



AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE AGUDA: ESTRATÉGIAS APÓS A “ERA DO TESTE DL₅₀”

Acute toxicity evaluation: strategies post “DL₅₀ test era”

Marize C. Valadares

Laboratório de Imunofarmacologia e Imunotoxicologia, Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas (NEPET), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás.

E-mail: marizecv@farmacia.ufg.br

Recebido em 05/10/2006 - Aceito em 16/11/2006

RESUMO: O presente trabalho discute a avaliação da toxicidade aguda sistêmica após a eliminação do teste da DL₅₀ (dose letal mediana). Os três testes alternativos em animais empregados hoje, Dose Fixa, Toxicidade Aguda de Classe e o Teste “Up and Down”, trouxeram significativa melhora para o bem-estar animal. Embora a eliminação total do uso de animais ainda não seja possível, a citotoxicidade basal *in vitro* tem sido empregada como adjuvante dos testes em animal para a seleção das doses iniciais reduzindo ainda mais o número de animais empregados na avaliação da toxicidade aguda sistêmica.

PALAVRAS-CHAVE: toxicidade oral aguda; métodos alternativos de avaliação de toxicidade; citotoxicidade

ABSTRACT: The present work discuss about the evaluation of the acute systemic toxicity post deletion of the LD₅₀ test (median lethal dose). The three alternative animal tests now employed, the Fixed Dose Procedure, the Acute Toxic Class Method and the Up and Down Procedure, give rise to significant improvements in animal welfare. Although, the total replacement of animal tests it is not possible yet, basal cytotoxicity *in vitro* has been used as adjunct to these alternative animal tests to select initial doses, thus reducing the numbers of animals used during the evaluation of acute systemic toxicity.

KEY-WORDS: acute toxicity evaluation; alternative methods of toxicity evaluation, cytotoxicity

INTRODUÇÃO

Depois de muitos anos de debates e discussões o teste da DL₅₀ (dose letal mediana) foi finalmente banido das diretrizes que norteiam a avaliação da toxicidade aguda (BOTHAM, 2002). A avaliação da toxicidade é realizada com o objetivo de determinar o potencial de novas substâncias e produtos causar danos à saúde humana. Testes que avaliam a toxicidade sistêmica aguda são utilizados para classificar e apropriadamente rotular substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade como estabelecido pela legislação. Além da letalidade, outros parâmetros são investigados em estudos de toxicidade aguda sistêmica para identificar o potencial tóxico em órgãos específicos, identificar a toxicocinética e a relação-dose resposta. Outras informações podem ainda ser obtidas numa avaliação de toxicidade aguda como: indicativos sobre o mecanismo de ação tóxica; diagnóstico e tratamento das reações tóxicas; estabelecimento das doses para estudos adicionais de toxicidade; informações para a comparação de toxicidade entre substâncias de mesma classe; informações sobre quais seriam as conseqüências de exposições acidentais no trabalho ou no ambiente doméstico; além de ser um padrão para a avaliação de testes alternativos ao uso de animais experimentais (PURCHASE, et al., 1998; BLAAUBOER, 2003; PRIETO, et al., 2006; COECKE, et al., 2006).

Após muitos anos de controvérsias e debates, o teste da DL₅₀ foi finalmente eliminado no final de 2002 (BOTHAM, 2004).

O teste da DL₅₀ foi inicialmente introduzido em 1927 por Trevan para avaliar substâncias que seriam utilizadas por seres humanos como a *digitallis* e a insulina. Entretanto, na década de setenta, este teste, o qual tinha como objetivo encontrar uma única dose letal de uma substância para metade dos animais do grupo teste, começou a ser empregado amplamente como base de comparação e classificação da toxicidade de substâncias. Este teste tornou-se gradativamente um teste pré-requisito para várias agências reguladoras, como a americana

Food and Drugs Administration (FDA), responsáveis pela aprovação de novos fármacos, aditivos alimentares, ingredientes cosméticos, produtos domésticos, químicos industriais e pesticidas. Para a realização do teste da DL_{50} eram empregados mais de 100 animais para cada espécie estudada (normalmente ratos e camundongos) e para cada substância testada (KRYIAK, & RYDZYNSKI, 1997; STAMMATI, et al., 2005; GUBBELS-VAN HAL, et al., 2005).

