

Testes *in vitro* como alternativa aos testes *in vivo* de Draize

In vitro tests used as an alternative to Draize *in vivo* tests

RIALA6/967

Áurea Silveira CRUZ^{1*}, Maria Luisa BARBOSA, Terezinha de Jesus Andreoli PINTO²

* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz Av. Dr. Arnaldo, 355 CEP. 01246-902 – São Paulo -SP - Seção de Culturas Celulares – Virologia - 1- Instituto Adolfo Lutz - 2- Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - e-mail auracruz@ial.sp.gov.br

Recebido: 19/09/2003 – Aceito para publicação: 01/04/2004

RESUMO

Os procedimentos descritos por Draize deram origem aos testes de irritação ocular e cutânea adotados internacionalmente para avaliar produtos e substâncias. Entretanto, eles são criticados por motivos éticos, devido à crueldade com os animais, mesmo após diferentes modificações terem sido propostas nos protocolos originais. Metodologias alternativas têm sido estudadas para avaliar a toxicidade de produtos usados em seres humanos. Entre as mais citadas encontram-se as que utilizam organismos inferiores, células vivas de mamíferos, sistemas organotípicos e substratos inertes, além de bancos de dados informatizados e programas que avaliam a toxicidade pela determinação de relação estrutura-atividade. Os métodos utilizando células vivas têm sido muito utilizados para prever com segurança a irritação, contribuindo para a redução do número de animais utilizados nos testes *in vivo*. Até o momento, não existem métodos validados para substituir os ensaios de irritação ocular e cutânea, mas somente para avaliar substâncias corrosivas.

Palavras-Chave. teste de Draize, irritação ocular, irritação cutânea, citotoxicidade, testes *in vitro*

ABSTRACT

The procedures described by Draize have generated both eye and cutaneous irritation tests, which have been internationally adopted to evaluate products and substances. However, they have been criticized for ethical reasons, due to their cruelty towards animals, even after the proposal of different modifications in the original methods. Thus, alternative techniques have been studied to evaluate the toxicity of products used for human beings. Those, which utilize inferior organisms, mammal living cells, organotypic systems and inert substances, besides computerized databanks and programs that evaluate toxicity by determining the structure-activity relationship. Methods using living cells have been widely used to safety predict irritation, what contributes to the reduction of animals use for *in vivo* tests. So far, there are no validated methods to replace the ocular and cutaneous irritation assays, except for the evaluation of corrosive substances.

Key Words. Draize tests, ocular irritation, cutaneous irritation, cytotoxicity, *in vitro* tests.

INTRODUÇÃO

O potencial irritante de várias substâncias e produtos de uso humano vem sendo avaliado, desde a década de 40, em experimentos que utilizam animais de laboratório. Alguns dos ensaios adotados para tal finalidade, denominados testes de irritação ocular ou cutânea, ainda hoje adotados pelos órgãos oficiais, foram inicialmente descritos por Draize.

Procedimentos severos que afetam a segurança dos animais resultam em críticas e discussões por parte de entidades não governamentais. Métodos alternativos vêm sendo investigados para tentar minimizar este conflito.

TESTES *IN VIVO*

Desde a antiguidade, várias espécies animais foram utilizadas como modelos vivos, em estudos de situações de risco, principalmente do gás mostarda empregado durante a guerra, e no desenvolvimento da indústria farmacêutica no século XX. O efeito prejudicial para os olhos, ocasionado por algumas substâncias, resultou no desenvolvimento da toxicologia ocular que utilizava principalmente o coelho, como modelo de estudo, para as avaliações de irritação⁹⁹.

No início da década de 40, Jonas S. Friendenwald propôs a graduação de níveis de severidade, dos diferentes

componentes da irritação ocular, em escalas numéricas. Este método foi modificado e adotado para avaliar quantitativamente substâncias perigosas, bem como garantir a segurança dos produtos de aplicação tópica que eram aplicados sobre pele e mucosas ocular e peniana de coelhos albinos da raça Nova Zelândia. Os coelhos em relação aos outros animais possuem pele permeável, olhos grandes com anatomia e fisiologia bem descrita, são fáceis de manusear, apresentam vantagens no aspecto econômico, além de fácil aquisição^{35,99}.

O teste de irritação cutânea, seja do tipo primária ou cumulativa, estabelece graduações para reações como edema e eritema. O teste de irritação ocular estabelece graduações para as reações observadas na córnea, íris e conjuntiva. Os protocolos definem o volume, forma de administração, intervalos de observação e número de animais a serem utilizados. Estes ensaios, denominados testes de Draize, foram adotados por muitos laboratórios e tornaram-se a base para os métodos oficiais de avaliação de irritação dérmica e ocular. Aplicam-se a produtos químicos, de higiene, cosméticos, perfumes e correlatos, que podem ser, conforme resultados obtidos, classificados em irritantes e não irritantes^{2,35,70}.

Kay e Calandra⁵⁴ propuseram modificações quanto ao critério de avaliação, estabelecendo oito classificações para o potencial irritante, com graduações intermediárias entre não irritante e maximamente irritante, ao contrário de Draize que estabeleceu somente dois tipos de classificação, irritante e não irritante.

O conceito dos três Rs (3 Rs), *reduction, refinement e replacement*, para o uso de animais, em ensaios ou no desenvolvimento de pesquisas, foi definido após a publicação do livro "The Principle of Humane Experimental Technique" de Russel e Burch em 1959. Este conceito tem como objetivo a redução do número de animais, o refinamento dos métodos e a reposição ou troca destes métodos por ensaios substitutos ou alternativos *in vitro*. Com a publicação do livro de Singer em 1975, sobre a ética no tratamento dos animais, o teste ocular de Draize tornou-se alvo para as críticas das sociedades protetoras dos animais⁹⁹.

Diferentes modificações vêm sendo propostas por pesquisadores de todo mundo envolvendo desde o número de animais, quantidade do produto aplicado, tempo de irrigação após aplicação do produto, período de observação, graduação e interpretação dos resultados. As mais aceitas são as que não alteram a precisão dos resultados obtidos nos ensaios de irritação ocular e cutânea⁹⁹.

A modificação mais citada refere-se ao número de animais, originalmente nove e atualmente nos protocolos oficiais variando de três a seis coelhos, a exemplo dos protocolos da Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), da Food and Drug Administration (FDA) e do Ministério da Saúde do Japão^{70,99}.

