

Intercambio para estrategias en los métodos alternativos para evaluar el potencial del efecto irritante ocular.

Luis Alfredo Rosario Fernández^{1*}, Daniel Francisco Arencibia Arrebola^{2}.**

¹ Licenciado en Microbiología.

² Doctor en Medicina Veterinaria y Zootecnia, Aspirante a Investigador.

*Centro de Química Farmacéutica (CQF), Calle 200 y Avenida 21, Atabey, Playa, Apartado Postal 16042, Ciudad de La Habana, Cuba.

**Instituto Finlay, Vicepresidencia de Investigaciones, Calle 17 e/ 198 y 200, Atabey, Municipio Playa, Apartado Postal 16017, Ciudad Habana, Cuba.

Correspondencia a: Daniel Francisco Arencibia Arrebola.

Email: darencibia@finlay.edu.cu , luis.fernandez@cqb.cu

Resumen

Desde los años 90 se han realizado varios estudios de validación de alternativas *in vitro* al ensayo de irritación ocular. En la actualidad, se ha refinado el método para reducir el sufrimiento de los animales, validando varias alternativas *in vitro* con fines reguladores para identificar productos irritantes severos. Aún así estos procedimientos tienen algunas limitaciones. En esta comunicación corta trataremos de realizar una actualización sobre los métodos *in vitro* del ensayo de irritación ocular y dentro de estos el más utilizado en nuestros días el ensayo del ojo aislado. Para de esta forma propiciar un intercambio en cuanto a estrategias en este tipo de evaluaciones entre los lectores de la revista.

Palabras clave: Efecto irritante ocular, prueba de Draize, métodos alternativos, ensayo del ojo aislado.

Abstract

Exchange for strategies in the alternative methods to evaluate the potential of the ocular irritating effect.

From the 90 years have been carried out several studies of alternative *in vitro* validation to the ocular irritation assays. At the present time, has been refined the method to reduce the animals suffering, validating several alternatives *in vitro* with regulators finals to identify severe irritating products. These procedures have even this way some limitations. In this short communication we will try to carry out a bring up to date on the *in vitro* methods of the ocular irritation assays and inside these the more used in our days the isolated eye assay. We utilized this way to propitiate an exchange as for strategies in this evaluations topic among the journal readers.

Key words: Ocular irritating effect, Draize test, alternative methods, isolated eye assay.

Desarrollo

Desde los años 90 se han realizado varios estudios de validación de alternativas *in vitro* al ensayo de irritación ocular. En la actualidad, se ha refinado el método para reducir el sufrimiento de los animales, validando varias alternativas *in vitro* con fines reguladores para identificar productos irritantes severos. Aún así estos procedimientos tienen algunas limitaciones, algunos autores plantean que si se obtiene un resultado positivo en uno de los cuatro métodos validados no es necesario realizar más ensayos con animales; de obtenerse resultados negativos se debe realizar la prueba en animales obligatoriamente. Sobre todo los autores de este artículo pretendemos llegar a un intercambio entre los lectores de la revista que se interesen por este tipo de ensayos, que nos cuenten sus experiencias y sobre todo su opinión sobre los métodos *in vitro*, si consideran que los existentes hasta el momento son capaces de reemplazar a la prueba de Draize, así como el peso o la estrategia que ellos le atribuyen a cada un de estos ensayos a la hora de clasificar un producto como irritante ocular o no.

Irritación ocular (Prueba de Draize, principio de la técnica):¹

- Aplicación en el saco conjuntival del conejo de 0,1 mL o 0,1 g del producto a ensayar.
- Valoración de las lesiones de córnea, iris y conjuntiva a las 4 horas, 24, 48, 72 horas.
- Cálculo del índice de irritación ocular y clasificación del producto desde no irritante a muy irritante. Ver Figura 1 y 2.

Clasificación del daño ocular (profundidad de la lesión en mm):¹

1. 0-15 No irritante.
2. 15-30 Ligeramente irritante.
3. 30-60 Moderadamente irritante.
4. 60-80 Irritante.
5. 80-110 Muy irritante.

Ver Figura 3 y 4.

Modos de actuar los productos químicos provocando irritación ocular:

- Lisis de la membrana.
- Los tensoactivos solubilizan la membrana lipídica.
- Los solventes orgánicos extraen lípidos.
- Coagulación/Desnaturalización proteica.
- Ácidos y algunos disolventes.
- Saponificación.
- Alcalis (a menudo progresiva).
- Alquilación, daño oxidativo de macromoléculas.
- Materiales reactivos como lejías y peróxidos.

Alternativas al ensayo de irritación ocular: ³⁻⁷

- Órganos aislados: BCOP, IRE, ICE.
- Organotípicos: Het-Cam (membrana corionalantoidea de huevos de gallinas); Cam-TBS (cantidad de trypan azul absorbido en la membrana corionalantoidea de huevos de gallinas).
- Modelos tejido humano reconstituido: Epiocular®, Epitelio corneal.
- Citotoxicidad: NRU (capacidad para inhibir la captación de rojo neutro), NRR (liberación de colorante; exposición 1-3 min; NRR50), Hemólisis y desnaturalización de la hemoglobina.
- Alteración función celular: filtración de fluoresceína, microfisiometro.
- Otros: Eytex®; IRRTECTION®.
- QSAR (paquete de software para predecir la toxicidad de compuestos).