Em 1981, a Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (*Organization for Economic Cooperation and Development*; OECD) incorporou o Teste da DL_{50} em suas diretrizes. Entretanto, neste período foi amplamente aceito que precisão estatística juntamente com dados como a inclinação da curva dose-resposta, intervalo de confiança da DL_{50} , e sinais tóxicos, não seriam necessários para propostas de avaliação de risco. Diante disso, a diretriz de 1981 para toxicidade aguda oral (OECD, 401) estabeleceu o uso de apenas 5 animais por sexo, por dose, por grupo, com 3 grupos de doses por teste, sendo estas doses escolhidas a partir de estudos prévios ou dados históricos, para estimar o valor da DL_{50} . Uma dose limite superior de 5.000 mg/kg foi também introduzida para substâncias consideradas atóxicas. Neste documento, o conceito de dose teste limite foi introduzido, o qual exigia, para substâncias com DL_{50} superior a 5.000 mg/kg, que somente a dose limite superior seria testada. Outras diretrizes também foram publicadas para a avaliação da toxicidade dérmica (OECD 402) e avaliação da toxicidade inalatória aguda (OECD 403).

Em 1987, a diretriz 401 da OECD foi revisado essencialmente no que diz respeito às questões referentes ao bem-estar animal. Como consequência, os testes passariam a ser conduzidos utilizando apenas um sexo, com uma posterior confirmação de que não existiam diferenças no material testado na toxicidade aguda oral testando apenas uma dose no segundo sexo. Isto reduziu o número de animais necessários de 30 para 20. Além disso, a dose limite que antes era de 5.000mg/kg foi reduzida para 2.000 mg/kg.

Em 1984, Iain Purchase articulou a criação de um grupo de trabalho na Sociedade Britânica de Toxicologia. Este grupo propôs um novo método para a avaliação da toxicidade aguda oral, o qual evitava utilizar o critério morte dos animais como o objetivo final e propôs a observação do aparecimento de sinais claros de toxicidade decorrentes da exposição a uma série de doses fixas. Este método ficou conhecido como o Teste da Dose Fixa (TDF), avaliado por agências Internacionais, sendo posteriormente publicado em 1990 (VAN DEN HEUVEL, et al., 1990). Este trabalho demonstrava que o TDF permitia classificar substâncias de forma compatível com o sistema empregado pela União Européia, o qual qualificava pelos valores de DL_{50} oriundos do teste clássico de toxicidade oral aguda. O TDF também fornecia a informação necessária sobre a natureza, tempo de início, duração e desfecho dos sinais de toxicidade, os quais são necessários para a avaliação de risco. Mais ainda, o TDF utilizava um número menor de animais do que aquele preconizado pela OECD 401; causava menor mortalidade associada ao composto teste; além de menor dor e sofrimento aos animais.

Em 1992, o TDF foi adotado pela OECD (OECD 420) como alternativa a OECD 401 e não, ainda, como uma substituição. Em 1996, surgiu uma segunda alternativa a OECD 401, o método da Toxicidade Aguda de Classe (TAC) o qual foi adotado pela OECD (OECD 423) e, em 1998, surgiu o Teste "Up and Down" (TUD) sendo, também, posteriormente recomendado pela OECD (OECD 425). O Teste TAC também utiliza o conceito de dose fixas, porém o objetivo final seria a mortalidade. O TUD, como o nome sugere objetiva estimar o valor da DL_{50} testando sequencialmente animais individuais, com a dose para cada animal sendo ajustada para cima ou para baixo, dependendo do resultado prévio do animal anterior.