Springer et al.⁸⁶ analisaram a redução do número de animais praticada no teste de irritação ocular, por diferentes entidades internacionais e sugeriram que o uso de seis animais

evita, na maioria dos casos, resultados falsos positivos ou negativos, além de muitas vezes eliminar a necessidade de uma segunda bateria de testes. Estas recomendações foram adotadas pelos órgãos americanos, enquanto que os europeus recomendam o emprego de até três animais, dependendo do tipo de produto a ser avaliado.

Diversos estudos sugerem diminuir a quantidade do produto a ser aplicado no olho do animal, passando de 0,1 mL como no método de Draize para 0,01 mL, sem alterar a sensibilidade do método. A redução do volume sugerida visa, ainda, tornar o ensaio mais próximo do emprego do produto, passando a refletir o modo de uso real em humanos^{43,45}.

Roggeband et al.⁷⁴, após avaliarem detergentes líquidos nas mesmas condições, em voluntários humanos e coelhos, confirmaram que o teste de irritação ocular com baixo volume em coelhos permite prever o perigo de irritação ocular no ser humano, pois a sensibilidade geralmente é maior que a observada no homem.

Das propostas sugeridas para diminuir o incômodo causado pelos produtos, nos animais experimentais, encontra-se ainda, a recomendação do uso de anestésicos, embora estes possam contribuir para alterar a permeabilidade da córnea^{42,44,82}.

O teste de irritação dérmica vem sendo modificado por diferentes agências reguladoras, porém sua essência continua sendo a aplicação do produto sob oclusão na pele dorsal do coelho, por período de 24 horas. Após, a retirada do produto, os animais são observados por intervalos de 24 e 72 horas. A modificação mais citada e adotada como oficial pela OECD, é o tempo de exposição da amostra que passou a ser de quatro horas, além do número reduzido de animais que passou de seis para pelo menos três coelhos. As diferentes variações no procedimento formam a base da classificação de corrosão ou irritação, dependendo da severidade da reação da pele, sua persistência e reversibilidade⁷³.

Mesmo com algumas modificações já estabelecidas, o teste de Draize continua sendo muito combatido por organizações não governamentais de proteção animal. Os cientistas não têm medido esforços para que haja uma harmonização dos ensaios e a implementação dos 3Rs, nas instituições de pesquisa e educacionais dos países da Europa⁹⁷.

A FDA já aceita sem a necessidade de correlação com teste *in vivo*, o teste *in vitro* Limulus amebócito lisado (LAL) para detecção de endotoxinas bacterianas nos produtos injetáveis de uso humano e animal, como substituto do teste de pirogênio em coelhos. Os testes de irritação ocular e cutânea de Draize, para a FDA, continuam sendo considerados os mais confiáveis para avaliar a segurança das substâncias introduzidas no olho ou aplicadas ao seu redor, assim como aquelas aplicadas na pele. Já a União Européia, em suas emendas diretas, estabelece prazos para o término do uso de animais nos ensaios de produtos acabados, ingredientes ou combinação de ingredientes. Entretanto, estes prazos poderão ser adiados se os métodos alternativos não forem validados pelo European Center for Validation of Alternatives Methods (ECVAM)³⁸.

TESTES *IN VITRO*

O questionamento quanto ao uso de animais de laboratório, na avaliação de risco dos produtos de uso humano, resultou em vários estudos a partir da década de 60, direcionados a metodologias que utilizam tecidos e células vivas de mamíferos, organismos inferiores e substratos inertes²³. Bancos de dados informatizados e programas que avaliam a toxicidade pela determinação de relação estrutura-atividade, também foram desenvolvidos, por exemplo o Quantitation Structure Activity Relationship (QSAR), cujo protocolo relaciona a estrutura físico-química de um componente com sua toxicidade^{5,7,11,31}. Estes estudos têm por finalidade principal obter metodologias rápidas, baratas, de fácil execução e reprodutibilidade que possam ser padronizadas e validadas, situação imprescindível para que os métodos *in vitro* alcancem a aceitação científica internacional.

As metodologias que utilizam tecidos e células vivas são as mais empregadas, pois a intrínseca complexidade celular é mantida. As células utilizadas podem ser de vários tecidos, tanto de origem humana quanto animal, sendo que a sobrevivência e/ou proliferação celular podem ser avaliadas por contagem do número de células ou pelo uso de corantes vitais. A incorporação de radioisótopos, formação de colônias, aderência celular, produtos de metabolismo entre outros são parâmetros que também podem ser utilizados^{33,37,50,57,64,69,71,80,81}.

A verificação da viabilidade celular pelo uso de corantes vitais é um dos parâmetros empregados e dentre os mais citados na literatura encontramos o brometo de 3 (4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 difeniltetrazólio (MTT) e o vermelho neutro (3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride). O MTT é um sal amarelo solúvel, metabolizado pela succinato desidrogenase presente na mitocôndria, transformando-se em um produto azul insolúvel. O vermelho neutro em pH fisiológico passa facilmente através da membrana plasmática e se concentra no interior dos lisossomos. A perda deste gradiente de pH por mortalidade/morbidade da célula ou a perda da permeabilidade da membrana inibe a incorporação destes corantes⁴⁸.

Uma das primeiras metodologias descritas para avaliação *in vitro* foi sugerida por Rosenbluth et al.⁷⁷, que propuseram o teste da biocompatibilidade para avaliar plásticos empregados em artigos médico-hospitalares. Neste ensaio os materiais eram colocados diretamente sobre uma monocamada de células de mamífero e após 24 horas estas células eram observadas, quanto à presença ou não de algum efeito tóxico. No mesmo ano, Guess et al.⁴⁷ descreveram o método de difusão em ágar, onde a monocamada celular era sobreposta por uma camada de ágar e os materiais a serem testados eram colocados sobre esta camada evitando assim, os problemas apresentados quando colocados diretamente em contato com a monocamada celular. Este método é citado na American Society for Testing and Materials (ASTM), Farmacopéia Americana e pelas normas da International Organization for Standardization (ISO) para avaliação de polímeros de uso médico^{1,51,90,91,92,93,94}.

Comber e Castelli²⁸ compararam o teste de irritação ocular

de Draize e o método de difusão em ágar utilizado como alternativo. Algumas modificações no protocolo original do método *in vitro* foram introduzidas, a lise em relação à toxicidade foi definida por um método planimétrico, onde o tamanho da área das células mortas é desenhado em papel, que após ser pesado pode fornecer quatro classificações diferentes. Neste estudo, os resultados foram agrupados em duas classes, designadas como não irritante e irritante e a correlação observada entre os dois métodos foi de 86% de concordância. O método de difusão em ágar, segundo os autores pode ser incluído na bateria de testes para avaliar o potencial de irritação dos produtos cosméticos.

