41, n. 4, 275-313, jan./fev. 1997.
- WILHELMUS, K. R. The Draize Eye Test. **Survey of Ophthalmology**, Houston, v. 45, n. 6, p. 493-515, mai./jun. 2001.
- WILSON S. L.; AHEARNE, M.; HOPKINSON, A. An overview of current techniques for ocular toxicity testing. **Toxicology**, Nottingham, v. 357, n. 1, p. 32-46, nov. 2015.
- YANG, Y. et al. A Procedure for Application of Eye Irritation Alternative Methods on Cosmetic Ingredients. **ALTEX Proceedings**, v. 1, n. 12, p. 139-143, 2012.
- ZANONI, M. et al. 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. **Scientific Reports**, Meldola, v. 19103, n. 6, p. 1-11, jan. 2016.
- ZHANG, Z; MICHNIAK-KOHN, B. B. Tissue engineered human skin equivalents. **Pharmaceutics**, v. 4, n. 1, p. 26-41, 2012.
- ZHANG, B.; RADISIC, M. Organ-on-a-Chip devices advance to market. **Lab on a Chip**, v. 17, n. 14, p. 2395-2420,
- ZHU, S. et al. Expression of adhesion molecule CD44 on human corneas. **British Journal of Ophthalmology**, v. 81, n. 1, p. 80-84, 1997.
- ZIESKE, J. D. et al. Human corneal organotypic cultures. **Journal of Cutaneous and Ocular Toxicology**, v. 23, n. 1, p. 19-28, 2004.
- ZORN-KRUPPA, M. et al. A human corneal equivalent constructed from SV40-immortalised corneal cell lines. **Alternative Laboratory Animals**, v. 33, n. 1, p. 37-45, 2005.
- ZORN-KRUPPA, M. et al. Determining the Depth of Injury in Bioengineered Tissue Models of Cornea and Conjunctiva for the Prediction of All Three Ocular GHS Categories. **PLOS One**, Hamburg, v. 9, n. 12, p. 1-26, dez. 2014.