Contudo, o uso na prática destes 3 métodos alternativos não foi amplamente absorvido pela sociedade científica. Em países como o EUA e Japão, embora incorporadas às diretrizes e recomendadas, o uso destes métodos ficaram restritos a aquelas substâncias onde não era obrigado a obtenção do valor da DL_{50} , o intervalo de confiança e a inclinação da curva. Além disso, no caso dos pesticidas a legislação vigente ainda solicitava a dose limite de 5.000 mg/kg enquanto que a dose limite recomendada pelos 3 métodos era de 2.000 mg/kg. Durante a década de noventa, de forma controversa, mesmo com a adição dos métodos alternativos de avaliação de toxicidade, muitos laboratórios ainda usavam a versão da OECD 1981, a OECD 401. Isto aconteceu principalmente pela obrigatoriedade de utilizar a dose limite superior de 5.000 mg/kg, usada para confirmar a ausência de diferença entre os sexos na suscetibilidade à substância teste, além do desconhecimento dos novos métodos (BOTHAM, 2004).

Neste contexto, para facilitar a aceitação internacional dos 3 métodos e iniciar o processo de eliminação definitiva da diretriz OECD 401, a OECD organizou uma série de reuniões com especialistas no período de 1998 e 2000, o qual resultou na revisão das diretrizes 420, 423 e 425, além de um documento para o uso e interpretação de métodos alternativos de avaliação de toxicidade.

Desde 2000, o grupo de trabalho da OECD para químicos, pesticidas e produtos biotecnológicos concluiu que a OECD 401 seria banida e as diretrizes 420, 423 e 425, então revisadas, foram definitivamente adotadas e recomendadas. Em dezembro de 2002, em associação com a ICCVAM (*Interagency Coordination Committee on the Validation of Alternative Methods*) e US-EPA (*United States-Environmental Protection Agency*) o teste da DL_{50} foi finalmente banido.

As informações obtidas pelos 3 métodos não são idênticas, a escolha do método deve ser feita com base do entendimento claro da proposta científica e regulatória para o teste de toxicidade aguda oral. Os detalhes sobre os 3 métodos estão além da proposta deste artigo, porém podem ser encontradas na página eletrônica da OECD (oecd.org/ehs/test/testlist.htm). Um sumário é mostrado na Tabela 1. Embora a escolha do método deva ser feita

com o critério de bem-estar animal como sendo o principal fator, o número de animais usados nos 3 métodos é muito similar. Além disso, o nível de sofrimento e dor pode ser controlado de forma uniforme conforme exigido pelas diretrizes. O TDF possui a característica de ter a toxicidade evidente ao invés de mortalidade como objetivo principal. O TUD, o qual ainda permite a derivação da DL_{50} estimada, inclui também um método computacional para a obtenção do intervalo de confiança, e uma relativa redução da mortalidade devido à introdução de regras de parada clara dentro do protocolo.

Tabela 1. Princípios dos 3 métodos de avaliação de toxicidade aguda oral: adaptado do artigo de autoria de BOTHAM, 2004.

	Dose fixa	Classe tóxica	"Up and Down"
Nível da dose	Dose fixa de 5, 50, 300, 2000mg/kg, 5 animais por dose	Dose fixa de 5, 50, 300, 2000mg/kg, 3 animais por dose	Dose inicial estimada (175mg/kg), fator de progressão de 3.2, 1 animal
Princípio	Identificar a menor dose que cause toxicidade evidente	Identificar a menor dose que cause mortalidade	Estimar a DL_{50}
Dados Obtidos	Faixa estimada da DL_{50} , sinais de toxicidade aguda. Órgão alvo	Faixa estimada da DL_{50} , sinais de toxicidade aguda. Órgão alvo	Estimar a DL_{50} , sinais de toxicidade aguda. Órgão alvo

Estratégias para a avaliação da Toxicidade aguda oral

Durante o "Workshop" Internacional organizado pela ICCVAM em 2002, a situação corrente dos métodos *in vitro* para a avaliação da toxicidade aguda oral foi estudada. Deste estudo, um processo foi iniciado para oferecer objetivos realísticos em curto prazo e longo prazo para o refinamento e substituição de estudos animais, pelo menos para a toxicidade aguda oral, sendo os mesmos princípios aplicáveis a toxicidade dérmica e inalatória.