No início da década de 80, Mosmann⁶³, Borenfreud e Puerner¹⁵ descreveram outra técnica para quantidades elevadas de amostras. Nesta técnica, as células são semeadas em microplacas e a viabilidade celular é avaliada por métodos colorimétricos, utilizando a redução do MTT ou a incorporação do vermelho neutro, os quais são quantificados por espectrofotometria. Esta técnica é rápida e quantitativa, pois permite avaliar várias concentrações do produto e calcular a concentração que causa 50% de morte celular. Desde então, vários estudos comparando o uso do vermelho neutro com o MTT ou estudos utilizando um destes corantes têm sido realizados para a determinação do índice médio de citotoxicidade de muitas substâncias^{3,4,14,16,49,68,88}.

Chiba et al.²⁵ desenvolveram um estudo, onde analisaram na mesma célula a viabilidade e o crescimento celular usando simultaneamente vermelho neutro, MTT e cristal violeta. O método pode ser útil na avaliação da citotoxicidade de substâncias mediadas por diferentes mecanismos, levando a diferentes respostas e ainda, o uso de vários tipos de avaliação evitaria resultados duvidosos. Estudos comparando simultaneamente a viabilidade e o crescimento celular utilizando os corantes vermelho neutro e o *amino black* respectivamente, mostraram boa correlação com a combinação dos dois métodos no mesmo ensaio, resultando em informações tanto sobre a viabilidade como sobre o número de células²⁶.

Com o propósito de se encontrar um protocolo que substituísse os ensaios *in vivo* vários outros modelos foram desenvolvidos, dentre eles os chamados organotípicos, os quais empregam órgãos isolados do animal, mantidos por curto período de tempo *in vitro* preservando suas funções fisiológicas e bioquímicas. Os mais conhecidos são ensaios com olho isolado de coelho (IRE), olho isolado de galinha (CEET), opacidade e permeabilidade de córnea bovina (BCOP) e cristalino bovino. Todos estes métodos foram elaborados com o propósito de selecionar e avaliar o potencial irritante de várias substâncias, antes de serem aplicadas no método tradicional de irritação ocular de Draize²².

No estudo realizado por Chamberlain et al.²², concluiu-se que os métodos de olhos isolados e o BCOP podem ser usados para seleção prévia de substâncias severamente irritantes, antes da sua avaliação *in vivo*. O BCOP é o mais recente dentre os ensaios organotípicos e, apesar de apresentar

uma boa correlação com os ensaios *in vivo*, seu uso como metodologia seletiva deve ser prudente, devido aos resultados falso-negativos apresentados. Este aspecto foi discutido por outro autor que sugere ajustes no protocolo⁴¹. Cooper et al.²⁹ demonstraram que o BCOP é menos sensível que o IRE, talvez devido ao maior número de camadas epiteliais no olho do boi em relação ao encontrado na córnea do coelho.

Jester et al.⁵³, em seus estudos sobre os mecanismos de lesão da córnea, avaliaram o processo de irritação ocular utilizando córnea de coelho cultivada *in vitro*. O modelo apresentou boa correlação com os testes *in vivo* e facilitou o conhecimento dos mecanismos de danos na córnea causados por substâncias promotoras de diferentes graus de irritação. Este conhecimento pode ainda, ser aplicado no desenvolvimento de modelos alternativos para avaliação de irritação ocular.

Sistemas organotópicos, utilizando membrana córion-alantóica de ovos embrionados de galinha, resultaram em dois tipos de protocolos, o CAMVA (teste de membrana vascular córion-alantóica) desenvolvido por pesquisadores americanos que usavam ovos embrionados de 10 a 14 dias e o HET-CAM (teste de membrana córion-alantóica de ovo de galinha) desenvolvido por pesquisadores alemães com ovos embrionados de nove dias. Estes protocolos foram baseados na observação da vascularização da membrana córion-alantóica que é praticamente similar àquela dos tecidos da mucosa ocular. No CAMVA os parâmetros de avaliação são os efeitos vasculares como hemorragia, no HET-CAM além destes efeitos vasculares observa-se a desnaturação de proteínas⁸⁵.

Os estudos realizados por Spielmann et al.⁸⁵ mostram que o protocolo do HET-CAM prediz melhor o método *in vivo*, para avaliar agentes tensoativos ou formulações baseadas nestes compostos, enquanto o CAMVA tem melhor desempenho com formulações alcoólicas. Estes modelos muitas vezes geram polêmica, já que em alguns países os ovos embrionários de 14 dias são incluídos na categoria de experimentos *in vivo*⁶.

Métodos baseados nas funções celulares são também utilizados, tais como o teste da passagem de fluoresceína e o teste da medida do metabolismo celular. O teste da passagem de fluoresceína reflete os aspectos funcionais das células epiteliais como barreira, nas regiões das ligações intercelulares e na integridade da membrana plasmática. Neste teste, as linhagens celulares mais utilizadas são a MDCK (cultura de células de rim de cachorro) e a NHEK (cultura de células de queratinócitos humanos) porque mantêm estas funções *in vitro*. O teste do metabolismo celular é realizado por meio de um aparelho que detecta alterações metabólicas celulares semelhantes à resposta local, das células oculares, frente aos produtos irritantes. Muitas linhagens celulares têm sido usadas para esta medida de atividade metabólica. Os estudos realizados por Botham et al.¹⁷ indicam que estes testes podem ser utilizados como substitutos do teste de irritação ocular de Draize para irritantes severos e que respondem melhor a determinados tipos de formulações. Os autores sugerem a

necessidade de mais estudos intra e interlaboratoriais para avaliar a reprodutibilidade destes métodos.

Clothier et al.²⁷ desenvolveram um protocolo utilizando o teste de passagem de fluoresceína combinado com o método de viabilidade celular utilizando o corante azul de alamar. O objetivo foi avaliar a resposta irritante e o perfil de recuperação do dano ocasionado nas células, simulando os mesmos acontecimentos e os mesmos valores observados no protocolo de Draize. A combinação dos efeitos iniciais e a taxa de recuperação permitiram discriminar o potencial de irritação das substâncias e a sua concentração.

