

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**Métodos alternativos ao uso de animais na avaliação toxicológica
de substâncias químicas para fins de registro**

Maryanne Saory Ogasawara

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade
de São Paulo.

Orientador(a):

Prof.(a). Dr(a) Silvia Berlanga de Moraes
Barros

São Paulo

2019

SUMÁRIO

	Pág
Lista de Abreviaturas	1
RESUMO	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. OBJETIVOS.....	5
3. MATERIAL E MÉTODO.....	6
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	7
4.1. Evolução histórica da regulamentação do setor químico.....	7
4.1.2. Estados Unidos.....	10
4.1.3. União Européia.....	17
4.1.4. OECD.....	24
4.1.5. Brasil.....	25
5. CONCLUSÃO.....	26
6. BIBLIOGRAFIA.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
ECHA	<i>European Union Chemicals Agency</i>
ECOPA	<i>European Consensus Platform on Alternatives</i>
ECS	<i>Existing chemical substances</i>
ECVAM	Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos
EDPSB	<i>Endocrine Disruptor Priority-setting Database</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FDCA	<i>Food, Drug, and Cosmetic Act</i>
FIFRA	<i>Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act</i>
FQPA	<i>Food quality protection act</i>
ICCVAM	<i>Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods</i>
ILAR	<i>National Research Council's Institute for Laboratory Animal Resources</i>
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
REACH	<i>Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals</i>
RENAMA	Rede Nacional de Métodos Alternativos
NICEATM	<i>Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods</i>
NNS	<i>New notified substances</i>
NTP	Programa Nacional de Toxicologia

OECD	Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico
QSAR	<i>Quantitative structure-activity relationship models</i>
UE	União Européia
US- DA	United States Department of Agriculture
US-EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
3R	<i>Refinement, reduction and replacement</i>

RESUMO

OGASAWARA, M. S. **Métodos alternativos ao uso de animais para avaliação toxicológica de substâncias químicas para fins de registro.** 2019. no. f. 42. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Palavras-chave: Métodos alternativos, experimentação animal, bioética, regulamentação, toxicologia

Introdução: Defensivos agrícolas, saneantes, medicamentos, alimentos, dentre outros produtos, são avaliados sob o aspecto de segurança segundo dados toxicológicos obtidos, principalmente, por modelos animais. Nesse contexto, modelos animais de experimentação, principalmente mamíferos, têm sido utilizados desde o delineamento da pesquisa até o registro e comercialização dos produtos. Para fins de registro de defensivos agrícolas, os ensaios são requeridos pelas agências regulamentadoras a fim de avaliar os possíveis efeitos nocivos à saúde humana no caso de exposição, bem como os potenciais danos ao meio ambiente. No desenvolvimento de fármacos e agroquímicos estima-se que os custos excedam 100 milhões de euros, e utilizem cerca de 4000 animais durante todo o processo, majoritariamente roedores. O considerável número de animais utilizados para este propósito, a crescente conscientização da população, somados aos avanços técnico-científicos das últimas décadas, têm impulsionado o desenvolvimento de métodos alternativos, tema frequente nas principais discussões no ambiente regulatório nacional e internacional na atualidade. Ao tomar o aparecimento de novas tecnologias como um propulsor no que tange aos métodos alternativos em pesquisa e ensino, considerando a tendência mundial de conscientização sobre a ética e o bem-estar animal, há a necessidade crescente de reformular e modernizar a regulamentação dos produtos. **Objetivos:** Discutir aspectos como evolução histórica da experimentação animal e do setor regulatório, fundamentar os conceitos que sustentam os métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa, bem como avaliar a aceitação de tais metodologias com ênfase em avaliação toxicológica para substâncias químicas, sob a lente regulatória, no Brasil e no mundo. **Material e Métodos:** Revisão de artigos científicos publicados em bancos de dados de relevância, websites de organizações públicas e privadas, bem como legislações nacionais e internacionais, nos últimos 20 anos. **Resultados:** Em suas diferentes trajetórias e abordagens, os países convergem na implementação do conceito dos 3R para minimizar o uso de animais em experimentação. Tal iniciativa fundamenta-se nas tecnologias emergentes para minimizar o uso de animais em experimentação, nos diferentes países, bem como o esforço dos órgãos regulamentadores na aceitação de tais métodos. **Conclusão:** No atual estado da arte, evidencia-se que apesar dos inúmeros avanços e sucessos em relação aos 3R's a nível global, a experimentação animal mantém sua importância para garantir a saúde humana sob a lente regulatória, não sendo possível a substituição completa de estudos com animais.