Embora naquele momento os ensaios de citotoxicidade *in vitro* ainda não estivessem padronizados e validados, ou mesmo existissem protocolos otimizados e modelos preditivos, estudos consistentes da literatura apontavam para uma correlação positiva entre citotoxicidade *in vitro* e efeitos tóxicos agudos *in vivo*, a aplicação de métodos *in vitro* tinha um importante potencial. O documento final concluiu que a proposta de Spielmann, et al., (1999), na qual a citotoxicidade basal medida em um ou mais células ou linhagens celulares e relacionada com a toxicidade aguda *in vivo*, poderia ser rapidamente absorvido para otimizar a seleção de dose inicial nos testes da dose fixa, teste de classe e o teste "Up and Down". Este procedimento reduziria significativamente o uso de animais, o que iria ao encontro dos anseios da sociedade e comunidade científica. Todavia, o "Workshop" também concluiu que a substituição de testes em animais pelos ensaios *in vitro* ainda era prematura e necessitaria de muito mais tempo para ser implementada. Conclusões adicionais foram o desenvolvimento, padronização e a validação de métodos *in vitro* para a predição de toxicidade em humanos ao invés de roedores a serem conduzidas como medidas a longo prazo. Diante disso, os estudos de Ekwall, (1999), denominado "Multicentre Evaluation of Cytotoxicity *in vitro*" (MEIC), o qual investigava a correlação entre concentrações sanguíneas letais agudas humanas e citotoxicidade basal em uma bateria de 3 linhagens celulares humanas, foram indicados como um dos estudos mais promissores a serem validados e implementados.

A citotoxicidade basal é definida como "os efeitos adversos resultantes da interferência com estrutura e/ou processos celulares essenciais para a sobrevivência, proliferação e/ou função comum a todas as células do organismo" (EKWALL, 1995). A avaliação da citotoxicidade basal é importante, uma vez que as funções celulares basais suportam as funções celulares órgãos-específicas. A citotoxicidade basal é expressa como CI_{50} (concentração que inibe 50% das células quando comparado às células controle não-tratadas), a qual pode ser matematicamente calculada a partir da curva de concentração-efeito. Vários métodos aplicados para testar a toxicidade geral são úteis na toxicologia *in vitro*. Como regra geral, as células são expostas a diferentes concentrações de um produto químico por um dado período de tempo, sendo posteriormente a função celular mensurada utilizando diferentes alvos. Os ensaios mais freqüentemente empregados para a avaliação de citotoxicidade basal são, o teste de redução do tetrazolium MTT e o teste da captação do corante vital vermelho

neutro, o qual já foi validado e recomendado pelo ICCVAM (CASTAÑO & GÓMEZ-LECHÓN, 2005). Este ensaio consiste no plaqueamento de células de fibroblastos normais murinos (linhagem BALB/c 3T3) numa densidade de 3×10^4 em placas de 96 poços. A placa de cultura é então incubada em estufa de CO_2 a 37C^0 com umidade de 85%. Após uma confluência de aproximadamente 75% (24h) estas células são expostas a concentrações diferentes da substancia teste por 48h (Tabela 2; Figura 1). Após este período de incubação o meio contendo a substancia teste é removido e o poço lavado com tampão. O corante vital vermelho neutro é então adicionado à cultura e novamente a placa é incubada por mais 3h. Imediatamente após a incubação o cristal formado é solubilizado e a leitura da absorvância realizada em leitor de ELISA (“*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*”) a 540nm. Os dados são então analisados e compilados em um gráfico de concentração-resposta para a derivação da CI_{50} . Nesta etapa, são avaliadas ainda a consistência e qualidade dos dados obtidos (ICCVAM, 2003).

Tabela 2. Procedimento esquemático da avaliação de citotoxicidade com a linhagem BALB/c 3T3.