Como alternativo ao teste de irritação ocular de Draize, a In Vitro International, Inc (USA) desenvolveu o Sistema Eytex[®] que consiste de múltiplos protocolos, cada qual específico para um tipo de amostra. Este sistema é baseado nas respostas físicas e bioquímicas de um conjunto de macromoléculas, a qual consiste em uma matrix protéica, que produz turbidez similar à opacidade da córnea em resposta a irritantes químicos. Estudos revelam que a maior vantagem deste sistema é a habilidade de testar vários tipos físicos de materiais, sendo também rápido e barato, apresenta ainda, boa correlação com o método de Draize, segundo os resultados obtidos em vários laboratórios americanos^{21,32,46}.

Sistemas alternativos como o Microtox[®] estão disponíveis comercialmente. Bactérias luminescentes são usadas como alvo e a medida da redução de luminosidade como indicador de toxicidade. Este método é proposto como pré-triagem para alguns produtos e para outros mostra-se inadequado³².

Nos testes de pele-equivalente que são modelos de culturas tridimensionais de fibroblastos e queratinócitos humanos, vários parâmetros podem ser observados, tais como: viabilidade com MTT ou vermelho neutro, PGE2 (prostaglandina) como medida de resposta inflamatória e dosagem de lactato desidrogenase (LDH). Este tecido construído *in vitro* é estratificado, mas não corneificado e por isso se assemelha ao epitélio humano da córnea ou conjuntiva. Foi demonstrada ainda, uma boa correlação com os ensaios de irritação *in vivo*^{32,56,75}.

Diferentes metodologias têm sido propostas como substitutas aos testes de Draize, desta forma muitos estudos comparando-as vêm sendo realizados. Alguns autores procuram relacionar todos os eventos clínicos que ocorrem na córnea e na conjuntiva durante o processo de irritação ocular⁷⁸.

Vários autores comparam diferentes metodologias com os resultados dos testes de irritação ocular. Dentre as metodologias foram consideradas diferentes linhagens celulares e os resultados comparados com distintos métodos *in vitro*, tais como HET-CAM, BCOP, hemólise de células vermelhas do sangue, Microtox[®], Eytex[®], entre outros. Após a avaliação dos resultados foi sugerida a utilização de uma bateria de testes para prever melhor o potencial irritante, pois cada método reflete determinada etapa do efeito ou aplica-se mais adequadamente a determinado grupo de substâncias^{6,36,52,55,58,65,78,98}. Na maioria destes estudos, o produto avaliado caracteriza-se por ser um

agente tensoativo, utilizado como ingrediente de diferentes formulações de xampus, sabonetes líquidos e outros. Tais produtos são, na maioria das vezes, os responsáveis pela irritação no olho do coelho.

Roguet e Schaefer⁷⁶ fizeram uma revisão sobre vários tipos de células cultivadas *in vitro* e culturas de pele reconstituídas. Segundo os autores, a evolução das técnicas de culturas celulares poderá contribuir muito para a aplicação nos estudos fármaco-toxicológicos *in vitro*, proporcionando o refinamento de métodos alternativos aos animais de laboratório.

Majmudar e Smith⁶² compararam vários tipos de células da pele utilizadas nos testes *in vitro*. Fizeram referências aos modelos tridimensionais da epiderme e derme humana como sistemas *in vitro* eficazes para a detecção bioquímica e histológica de irritação, corrosão e fototoxicidade da pele, apesar de serem dispendiosos e de difícil manutenção.

Em 1993, o Interagency Regulatory Alternative Group (IRAG) conduziu um Workshop com a intenção de examinar a importância dos métodos alternativos quando comparados com o teste de irritação ocular de Draize. Neste estudo foram identificadas cinco categorias de métodos agrupados com base em princípios gerais, biológicos ou bioquímicos. Os grupos de trabalho formados foram de modelos organotípicos, testes baseados na membrana córion-alantóica, testes baseados na função celular, testes de citotoxicidade e outros sistemas. Cerca de 26 tipos diferentes de métodos foram revistos, concluindo-se que os dados eram insuficientes para decidir pela total substituição do teste *in vivo*. Os métodos alternativos podem, porém ser usados nas indústrias como triagem no processo de avaliação de risco dos produtos em desenvolvimento e os resultados de alguns modelos podem levar a redução do número de animais, quando conduzidos sob condições bem definidas. Recomendações adicionais foram sugeridas, tais como: aumentar o número de pesquisas básicas voltadas para identificação de mecanismos alvo de resposta da injúria ocular humana; estabelecer banco de dados com substâncias padrão; selecionar baterias de testes para identificar substâncias novas; identificar métodos promissores para facilitar os estudos de validação; dar prioridade à padronização internacional¹⁸.

Com o intuito de fornecer para as indústrias de cosméticos informações suficientes sobre o desempenho dos métodos alternativos, a Cosmetic Toiletry and Fragrance Association (CTFA) desenvolveu um programa para avaliação das limitações e da aplicabilidade de cada método alternativo. Estudos de correlação *in vivo/in vitro* permitiram concluir que a maioria dos métodos utilizados apresentou sensibilidade e especificidade adequadas, com exceção dos métodos de liberação de vermelho neutro e da dosagem de lactato desidrogenase^{42,44}.

Com base nos resultados obtidos no estudo desenvolvido pelo CTFA, Lordo et al.⁵⁹ discutiram que embora a preocupação fundamental seja quanto ao desempenho dos métodos alternativos, a variabilidade dos resultados do teste de Draize deve ser considerada. Esta variação dificulta a

validação dos métodos alternativos, uma vez que o objetivo é prever o grau de irritação do olho do coelho.

No início da década de 90, um grupo de pesquisadores, financiados pelo Ministério da Saúde do Japão, propôs um projeto intitulado “Study on Test Methods to Evaluate the Safety of Cosmetics Containing New Ingredients”. O objetivo do projeto foi investigar a possibilidade de substituir os testes *in vivo* de Draize por métodos *in vitro*. Após rever os métodos alternativos para ingredientes de cosméticos, decidiu-se conduzir um estudo de validação interlaboratorial. Os métodos foram selecionados com base nos princípios científicos, considerações éticas e na possibilidade do método ser usado no Japão. O estudo foi dividido em três etapas e 12 métodos foram aplicados para o mesmo grupo de 38 substâncias^{24,67,87,89}. Todos os resultados gerados pelo projeto foram avaliados e comparados por Ohno et al.⁶⁶, que discutiram as vantagens e as desvantagens de cada metodologia, juntamente com os seus coeficientes de variação interlaboratorial e suas correlações com o método *in vivo*. Estes autores concluíram que não é indicado um único método para avaliar todos os tipos de substâncias, enquanto vários métodos podem prever melhor o potencial de irritação ocular, desde que usados com claro entendimento de suas características. Por exemplo, os testes de citotoxicidade proporcionam informações a respeito dos efeitos tóxicos dos mecanismos bioquímicos básicos da célula, enquanto os testes de membranas córion-alantóica avaliam reações nos vasos sanguíneos, e assim distintos métodos se complementam.