1. INTRODUÇÃO

Experimentos com animais têm fundamentado o progresso científico desde a antiguidade clássica, época a qual se remontam as primeiras descobertas no campo do conhecimento médico (Regis & Cornelli, 2012). Até onde se tem registro, Hipócrates (450 a.C.), considerado “o pai da medicina”, foi o pioneiro nas investigações utilizando modelos animais. Em seus estudos, Hipócrates foi capaz de correlacionar a aparência de órgãos humanos doentes com os órgãos de animais, para fins didáticos (Marques, 2008; Miziara, et al, 2012).

Nesse mesmo período, cientistas clássicos como Alcmaeon (500 a.C.), Herophilus (330-250 a.C.) e Erasistratus (305-240 a.C.), bem como o importante pensador Aristóteles (384-322 a.C.), realizavam dissecação e vivissecação de animais, com o objetivo de analisar as estruturas internas e formular hipóteses sobre a fisiologia dos órgãos (Miziara, et al, 2012; National Research Council, 1988). Aproximadamente meio século depois, Galeno (129-199 d.C) baseava suas investigações através do exame em macacos, e defendia práticas como a dissecação e vivissecação de animais (Paixão, 2001).

Com o fim da Idade Média, quando o pensamento racional aflorou após um longo período de predomínio do teocentrismo, descobertas ocorreram de forma exponencial nas áreas de medicina, biologia, farmacologia, dentre outras, e grande parte dos avanços se deram graças a estudos em modelos animais (Baumans, 2014; National Research Council, 1988).

Na Idade Moderna, o filósofo francês René Descartes (1596 - 1650), partindo da teoria de que animais são seres desprovidos de pensamento, e que seu sistema biológico poderia ser explicado por termos puramente fisiológicos e mecânicos, impulsionou a comunidade científica da época a realizar investigações em animais sem grandes preocupações éticas (Baumans, 2014).

Ainda neste período, em 1638, o médico britânico William Harvey publicou o que se acredita ser a primeira pesquisa científica conduzida por meio de estudos com animais, intitulada “*Exercitatio anatomica de motu cordis et sanguinis in Animalibus*”. Cerca de 80 diferentes espécies de animais foram utilizadas para investigar a dinâmica da circulação sanguínea, e suas constatações foram de

enorme contribuição para a compreensão da fisiologia do sistema cardiorrespiratório (Marques, 2008; Miziara, et al, 2012).

Em 1865, Claude Bernard, médico e fisiologista francês, conhecido por seu pioneirismo na medicina baseada em evidências, publicou seu livro *“Introdução ao estudo da medicina experimental”*, sistematizando e introduzindo metodologia no delineamento de experimentos biológicos (Baumans, 2014; Marques, 2008; National Research Council, 1988).

Desde então, à medida que a ciência progride, mais animais são utilizados para fins investigativos (Doke; Dhawale, 2015). Ao longo da história, os estudos em animais proporcionaram um acúmulo de conhecimentos sobre biologia, suficientemente robustos para que a extrapolação de informações para seres humanos fosse possível. Nesse racional, inúmeros foram os avanços obtidos com experimentação animal na ciência (Regis & Cornelli, 2012).

Um recente exemplo da importância do estudo com animais foi evidenciado na epidemia de *Zika vírus* no Brasil, em 2013. A partir de estudos com camundongos, verificou-se a correlação da infecção viral com a ocorrência de microcefalia em neonatos, o que permitiu desvendar os mecanismos de patogenicidade do vírus, abrindo as possibilidades para a investigação de potenciais medicamentos (Cugola et al., 2016).

Embora os modelos animais sejam de grande importância para a ciência, questionamentos de caráter ético surgiram, dadas as condições de estresse, sofrimento, e frequentemente, ao sacrifício de animais durante os experimentos, somados ao expressivo número de animais utilizado para este fim (Cazarin; Corrêa; Zambrone, 2004; Mota, 2018).

A primeira legislação a considerar a ética e dignidade animal remete ao século XVII, em 1641, e foi adotada pela corte de Massachusetts no Estados Unidos, e dispunha: “Nenhum homem deverá exercer tirania ou crueldade com quaisquer criaturas que são usualmente mantidas para o uso humano” (National Research Council, 1988). Mais de dois séculos depois, em 1876, a primeira legislação a regulamentar o uso de animais em experimentação surgia na

Inglaterra, através do *British Cruelty to Animal Act*. Anteriormente, em 1822, já havia entrado em vigor a Lei Anticrueldade Animal Inglesa (Mota, 2018).