TEMPO	PROCEDIMENTO
0 h	Cultivo da linhagem BALB/c 3T3, 3×10^4 cel/ml, em placa de 96 poços;
24 h	Exposição ao xenobiótico;
72 h	Remoção do meio e lavagem com 250 μl de tampão;
73 h	Adição do vermelho neutro;
76 h	Solubilização do cristal do corante com solução de etanol/ácido acético;
76 h	Leitura em ELISA 540 nm; Análise dos dados e avaliação da qualidade;

CONCLUSÕES

A citotoxicidade basal reflete os efeitos adversos sobre as estruturas e processos da célula que são intrínsecas a todas as células, sendo assim a maioria dos sistemas celulares deveria mostrar uma resposta similar, além de responder de forma equivalente quando a toxicidade é medida por vários critérios de viabilidade (CASTAÑO & GÓMEZ-LECHÓN, 2005). Partindo desta premissa, ensaios de citotoxicidade basal *in vitro* foram propostos validados e empregados como uma importante ferramenta na redução do número de animais numa avaliação de toxicidade aguda sistêmica. Embora existam soluções *in vitro*, dados como o efeito dos metabólitos das drogas investigada não podem ser obtidos neste tipo de estudo, tal como aqui discutido. Por outro lado, a citotoxicidade basal é um ensaio que apresenta boa reprodutibilidade, de fácil execução, além de ser de baixo custo relativo.

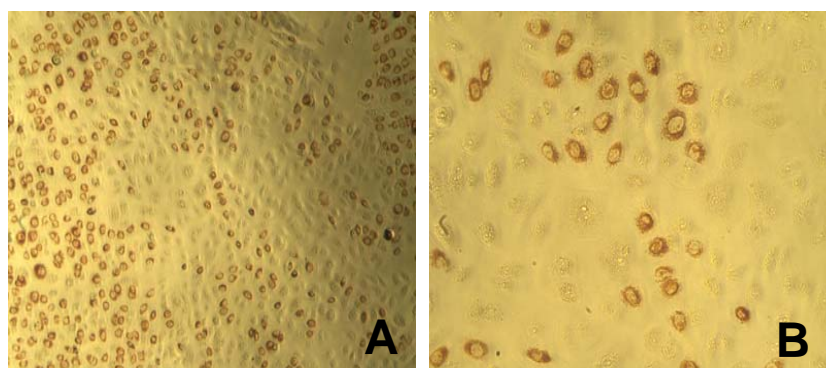


Figura 2. Aspecto de queratinócitos normais após a exposição a lauril sulfato de sódio. Menor aumento (A) e maior aumento (B). As células que incorporaram o corante apresentam uma coloração vermelha e é um indicativo de viabilidade celular. (Adaptado de ICCVAM, 2003, fotomicrografias cedidas a ICCVAM por Dr. Richard Clothier do FRAME Alternatives Laboratory, University of Nottingham, UK).

REFERENCIAS

BLAAUBOER, B. J. Biokinetic and toxicodynamic modelling and its role in toxicological research and risk assessment. *Alternatives to laboratory animals*. v.31 n. 3, p. 277-281, 2003.

BOTHAM, P. A. Acute systemic toxicity. *ILAR Journal*. v.43 Suppl:S, p.27-30, 2002.

BOTHAM, P. A. Acute systemic toxicity--prospects for tiered testing strategies. *Toxicology in Vitro*. v. 18, n.2, p.227-30, 2004.

COECKE, S., BLAAUBOER, B. J.; ELAUT, G.; FREEMAN, S.; FREIDIG, A.; GENSMANTEL, N.; HOET, P.; KAPOULAS, V. M.; LADSTETTER, B.; LANGLEY, G.; LEAHY, D.; MANNENS, G.; MENEGUZ, A.; MONSHOUWER, M.; NEMERY, B.; PELKONEN, O.; PFALLER, W.; PRIETO, P.; PROCTOR, N.; ROGIERS, V.; ROSTAMI-HODJEGAN, A.; SABBIONI, E.; STEILING, W.; VAN DE SANDT, J. J. Toxicokinetics and metabolism. *Alternatives to laboratory animals*. suppl 1, p. 147-175, 2005.

CURREN, R. D.; SOUTHEE, J. A.; H. SPIELMANN, M.; LIEBSCH, J. H.; FENTEM, M. BALLS. The role of prevalidation in the development, validation and acceptance of alternative methods. *Alternatives to Laboratory Animals*. v. 23, p. 211-217, 1995.

