

Cliente:

RMC INDÚSTRIA BRASILEIRA DE PRODUTOS MÉDICOS EIRELI
Rua Ramira Moreira Silveira nº 239
Amparo - SP, CEP: 13903-340
Telefone: (19) 3808-5224

Executado por:

MEDLAB PRODUTOS DIAGNÓSTICOS LTDA.
Rua Octávio Teixeira Mendes Sobrinho, 35
Vila Santa Catarina – São Paulo – SP
Fone: (011) 5671-7666 – Fax: (011) 5271-7686

RELATÓRIO DE ENSAIO DE SENSIBILIZAÇÃO DÉRMICA PELO MÉTODO DO LINFONODO LOCAL

LLNA

13674-1/2022.0

1. Identificação da amostra¹

Identificação da Amostra:	GEL ANTICONGELANTE		
Lote:	8095	Caracterização da amostra:	Produto para saúde
Data de fabricação:	06/07/2022	Data de validade:	06/07/2025
Composição:	Hidroxietilcelulose, glicerina bidestilada, metilcloroisotiazolinona + metilisotiazolinona, EDTA dissódico, propilenoglicol USP, monoisopropanolamina, corante azul e água.		
Informações adicionais:	Não aplicável		

¹: Informações fornecidas pelo cliente

2. Normas de referência

O ensaio foi conduzido segundo as normas de referência:

- ISO 10993-10: *Tests for skin sensitization*, 2021;
- OECD 442B: *Local lymph node assay: BrDU-ELISA or -FCM*, 2018

3. Declaração da natureza / propósito do ensaio

Sensibilização dérmica é uma reação cutânea imunologicamente mediada a uma substância, caracterizada pela proliferação de linfócitos específicos ao agente sensibilizante. O método do linfonodo local avalia a proliferação de linfócitos nos linfonodos que drenam o local de aplicação da substância, quantificando a resposta imunológica. O presente ensaio tem como objetivo avaliar o potencial sensibilizante da amostra avaliada.

4. Datas

Início da fase experimental:	22/09/2022
Término da fase experimental:	27/09/2022
Ensaio de ELISA:	29/09/2022

5. Sistema teste

Foram utilizados camundongos da linhagem CBA por determinação do método de ensaio.

5.1. Caracterização

Espécie: ***Mus musculus*** (Camundongos)

Linhagem: CBA

Sexo: Fêmeas

Procedência: CEMIB – Unicamp, Campinas/SP

Número: 15 animais, sendo 5 para o grupo controle negativo, 5 para o grupo controle positivo e 5 para o grupo teste.

Data de nascimento: 27/07/2022.

Data de recebimento: 15/09/2022.

Idade no início do ensaio: 8 semanas.

O sistema teste se apresentou saudável, sem alterações clínicas no início da fase experimental.

5.2. Manutenção

O sistema teste foi alojado em caixas específicas para espécie e de acordo com normas e legislações vigentes proporcionando a integridade e o bem-estar animal. Os animais foram aclimatados por no mínimo 5 dias antes do início da fase experimental. O sistema teste foi mantido em sala específica com temperatura média de 17,9°C (mínima 13,9°C e máxima 20,9°C), umidade relativa do ar média de 52,6% (mínima 20,3% e máxima 66,6%) e fotoperíodo 12/12 horas. A alimentação dos animais foi composta de ração convencional para a espécie e água potável.

6. Método de administração e razão de escolha

O extrato da amostra foi aplicado por via tópica, no dorso da orelha do sistema teste, conforme descrito na metodologia.

7. Substância de referência

Como controle positivo, foi utilizada a substância α -hexylcinamaldeído na concentração de 50%, em acetona:azeite (4:1).

8. Preparo da amostra / dose de aplicação

A amostra foi aplicada pura.

Volume de aplicação por animal: 25 μ L em cada orelha, por 3 dias consecutivos.

9. Materiais, equipamentos e reagentes utilizados

Materiais: Frasco com tampa, seringa estéril, agulha estéril, canetas hidrográficas, tesoura, pinça, microtubo, pistilo para microtubo, tubo falcon, frasco schott, filtro de nylon 70 μ m/mesh, ponteira, microplaca de 96 poços.

Equipamentos: Balança semi-analítica, centrífuga de microplaca, agitador magnético, vortex, incubadora shaker, micropipeta, leitor de ELISA, estufa BOD.

