

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE IRRITAÇÃO DA CLOROQUINA ATRAVÉS DO ENSAIO DA MEMBRANA CÓRIOALANTÓIDE DE GALINHAS (HET-CAM)

RIBEIRO, Laerth dos Santos – Laerth85@gmail.com
GOMES, Débora Luciano - Deblucianopvh@gmail.com
SILVA, Minelly Azevedo da - minelly.silva@ifro.edu.br
FERREIRA, Amália dos Santos - amalia.ferreira@fiocruz.br
GOUVEIA, Aurileya de Jesus - aurileya.gouveia@hotmail.com
BRANCO JUNIOR, Arlindo Gonzaga - gonzaga.arlindo@gmail.com
FIALHO, Saara Neri – Professora coorientadora - saara.fialho@fiocruz.br
TELES, Carolina Bioni Garcia – Professora Orientadora - carolina.teles@fiocruz.br

Centro Universitário São Lucas, Porto Velho, Rondônia, Brasil.

*Autor Correspondente: Laerth85@gmail.com

RESUMO

Atualmente animais ainda são utilizados em testes para avaliar a eficiência dos cosméticos, com o intuito determinar o potencial nocivo que uma substância pode desencadear ao entrar em contato com o corpo humano. Diante disso, foram criados órgãos especializados para fiscalizar o uso de animais de experimentação em todo mundo, no Brasil temos o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) que determinou a substituição obrigatória de alguns testes em animais com base no princípio dos 3Rs (redução, substituição e refinamento) até o ano de 2021. Dessa forma surgiram novas metodologias para minimizarem o uso de animais, como o teste proposto por Luepke (1985) e Luepke e Kemper (1986) “*Hen’s Egg Test Chorionallantoic Membrane*” (HET-CAM), que utiliza a membrana córioalantóide de um ovo embrionado de uma galinha para avaliar o potencial de irritação de uma substância, como contrapartida ao teste de Draize considerado padrão ouro, onde aplicava-se substâncias nos olhos do coelho *in vivo* para avaliar a resposta biológica. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo analisar o potencial de irritabilidade da cloroquina em contato com a membrana corioalantóide, pensando em futuras utilizações dermatológicas. O princípio da técnica deu-se pela seleção dos ovos frescos de galinha, pesando entre 50 a 75g, descartando os que apresentaram rachaduras, porosidade ou fungos; os ovos foram mantidos em chocadeira num período de 9-10 dias a 37° C, umidade relativa de 50%-60% e sistema automático de viragem, com o intuito de possibilitar a formação da membrana córioalantóide. Após o período de incubação, no 10° dia os ovos foram separados em 3 grupos: Controle Positivo (hidróxido de sódio NaOH a 0,1 mol/L); Controle Negativo (solução de NaCl 0,9%) e cloroquina, sendo utilizados no ensaio 9 ovos. Os ovos passaram pela ovoscopia com intuito de identificar a câmara de ar delimitando a área que foi quebrada com uma pinça, assim expondo a membrana protetora que foi hidratada com uma solução de NaCl 0,9% para facilitar a remoção sem danificar os vasos sanguíneos da membrana córioalantóide. Em seguida foi adicionado 300 µL de cloroquina sob os vasos sanguíneos deixando em contato por 300 segundos, o teste foi registrado em vídeo a fim de analisar posteriormente os efeitos, o mesmo procedimento foi realizado para os controles positivo e negativo. Após o tratamento, foram examinadas as reações em função do tempo 300 segundos, sendo pontuada conforme as reações observadas na membrana corioalantóide (hemorragia, lise e coagulação), de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo método HET-CAM. As amostras foram classificadas de acordo com a somatória dos efeitos observados na membrana corioalantóide ao decorrer do tempo e atribuída uma nota que varia de 0 (não irritante) a 21 (irritação grave). Ao final do ensaio os ovos contendo os embriões de galinha passaram por eutanásia por hipotermia a - 20 °C, onde estes foram colocados em um envelope zip lock levados para o congelador, de acordo com os preceitos éticos

preconizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). O resultado obtido para o controle negativo foi igual a 0 ou seja não irritante; o controle positivo apresentou (lise, coagulação e Hemorragia) pontuando 19 na escala, ou seja, irritação grave. No ensaio contendo a cloroquina não foram observados indícios de lise, coagulação ou hemorragia, sendo classificada como não irritante. Os ensaios *in vivo* ainda não podem substituir totalmente o teste de irritação ocular de Draize, mas os usos de métodos alternativos combinados são capazes de minimizar o uso de animais de experimentação evitando expor estes a um sofrimento desnecessário. Visto isso, o ensaio HET-CAM demonstra uma alternativa viável para ensaios *in vivo*, tendo como vantagem o baixo custo, simplicidade metodológica e por respeitar os preceitos éticos, sendo que o embrião não possui receptores de dor, as terminações nervosas e sensoriais ainda não estão completas visto que estas ocorrem entre os dias 11 e 14 de incubação. Entretanto, possui limitações em relação às substâncias que podem ser usadas no ensaio, dificultando a avaliação se estas substâncias forem coloridas, viscosas ou pastosas. Por se tratar de um ensaio qualitativo a subjetividade na análise dos resultados também é um fator importante a ser analisado. Diante dos resultados demonstrados, podemos concluir que a cloroquina pode ser considerada segura, pois não foram observados indícios de lise, coagulação ou hemorragia. Logo é necessário realizar estudos quantitativos para confirmar tal hipótese.

Palavras-Chaves: Métodos alternativos. Cloroquina. Ensaio de irritação ocular. HET-CAM.