EKWALL, B. Overview of the final MEIC results: II. The in vitro/in vivo evaluation, including the selection of a practical battery of cell tests for prediction of acute lethal blood concentrations in humans. *Toxicology in Vitro*. v. 13, pp. 665-673, 1999.

GUBBELS-VAN HAL W. M., BLAAUBOER B.J., BARENTSEN H.M., HOITINK M.A., MEERTS I.A., VAN DER HOEVEN J.C. An alternative approach for the safety evaluation of new and existing chemicals, an exercise in integrated testing. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. v. 42, n. 3, p. 284-95, 2005.

INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS (ICCVAM). *Test Method Protocol for BALB/c 3T3 Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay Phase III*. The National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, 2003.

INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS (ICCVAM), *Report of the International Workshop on In Vitro Methods for Assessing Acute Systemic Toxicity*. NIH Publication No. 01-4499. , National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, 2001.

INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS (ICCVAM), *Guidance Document on Using In Vitro Data to Estimate In Vivo Starting Doses for Acute Toxicity*. NIH Publication No. 01-4500. , National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, 2001.

KRYSIAK, B.; RYDZYNSKI, K. Comparative studies on the usefulness of using a fixed dose and a stepwise method of dosing for evaluating acute chemical toxicity. *Med Pr.*, v.48, n.5, p. 561-78, 1997.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). *Guidelines for the Testing of Chemicals*, OECD 401. Acute Oral Toxicity. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 1987.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). *Guidelines for the Testing of Chemicals*, OECD 402. Acute Dermal Toxicity. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 1987.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). *Guidelines for the Testing of Chemicals*, OECD 403. Acute Inhalation Toxicity. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 1981.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). *Guidelines for the Testing of Chemicals*, OECD 420. Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). *Guidelines for the Testing of Chemicals*, OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). *Guidelines for the Testing of Chemicals*, OECD 425. Acute Oral Toxicity-Modified Up and Down Procedure. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.

PRIETO, P.; BAIRD, A. W.; BLAAUBOER, B. J.; CASTELL RIPOLL, J. V.; CORVI, R.; DEKANT, W.; DIETL, P.; GENNARI, A.; GRIBALDO, L.; GRIFFIN, J. L.; HARTUNG, T.; HEINDEL, J. J.; HOET, P.; JENNINGS, P.; MAROCCHIO, L.; NORABERG, J.; PAZOS, P.; WESTMORELAND, C.; WOLF, A.; WRIGHT, J.; PFALLER, W. The assessment of repeated dose toxicity in vitro: a proposed approach. The report and recommendations of ECVAM workshop 56. *Alternatives to laboratory animals*. v. 34, n. 3, p.315-41, 2006.

PURCHASE, I. F.; BOTHAM, P. A.; BRUNER, L. H.; FLINT, O. P.; FRAZIER, J. M.; STOKES, W. S. Workshop overview: scientific and regulatory challenges for the reduction, refinement, and replacement of animals in toxicity testing. *Toxicological Sciences*. v.43, n.2, p.86-101, 1998.

SPIELMANN, H.; GENSCHOW, M.; LIEBSCH, M.; HALLE, W., Determination of the starting dose for acute oral toxicity (LD50) testing in the up and down procedure (UDP) from cytotoxicity data. *Alternatives to Laboratory Animals*. v. 27, p. 957-966, 1999.

STAMMATI, A.; COMBES, R. D.; SLADOWSKI, D.; VAN DER VALK, J.; BLAAUBOER, B. J. Thirteenth International Workshop on In Vitro Toxicology. *Toxicology In Vitro*. v. 19, n.7, 843-844, 2005.

TREVAN, J. The error of determination of toxicity. *Proceedings of the Royal Society*. v. 101B, p. 483-514, 1927.

VAN DEN HEUVEL, M. J.; CLARK, D. G.; FIELDER, R. J.; KOUNDAKJIAN, P. P.; OLIVER, G. J. A.; PELLING, D.; TOMLINSON, N. J.; WALKER, A. P. The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD50 test. *Food and Chemical Toxicology*. v. 28, p. 469-482, 1990.
y. v. 28, p. 469-482, 1990.