Reagentes: Tampão PBS, α -hexylcinamaldeído, Kit Cell Proliferation ELISA BrDU colorimetric, BrdU, acetona, azeite.

10. Desenho experimental

10.1. Aplicações da amostra, pesagem, avaliação clínica e eutanásia

Os animais foram selecionados aleatoriamente e separados em grupos teste, controle positivo e controle negativo. Os animais foram pesados no início e ao término do ensaio. Os animais foram avaliados para ocorrência de sinais clínicos ao longo do período experimental. O tratamento foi realizado da seguinte forma:

- Dia 1: aplicação tópica no dorso da orelha de 25 μ L da amostra, conforme grupo de teste dos animais.
- Dias 2 e 3: repetição do mesmo procedimento do dia 1.
- Dia 4: sem tratamento
- Dia 5: aplicação de 0,5 mL da solução de BrDU (10 mg/mL) por via intraperitoneal em todos os animais.
- Dia 6: pesagem dos animais e realização de eutanásia em câmara de CO₂ aproximadamente 24 horas após a injeção de BrDU.

10.2. Coleta e processamento dos linfonodos

Após a eutanásia, os linfonodos foram cuidadosamente coletados e armazenados em microtubo contendo PBS (1mL) sob refrigeração até o momento do processamento. Os linfonodos foram macerados com auxílio de um pistilo, e essa solução foi filtrada com malha de nylon 70 µm/mesh, com lavagem em mais 14 mL de PBS.

10.3. Ensaio de ELISA

Os tubos contendo a suspensão celular foram homogeneizados, e 100 µL dessa solução foram colocados em triplicata nos poços de uma microplaca de 96 poços previamente identificada. Foram colocados 100 µL de PBS em triplicata como branco da reação. A placa foi centrifugada a 300 G por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e a placa foi incubada a 60°C (±5°C) por aproximadamente 1 hora para secagem do sobrenadante residual. Após essa secagem, foi feita a reação de ELISA com o *Kit Cell Proliferation ELISA BrDU colorimetric*. A leitura foi feita nos comprimentos de onda de 370 nm (emissão) e 492 nm (referência).

10.4. Cálculo do Índice de Estimulação (SI)

A fórmula utilizada para o cálculo do índice de ligação do BrdU foi:

Índice de ligação do BrdU = $(ABS_{em370} - ABS_{psem370}) - (ABS_{ref492} - ABS_{pspre492})$, sendo:

em = comprimento de onda de emissão (370 nm)

ref = comprimento de onda de referência (492 nm)

$$\text{Índice de estimulação (SI)} = \frac{\text{média do índice de ligação de BrdU do grupo teste}}{\text{média do índice de ligação do grupo controle negativo}}$$

A substância é considerada sensibilizante se o índice de estimulação (SI) for $\geq 1,6$, considerando também os índices do grupo controle negativo e positivo.

11. Resultados

11.1. Peso corpóreo (g)

A Tabela 1 mostra o peso inicial, final e variação de peso dos animais dos grupos avaliados.

Tabela 1: Peso inicial, final e variação de peso corpóreo (g)

Grupo	Sistema teste	Peso inicial	Peso final	Varição do peso
Controle Positivo	1	19,33	18,89	-0,44
	2	17,48	17,01	-0,47
	3	20,12	20,47	0,35
	4	17,17	17,08	-0,09
	5	18,03	18,75	0,72
Controle Negativo	1	18,33	19,53	1,20
	2	17,58	19,19	1,61
	3	19,13	18,87	-0,26
	4	19,01	19,95	0,94
	5	18,17	19,99	1,82
Teste	1	17,95	18,03	0,08
	2	19,13	19,21	0,08
	3	20,23	20,92	0,69
	4	17,88	18,11	0,23
	5	20,81	20,33	-0,48

11.2. Avaliações clínicas

A Tabela 2 mostra a avaliação clínica dos sistemas teste. Ao longo do período de observação, os animais do grupo controle positivo apresentaram eritema leve a bem definido. Não foram observadas alterações clínicas para o grupo teste e grupo controle negativo.