Com o mesmo propósito de validar os métodos alternativos ao teste de Draize, uma comissão formada pelo governo britânico e membros da comunidade europeia, “European Commission/British Home Office” (EC/HO) desenvolveram um estudo interlaboratorial com o objetivo de sugerir às autoridades reguladoras um ou mais métodos a serem adotados como substitutos dos ensaios *in vivo*. Sessenta substâncias foram avaliadas por nove métodos e quatro etapas foram determinadas. Os métodos deveriam identificar todas as substâncias severamente irritantes, substâncias irritantes pertencentes a uma classe específica, todos os níveis de irritação das substâncias, sem observar a classe química e todos os níveis de irritação das substâncias pertencentes a classes químicas específicas. Após avaliarem todos os resultados, concluiu-se que alguns métodos poderiam prever o potencial de irritação ocular, mas com precisão muito baixa e utilidade prática questionável. A baixa precisão poderia estar relacionada com a escolha das substâncias testes, com os protocolos usados no estudo e com a variabilidade dos dados *in vivo*. A comissão sugere que para solução deste problema mais pesquisas básicas sejam desenvolvidas⁹.

A “European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association” (COLIPA) órgão que representa a indústria de cosméticos, desenvolveu um estudo de validação dos métodos alternativos com o objetivo de avaliar sua habilidade em prever o potencial de irritação ocular. Neste estudo 10 diferentes

métodos alternativos foram avaliados para analisar 55 amostras, sendo 23 ingredientes e 32 formulações. Os resultados preliminares indicam que os métodos alternativos utilizados não poderiam ser considerados como válidos para substituir o teste de Draize, pois nenhum apresentou confiabilidade em demonstrar as variações da escala de irritação ocular¹⁹.

Os detalhes sobre determinados métodos, do estudo realizado pela COLIPA, foram comentados em publicações posteriores. Southee et al.⁸³ descreveram os resultados do ensaio de tecido equivalente (TEA) e verificaram que apesar deste método apresentar boa correlação com os resultados *in vivo* e não ser limitado aos materiais líquidos e solúveis, não apresentou boa reprodutibilidade. As técnicas de aplicação das amostras, o manuseio e os tempos utilizados pelos dois laboratórios onde este método foi realizado podem estar relacionados com as diferenças observadas.

Courtellemont et al.³⁰ utilizaram o Predisafe®, um protocolo disponível comercialmente para avaliar a citotoxicidade, utilizando a linhagem celular SIRC e a medida de liberação do vermelho neutro (NRR). As análises estatísticas mostraram que o método pode prever o potencial irritante de uma grande categoria de produtos acabados. Ainda, associado à sua facilidade de uso oferece vantagens relevantes para ser utilizado na rotina das indústrias de cosméticos, como método de triagem na avaliação da irritação ocular.

Lovell⁶¹, com o objetivo de diminuir a variabilidade dos resultados *in vivo* durante o estudo de validação dos métodos *in vitro* da COLIPA, buscou a correlação entre os valores de irritação ocular e os valores individuais dos danos observados nos tecidos oculares dos coelhos, obtidos na avaliação das 55 amostras utilizadas. O autor realizou uma análise estatística utilizando o método de multivariáveis e concluiu que há poucas evidências de que os valores individuais dos danos no tecido possam melhorar a habilidade de prever o potencial de irritação ocular pelos métodos alternativos.

Métodos que adotam discos de pele de coelho, mantidos *in vitro* por até sete dias, para avaliar substâncias irritantes ou corrosivas foram desenvolvidos com o objetivo de substituir os testes de irritação cutânea de Draize. O modelo é aplicável na avaliação da toxicidade dérmica, podendo utilizar vários parâmetros de avaliação^{79,95,96}.

Segundo Dickson et al.³⁴, as culturas de queratinócitos podem ser importantes na avaliação do potencial de irritação dérmica. A atividade da fosfatase alcalina, tomada como parâmetro pode ser considerada como indicador sensível, principalmente quando a substância testada altera as funções das membranas dos lisossomos.

Até o momento não existem métodos validados para substituir os ensaios de irritação cutânea. No entanto, o ECVAM concluiu, para produtos corrosivos, a validação de dois métodos *in vitro*. Neste estudo, em que foram analisados quatro métodos, o objetivo foi verificar a capacidade de discriminar entre substâncias corrosivas e não corrosivas, além de identificar corretamente certas classes de substâncias. O primeiro foi o

teste de resistência elétrica transcutânea (TER), que utiliza discos de epiderme de rato para avaliar a integridade do estrato córneo, afetada após exposição às substâncias corrosivas. O segundo teste foi o Corrositex® que emprega uma matriz de colágeno reconstituída, elaborada para apresentar propriedades físico-químicas semelhantes à da pele de rato, que em contato com substâncias corrosivas é alterada. O terceiro e o quarto testes foram o EPISKIN® e o SKIN²®, modelos de peles tridimensionais reconstituídas, onde a ação corrosiva é avaliada pela diminuição da viabilidade celular, constatada pela redução do MTT.

Cada método foi avaliado em três laboratórios e frente a 60 substâncias de diferentes categorias de corrosividade, já classificadas *in vivo* e com informações de relação estrutural-atividade. Todos os testes apresentaram reprodutibilidade intra e interlaboratorial, mas somente os testes de TER e o EPISKIN® atenderam aos principais objetivos do estudo, discriminando as substâncias corrosivas das não corrosivas. O Corrositex® só identificou alguns tipos de substâncias e o SKIN²® não evidenciou resultados que permitissem sua validação^{12,13,39}.

O ECVAM, devido ao sucesso da validação dos métodos alternativos para avaliação de substâncias corrosivas, apontou a necessidade urgente de validar testes *in vitro* para avaliar irritação cutânea. Com este objetivo, Fentem et al.⁴⁰ elaboraram um estudo de pré-validação, no qual foram avaliados cinco métodos. Observaram que dentre os métodos utilizados, os de pele equivalente, EpiDERM® e EPISKIN® apresentaram a melhor reprodutibilidade intralaboratorial, mas só o EPISKIN® foi aceitável quanto a reprodutibilidade interlaboratorial. Concluíram que nenhum dos métodos utilizados poderia ser indicado no estudo formal de validação, mais estudos deveriam ser feitos para melhorar os protocolos e os modelos de predição dos testes EPISKIN® e EpiDERM®.