Ojo aislado de conejo, valoración: ^{8,9}

1. Opacidad córnea:

- Gravedad & Área
- Escala de existencia del daño de 0-4 según Hackett y McDonald en el año 1991 que incluye ligeramente irritante (1), moderadamente irritante (2), irritante (3) y muy irritante (4). ^{8,9}

2. Medida del grosor de la córnea (ultrasonic pachymeter):

- 5 puntos, Media grosor.

3. Captación de fluoresceína por la córnea: ⁸

- Gravedad & Área.

- Escala de existencia del daño 0-4 según Hackett y McDonald en el año 1991 que incluye ligeramente irritante (1), moderadamente irritante (2), irritante (3) y muy irritante (4). ^{8,9}

Ver Figura 5, 6, 7 y 8.

Conclusiones

En cuanto a nuestra opinión sobre el tema, hemos de destacar que ambos ensayos *in vivo* e *in vitro* han ganado en nuestros días un gran peso y veracidad científica, y que en materia de los estudios *in vitro* ya validados en los cuales se consta con un amplia gama de posibilidades o variantes para este ensayo, el investigador debe elegir el que va a utilizar según el uso del producto a investigar, propiedades fármaco tóxica del producto a evaluar según sus componentes, condiciones reales de equipamiento, personal calificado y preparado para realizar el ensayo, así como los objetivos y resultados que pretende obtener con la realización de este estudio. Para lo cual de existir algún criterio le agradeceríamos que escribiera a darencibia@finlay.edu.cu.

Figura 1. Aplicación de la sustancia a evaluar mediante la prueba de Draize.



Figura 2. Resultados en la prueba de irritación ocular y dérmica en conejos.

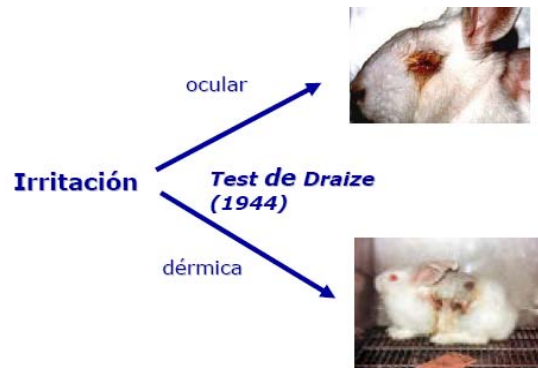


Figura 3. Clasificación del daño de 2 a 5, de izquierda a derecha.^{1, 2}

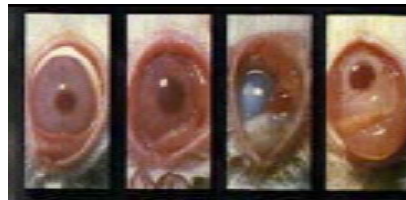


Figura 4. Lesiones corneales asociadas a la irritación ocular *in vivo*.



Figura 5. Evaluación de la opacidad de la córnea.



Figura 6. Medida del grosor de la córnea.

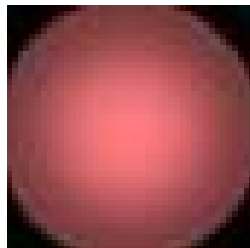


Figura 7. Media de la medida del grosor de la córnea, fijación de 5 puntos.

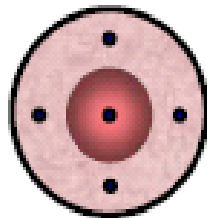


Figura 8. Captación de fluoresceína por la córnea.



Referencias Bibliográficas

1. Draize J.H, Woodard G, Calvery H.O. Method for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy* 1944; 82: 377-390.
2. York M, Steiling W. A critical review of the assessment of eye irritation potential using the Draize rabbit eye test. *Journal of Applied Toxicology* 1998; 18:233-240.
3. Spielmann H, Liebsch M, Kalweit S. Results of a validation study in Germany on two *in vitro* alternatives to the Draize eye irritation test, the HET-CAM test and the 3T3 NRU cytotoxicity test. *Alternatives to Laboratory Animals* 1999; 24:741-858.
4. Balls M, Botham P.A, Bruner L.H, Spielmann H. The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicology in vitro* 1999; 9:871-929.
5. Venkatapathy R, Moudgal C.J, Bruce R.M. Assessment of the oral rat chronic lowest. Observed adverse effect level model in TOPKAT, a QSAR software package for toxicity prediction. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 2004; 44(5):1623-1629.
6. Cronin M.D, Jaworska J.S, Walker J.D. Use of QSARs in International Decision-Making Frameworks to Predict Health Effects of Chemical Substances. *Environmental Health Perspectives* 2003; 111:1391-1401.
7. Lagarto A, Vega R, Guerra I, González R. *In vitro* quantitative determination of ophthalmic irritancy by the chorioallantoic membrane test with trypan blue staining as alternative to eye irritation test. *Toxicology in Vitro* 2006; 20(5):699-702.
8. Chandrasekhar G, Ma X, Lallier T.E, Bazan H.E. Delay of corneal epithelial wound healing and induction of keratocyte apoptosis by platelet-activating factor. *Invest Ophth Vis Sci* 2002; 43(5):1422-1428.
9. Cooper K.J, Earl L.K, Harbell J, Raabe H. Prediction of the ocular irritancy of prototype shampoo formulations by the isolated rabbit eye (IRE) test and bovine corneal opacity and permeability assay (BCOP) assay. *Toxicol in vitro* 2001; 15:95-103.

Recibido: 01/12/09

Aceptado: 21/12/09