Tabela 2: Avaliação clínica dos sistemas teste

Grupo	Sistema teste	Avaliação clínica					
		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6
Controle Positivo	1	0/NA	1/NA	2/NA	2/NA	2/NA	1-9/NA
	2	0/NA	1/NA	2/NA	2/NA	2/NA	1-9/NA
	3	0/NA	1/NA	2/NA	2/NA	2/NA	2/NA
	4	0/NA	1/NA	2/NA	2/NA	2/NA	1-9/NA
	5	0/NA	1/NA	2/NA	2/NA	2/NA	1/NA
Controle Negativo	1	0/NA	0/NA	0/NA	0/NA	0/NA	0/NA
	2	0/NA	0/NA	0/NA	0/NA	0/NA	0/NA
	3	0/NA	0/NA	0/NA	0/NA	0/NA	0/NA
	4	0/NA	0/NA	0/NA	0/NA	0/NA	0/NA
	5	0/NA	0/NA	0/NA	0/NA	0/NA	0/NA
Teste	1	0/NA	0/NA	0/NA	0/NA	0/NA	0/NA
	2	0/NA	0/NA	0/NA	0/NA	0/NA	0/NA
	3	0/NA	0/NA	0/NA	0/NA	0/NA	0/NA
	4	0/NA	0/NA	0/NA	0/NA	0/NA	0/NA
	5	0/NA	0/NA	0/NA	0/NA	0/NA	0/NA

Legenda efeitos locais	Legenda efeitos sistêmicos ou outras alterações	
0 – Sem eritema	1 – morte	6 – tremores
1 – Eritema muito leve (pouco perceptível)	2 – coma	7 – dispneia
2 – Eritema bem definido	3 – convulsão	8 – diarreia
3 – Eritema moderado a severo	4 – prostração	9 – Descamação
4 – Eritema severo (vermelho escuro) até formação de escaras	5 – ataxia	NA – Nenhuma alteração

11.3. Avaliação do aspecto dos linfonodos

A Tabela 3 mostra a avaliação da dimensão dos linfonodos no momento da coleta. Todos os animais do grupo controle positivo apresentaram os linfonodos aumentados. Os animais do grupo teste e os animais do grupo controle apresentaram os linfonodos de tamanho normal.

Tabela 3: Aspecto dos linfonodos no momento da coleta

Grupo	Animal	Tamanho linfonodos
Controle Positivo	1	Aumentado
	2	Aumentado
	3	Aumentado
	4	Aumentado
	5	Aumentado
Controle Negativo	1	Normal
	2	Normal
	3	Normal
	4	Normal
	5	Normal
Teste	1	Normal
	2	Normal
	3	Normal
	4	Normal
	5	Normal

11.4. Índice de estimulação

A Tabela 4 mostra a média de absorvância dos grupos controle negativo, controle positivo e grupo teste. O índice de estimulação calculado para a amostra foi de 1,1.

Tabela 4: Índice de estimulação (SI)

Grupo	Média de absorvância (370 nm – 492 nm)	Índice de estimulação (SI)
Controle Negativo	0,19	1,1 ± 0,04
Controle Positivo	0,34	
Teste	0,21	

* Resultado ± U (U=incerteza expandida)

12. Discussão

Não foram observadas reações sistêmicas ou locais no grupo teste. Ao final do período experimental, alguns animais apresentaram perda de peso corpóreo, porém a perda foi inferior a 10% do peso inicial, e não foi considerada relevante para o ensaio. O índice de estimulação do grupo teste de 1,1, valor inferior ao limite máximo de 1,6 para produtos sensibilizantes.

13. Conclusão

De acordo com o método adotado para a realização do ensaio, a amostra foi considerada não sensibilizante.

Incerteza expandida (U) = ± 0,04.

Para regra de decisão da conclusão o laboratório não utiliza a incerteza de medição na avaliação da conformidade.

14. Armazenamento e retenção

Os dados brutos e registros oriundos a este ensaio serão armazenados no arquivo por um período de cinco anos. A amostra será mantida em retenção por 60 dias e após esse período será descartada.

O resultado desta análise tem significação restrita e se aplica apenas ao item (s) analisado (s).

Este relatório deve ser reproduzido por inteiro. Reprodução de partes deste relatório requer autorização da Medlab.

As informações referentes a caracterização da amostra analisada foram fornecidas pelo cliente juntamente com o envio da amostra.

Este documento foi assinado digitalmente e possui validade jurídica, equivalente a uma assinatura de próprio punho, a validade da assinatura pode ser verificada clicando-se sobre a mesma.