Robinson et al.⁷² fizeram uma revisão de todos os resultados obtidos nos estudos de alguns métodos alternativos utilizados para avaliação do potencial de corrosão e irritação da pele. Neste trabalho verificaram que há várias ferramentas básicas disponíveis para que avaliações seguras de corrosão/irritação cutânea possam ser conduzidas sem a realização de novos testes em animais.

O grande desafio, atualmente, é a validação dos métodos alternativos, que tem gerado muita preocupação e discussão, tanto por parte da comunidade científica quanto dos órgãos reguladores. A utilização de métodos validados busca garantir o mesmo nível de proteção oferecido pelos métodos oficiais.

Sendo assim, alguns autores baseiam seus estudos na definição de que validação “é um processo no qual os parâmetros como confiança e relevância de um método alternativo são estabelecidas para um propósito particular”. A confiança refere-se às condições de reprodutibilidade e capacidade com que um método pode prever o resultado *in vivo*. O método, para ser incluído no estudo de validação requer estabelecimento de certos elementos, como a relevância, procedimentos operacionais padrão e as medidas de confiança

que serão confirmadas durante o processo de validação²⁰.

A importância da validação, pré-validação, do conceito três Rs e outras questões foram abordadas por Balls e Fentem¹⁰, na regulamentação dos testes toxicológicos “*in vitro*”. A validação deve ser vista como uma etapa essencial no desenvolvimento do teste e sua aceitação não deve ser encarada como barreira, mas como uma oportunidade para acelerar o uso dos testes *in vitro* na avaliação de risco dos produtos de uso humano ou que possam causar danos no meio ambiente⁸.

Spielmann e Liebsch⁸⁴ fazem referências à evolução dos estudos de validação, comentam que eles têm custo elevado e consomem um tempo médio de 10 anos. Segundo os autores, o progresso e a aceitação internacional dos testes de toxicidade *in vitro*, só será alcançado se a Europa, Japão e os Estados Unidos encontrarem maneiras de coordenar os estudos. Comentam, ainda, que os protocolos elaborados pelo ECVAM e OECD são os mais apropriados para a validação destes testes. Estes protocolos observam alguns critérios básicos com relação ao método avaliado, tais como a relação entre a resposta *in vivo* e *in vitro*, demonstração de variabilidade, repetibilidade e reprodutibilidade, desempenho do teste frente a substâncias de referência e, ainda, que seja de domínio público⁶⁰.

REFERÊNCIAS

- American Society for Testing and Materials. Standard test method for agar diffusion cell culture screening for cytotoxicity: designation: F 895-84. Philadelphia: ASTM, 1995, p.276-9.
- Azevedo, J.C. **Avaliação de metodologia alternativa *in vitro* ao teste de irritação ocular de Draize**. São Paulo, 1998. 145p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
- Babich, H.; Babich, J.P. Sodium lauryl sulfate and triclosan: *in vitro* cytotoxicity studies with gingival cells. **Toxicol. Lett.**, 91: 189-96, 1997.
- Babich, H.; Borenfreund, E. Cytotoxic and morphological effects of phenylpropanolamine, caffeine, nicotine, and some of their metabolites studied *in vitro*. **Toxicol. In Vitro**, 6 (6): 493-502, 1992.
- Bagley, D.M. et al. Eye irritation: reference chemicals data bank. **Toxicol. In Vitro**, 6: 487-91, 1992b.
- Bagley, D.M. et al. An evaluation of five potential alternatives *in vitro* to the rabbit eye irritation test *in vivo*. **Toxicol. In Vitro**, 6 (4): 275-84, 1992a.
- Bagley, D.M. et al. Skin irritation: reference chemicals data bank. **Toxicol. In Vitro**, 10:1-6, 1996.
- Balls, M. Scientific validation: a crucial and unavoidable prerequisite to the acceptability of new tests and testing strategies. **ATLA, Altern. Lab. Anim.**, 23: 474-9, 1995.
- Balls, M. et al. The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. **Toxicol. In Vitro**, 9 (6): 871-929, 1995.
- Balls, M.; Fentem, J.H. The validation and acceptance of alternatives to animal testing. **Toxicol. In Vitro**, 13: 837-46, 1999.
- Barratt, M.D. QSARS for the eye irritation potential of neutral organic chemicals. **Toxicol. In Vitro**, 11: 1-8, 1991.
- Barratt, M.D. et al. The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. **Toxicol. In Vitro**, 12: 471-82, 1998.
- Barrela, C., Roque, J.; Silva, T. **Métodos alternativos à experimentação animal na indústria de cosméticos**. [http://www.fmv.utl.pt/democ/sft/sem0001/G23.html]. 16 janeiro 2002.
- Borenfreund, E.; Babich, H.; Martin-Alguacil, N. Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assays- the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. **Toxicol. In Vitro**, 2 (1): 1-6, 1988.
- Borenfreund, E.; Puerner, J.A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). **J. Tissue Cult. Methods**, 9 (1): 7-9, 1984.
- Borenfreund, E.; Puerner, J.A. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicol. Lett.**, 24: 119-24, 1985.
- Botham, P. et al. Cell function-based assays. **Food Chem. Toxicol.**, 35: 67-77, 1997.
- Bradlaw, J.A.; Wilcox, N.L. Workshop on eye irritation testing: Practical applications of non-whole animal alternatives. **Food Chem. Toxicol.**, 35: 1-11, 1997.
- Brantom, P.G. et al. A summary report of the COLIPA international validation study on alternatives to the Draize rabbit eye irritation test. **Toxicol. In Vitro**, 11: 141-79, 1997.
- Bruner, L.H. et al. Validation of alternative methods for toxicity testing. **Toxicol. In Vitro**, 10: 479-501, 1996.
- Cade, P. Avaliação da ação antiirritante, comparação entre métodos *in vivo* e *in vitro*. **Cosmet. Toiletries, Ed. Port.**, 2: 13-7, 1990.
- Chamberlain, M. et al. Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. **Food Chem. Toxicol.**, 35: 23-37, 1997.
- Chamberlain, M.; Parish, W.E. Hazard and risk based on *in vitro* test data. **Toxicol. In Vitro**, 4 (4/5): 694-7, 1990.
- Chiba, K. et al. Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients (9): evaluation of cytotoxicity test on Hela cells. **Toxicol. In Vitro**, 13: 189-98, 1999.
- Chiba, K., Kawakami, K., Tohyama, K. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. **Toxicol. In Vitro**, 12: 251-8, 1998.
- Ciapetti, G. et al. Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. **Biomaterials**, 17 (13): 1259-64, 1996.
- Clothier, R. et al. Assessment of initial damage and recovery following exposure of MDCK cells to an irritant. **Toxicol. In Vitro**, 13: 713-7, 1999.
- Combrier, E., Castelli, D. The agarose overlay method as a screening approach for ocular irritancy: application to cosmetic products. **ATLA, Altern. Lab. Anim.**, 20 (3): 438-44, 1992.
- Cooper, K.J. et al. Prediction of ocular irritancy of prototype shampoo formulations by the isolated rabbit eye (IRE) test, and bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay. **Toxicol. In Vitro**, 15: 95-103, 2001.
- Courtellemont, P. et al. Relevance and reliability of the PREDISAFE assay in the COLIPA eye irritation validation program (phase 1). **Toxicol. In Vitro**, 13: 305-12, 1999.
- Cronin, M.T.D.; Basketter, D.A., York, M. A quantitative structure-activity relationship (QSAR) investigation of a Draize eye irritation database. **Toxicol. In Vitro**, 8 (1): 21-8, 1994.
- Curren, R.D. et al. Other assays. **Food Chem. Toxicol.**, 35: 127-58, 1997.
- De Angelis, I. et al. *In vitro* toxicity of some cosmetic ingredients. **Food Chem. Toxicol.**, 24 (6/7): 477-9, 1986.
- Dickson, F.M., Lawrence, J.N.; Benford, D.J. Surfactant-induced cytotoxicity in cultures of human keratinocytes and a commercially available cell line (3T3). **Toxicol. In Vitro**, 7 (4): 381-4, 1993.
- 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. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 82: 377-90, 1944.
- Earl, L.K. et al. Comparison of five potential methods for assessing ocular irritation *in vitro*. **Toxicol. In Vitro**, 9 (3): 245-50, 1995.
- Eisenbrand, G. et al. Methods of *in vitro* toxicology. **Food Chem. Toxicol.**, 40: 193-236, 2002.
- FDA.U.S. Food and Drug Administration. **Animal testing**. [http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/cos-205.html]. 8 março 2001.
- Fentem, J.H. et al. The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the management team. **Toxicol. In Vitro**, 12: 483-524, 1998.

40. Fentem, J.H. et al. A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: results and evaluation by the management team. **Toxicol. In Vitro**, 15: 57-93, 2001.
41. Gautheron, P. et al. Interlaboratory assessment of the bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay. **Toxicol. In Vitro**, 8 (3): 381-92, 1994.
42. Gettings, S.D. et al. The CTFA evaluation of alternatives program: an evaluation of *in vitro* alternatives to the Draize primary eye irritation test. (Phase II) oil/water emulsions. **Food Chem. Toxicol.**, 32 (10): 943-76, 1994.
43. Gettings, S.D. et al. Comparison of low-volume, Draize and *in vitro* eye irritation test data. I. Hydroalcoholic formulations. **Food Chem. Toxicol.**, 34: 737-49, 1996b
44. Gettings, S.D. et al. The CFTA evaluation of alternatives program: an evaluation of *in vitro* alternatives to the Draize primary eye irritation test. (Phase III) Surfactant-based formulations. **Food Chem. Toxicol.**, 34 (1): 79-117, 1996a.
45. Gettings, S.D. et al. A comparison of low volume, Draize and *in vitro* eye irritation test data. II. Oil/water emulsions. **Food Chem. Toxicol.**, 36: 47-59, 1998.
46. Gordon, V.C. The scientific basis of the EYTEX system. **ATLA, Altern. Lab. Anim.**, 20: 537-48, 1992.
47. Guess, W.L. et al. Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayers. **J. Pharm. Sci.**, 54: 1545-7, 1965.
48. Harbell, J.W. et al. Cell cytotoxicity assays. **Food Chem. Toxicol.**, 35: 79-126, 1997.
49. Hockley, K.; Baxter, D. Use of the 3T3 cell-neutral red uptake assay for irritants as an alternative to the rabbit (Draize) test. **Food Chem. Toxicol.**, 24 (6/7): 473-5, 1986.
50. Husoy, T.; Syversen, T.; Jenssen, J. Comparisons of four *in vitro* cytotoxicity tests: the MTT assay, NR assay, uridine incorporation and protein measurements. **Toxicol. In Vitro**, 7 (2): 149-54, 1993.
51. International Organization for Standardization. **ISO 10.993-5: Biological evaluation of medical devices. Part 5. Test for cytotoxicity: *in vitro* methods.** Geneva: ISO, 1992. 7p.
52. Itagaki, H. et al. An *in vitro* alternative to the Draize eye-irritation test: evaluation of the crystal violet staining method. **Toxicol. In Vitro**, 5 (2): 139-43, 1991.
53. Jester, J.V. et al. Extent of initial corneal injury as a basis for alternative eye irritation tests. **Toxicol. In Vitro**, 15: 115-30, 2001.
54. Kay, J.H.; Calandra, J.C. Interpretation of eye irritation tests. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, 13: 281-9, 1962.
55. Kojima, H. et al. Evaluation of seven alternative assays on the main ingredients in cosmetics as predictors of Draize eye irritation scores. **Toxicology in Vitro**, 9 (3): 333-40, 1995.
56. Lawrence, J.N. Application of *in vitro* human skin models to dermal irritancy: a brief overview and future prospects. **Toxicol. In Vitro**, 11: 305-12, 1997.
57. LEE, J.K. et al. *In vitro* cytotoxicity tests on cultured human skin fibroblasts to predict skin irritation potential of surfactants. **Toxicol. In Vitro**, 14: 345-9, 2000.
58. Lewis, R.W.; Mccall, J.C.; Botham, P.A. A comparison of two cytotoxicity tests for predicting the ocular irritancy of surfactants. **Toxicol. In Vitro**, 7 (2): 155-8, 1993.
59. Lordo, R.A.; Feder, P.I.; Gettings, S.D. Comparing and evaluating alternative (*in vitro*) tests on their ability to predict the Draize maximum average score. **Toxicol. In Vitro**, 13: 45-72, 1999.
60. Louekari, K. *In vitro* toxicology and the test guidelines. **ATLA, Altern. Lab. Anim.**, 24: 435-8, 1996.
61. Lovell, D.P. Principal component analysis of tissue scores from substances used in the COLIPA eye irritation validation study. **Toxicol. In Vitro**, 13: 491-503, 1999.
62. Majmudar, G., Smith, M. Técnicas de screening *in vitro* em dermatologia. **Cosmet. Toiletries, Ed. Port.**, 10: 44-9, 1998.
63. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, 65: 55-63, 1983.
64. Noser, F. Cultura de células a serviço da cosmetologia. **Cosmet. Toiletries, Ed. Port.**, 3: 46-7, 1991.
65. O'Brien, K.A.F. et al. An *in vitro* study of the eye irritation potential of new shampoo formulations. **Toxicol. In Vitro**, 8 (2): 257-61, 1994.
66. Ohno, Y. et al. Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (1) overview of the validation study and Draize scores for the evaluation of the tests. **Toxicol. In Vitro**, 13: 73-98, 1999.
67. Okumura, H. et al. Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (10) evaluation of cytotoxicity test on CHL cells. **Toxicol. In Vitro**, 13: 199-208, 1999.
68. Olivier, P. et al. Effect of high polyol concentrations on the neutral red absorption assay and tetrazolium- MTT test of rat hepatocytes in primary culture. **Toxicol. In Vitro**, 9 (2): 133-8, 1995.
69. Pinto, T.J.A.; Azevedo, J.C.; Cruz, A.S. Comparative study of epithelial and fibroblastic cell lines as an alternative cytotoxicity test to the Draize method. **J. AOAC Int.**, 83 (3): 665-8, 2000.
70. Pinto, T.J.A.; Kaneko, T.M.; Ohara, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos.** São Paulo: Atheneu, 2000. 309p.
71. Riddell, R.J.; Clothier, R.H.; Balls, M. An evaluation of three *in vitro* cytotoxicity assays. **Food Chem. Toxicol.**, 24 (6/7): 469-71, 1986.
72. Robinson, M.K. et al. Non-animal testing strategies for assessment of the skin corrosion and skin irritation potential of ingredients and finished products. **Food Chem. Toxicol.**, 40: 573-92, 2002.
73. Robinson, M.K.; Osborne, R.; Perkins, M.A. Strategies for the assessment of acute skin irritation potential. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, 42: 1-9, 1999.
74. Roggeband, R. et al. Eye irritation responses in rabbit and man after single applications of equal volumes of undiluted model liquid detergent products. **Food Chem. Toxicol.**, 38: 727-34, 2000.
75. Roguet, R. et al. An interlaboratory study of the reproducibility and relevance of Episkin, a reconstructed human epidermis, in the assessment of cosmetics irritancy. **Toxicol. In Vitro**, 12: 295-304, 1998.
76. Roguet, R.; Schaefer, H. Overview of *in vitro* cell culture technologies and pharmaco-toxicological applications. **Toxicol. In Vitro**, 11: 591-9, 1997.
77. Rosenbluth, S.A. et al. Tissue culture method for screening toxicity of plastic materials to be used in medical practice. **J. Pharm. Sci.**, 54: 156-9, 1965.
78. Rougier, A. et al. The use of *in vitro* methods in the ocular irritation assessment of cosmetic products. **Toxicol. In Vitro**, 8 (4): 893-905, 1994.
79. Ruten, A.A.J.J.L., Van de Sandt, J.J.M. *In vitro* dermal toxicology using skin organ cultures. **Toxicol. In Vitro**, 8 (4): 703-5, 1994.
80. Saotome, K.; Morita, H.; Umeda, M. Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs. **Toxicol. In Vitro**, 3 (4): 317-21, 1989.
81. Sasaki, T. et al. Detergent cytotoxicity simplified assay of cytolysis by measuring LDH activity. **Toxicol. In Vitro**, 6 (5): 451-7, 1992.
82. Seabaugh, V.M. et al. Use of ophthalmic topical anesthetics. **Food Chem. Toxicol.**, 31: 95-8, 1993.
83. Southee, J.A. et al. The performance of the tissue equivalent assay using the skin ZK 1200 model in the COLIPA international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. **Toxicol. In Vitro**, 13: 355-73, 1999.
84. Spielmann, H.; Liebsch, M. Lessons learned from validation of *in vitro* toxicity test: from failure to acceptance into regulatory practice. **Toxicol. In Vitro**, 15: 585-90, 2001.
85. Spielmann, H. et al. CAM-based assays. **Food Chem. Toxicol.**, 35: 39-66, 1997.
86. Springer, J.A. et al. Number of animals for sequential testing. **Food Chem. Toxicol.**, 31: 105-9, 1993.
87. Tani, N. et al. Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (8): evaluation of cytotoxicity tests on SIRC cells. **Toxicol. In Vitro**, 13: 175-87, 1999.

88. Tsutsui, T. et al. Quantitative comparison of cytotoxicity of dental antiseptics to normal human oral keratinocytes *in vitro*. **Toxicol. In Vitro**, 8 (6): 1253-8, 1994.
89. Uchiyama, T. et al. Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients (7): evaluation of cytotoxicity test by CornePack. **Toxicol. In Vitro**, 13: 163-73, 1999.
90. United States Pharmacopeia. 22.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1990. p.1495-7.
91. United States Pharmacopeia. 23.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1995. p.1697-9.
92. United States Pharmacopeia. 24.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1999. p.1831-2.
93. United States Pharmacopeia. 25.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2002. p.1893-5.
94. United States Pharmacopeia. 26.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2003. p.2026-8.
95. Van de Sandt, J.J.M.; Rutten, A.A.J.J.L. Differential effects of chemical irritants in rabbit and human skin organ cultures. **Toxicol. In Vitro**, 9 (2): 157-68, 1995.
96. Van de Sandt, J.J.M.; Rutten, A.A.J.J.L.; Koeter, H.B.W.M. Cutaneous toxicity testing in organ culture: neutral red uptake and reduction of tetrazolium salt (MTT). **Toxicol. In Vitro**, 7 (1): 81-6, 1993.
97. Van Zutphen, L.F.M.; Van der Valk, J.B.F. Developments on the implementation of the three Rs in research and education. **Toxicol. In Vitro**, 15: 591-5, 2001.
98. Vian, L. et al. Comparison of three *in vitro* cytotoxicity assays for estimating surfactant ocular irritation. **Toxicol. In Vitro**, 9 (2): 185-90, 1995.
99. Wilhelmus, K.R. The Draize eye test: therapeutic reviews. **Surv. Ophthalmol.**, 45 (6): 493-515, 2001.