A partir de então, países começaram a adotar atos contra maus-tratos aos animais, como a Índia em 1960, França, em 1963, e Estados Unidos em 1966 (Doke; Dhawale, 2015). Em 1978, foi proclamada a Declaração Universal dos Direitos dos Animais, pela Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e Cultura (UNESCO), sendo o documento internacional mais importante a garantir a proteção aos animais (Regis & Cornelli, 2012).

Ainda nos dias de hoje, controversa é a opinião pública a respeito de estudos e experimentação envolvendo animais. Se por um lado, existe a demanda de parte da população pelo fim de tais estudos, por outro lado, há a constatação que não existe, atualmente, tecnologias e alternativas capazes de eliminar completamente a necessidade de experimentos com animais na pesquisa e desenvolvimento de medicamentos, praguicidas, saneantes, dentre outros produtos. (Mota, 2018).

No desenvolvimento de praguicidas estima-se que os custos excedam 100 milhões de euros por produto, e que cerca de 4000 animais sejam utilizados durante todo o processo, majoritariamente roedores (van Ravenzwaay, 2013). Os animais de experimentação são utilizados no intuito de predizer os efeitos nocivos que podem se manifestar em decorrência da exposição à determinada substância química, e dessa forma, as informações obtidas são utilizadas para realizar a avaliação toxicológica, que serve de embasamento para a avaliação do risco na tomada de decisão para o registro de um produto. (Cazarin; Corrêa; Zambrone, 2004).

Nesse contexto, os métodos alternativos à experimentação animal surgem como uma proposta conciliadora, que visa preservar a dignidade e bem-estar dos animais de laboratório, sem comprometer o desenvolvimento científico. São designados como quaisquer métodos que substituam a utilização de animais nos experimentos, bem como reduzam e/ou refinem seu uso na pesquisa para os diversos fins científicos, tais como ensino, desenvolvimento de fármacos, praguicidas, saneantes e afins (Freires et al, 2016). Russell e Burch, em 1959,

elaboraram o conceito central dos métodos alternativos, resumido na sigla 3R (sigla do inglês para "*refinement, reduction and replacement*"), significando refinamento, redução e substituição na experimentação com animais (Russel; Burch, 1992; Cazarin; Corrêa; Zambrone, 2004).

Além da defesa do bem estar e dignidade animal, outras razões propulsionam o desenvolvimento de métodos alternativos, tais como o elevado custo para aquisição e manutenção de animais nos laboratórios, a necessidade de profissional capacitado para seu cuidado e manuseio nos experimentos; os protocolos de estudos que geralmente requerem longos períodos para sua conclusão; e finalmente, o fato de que em algumas áreas, os métodos alternativos à experimentação animal são ferramentas de pesquisa mais adequadas, uma vez que os modelos reconstituídos de tecidos humanos são mais fidedignos quanto à resposta biológica, quando comparados a modelos animais (Doke & Dhawale, 2015).

Neste racional, nas últimas décadas, a iniciativa de implementar os métodos alternativos à experimentação animal tomou proporções globais e tem fomentado discussões nas principais autoridades regulamentadoras, como US-EPA (sigla do inglês para *United States Environmental Protection Agency*) e ECHA (sigla do inglês para *European Union Chemicals Agency*) e no setor regulado, compreendendo as indústrias, prestadores de serviço, e laboratórios de pesquisa e ensino; e organizações, como ICH (sigla do inglês para *International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use*), CPCSEA (sigla do inglês para *Committee for Purpose of Control and Supervision on Experiments on Animal*), NIH (*National Institute of Health*), e OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) (Doke & Dhawale, 2015).

O Brasil encontra-se alinhado a esta tendência, e evidencia-se um engajamento no que tange a aceitação de métodos alternativos ao uso de animais em experimentação. Com a publicação da Resolução Normativa Nº 18, de 24 de setembro de 2014, no âmbito do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, foram reconhecidas 17 métodos alternativos

com aceitação regulatória internacional, e ainda, foi definido o prazo de 5 anos para a completa substituição dos métodos convencionais pelos métodos alternativos relacionados na resolução (BRASIL, 2014).

Em suma, o desafio atual dos comitês científicos internacionais, sob a lente regulatória, é integrar as tecnologias emergentes na ciência da exposição e avaliação toxicológica, de modo a agregar confiabilidade nas estimativas de risco utilizadas para dar suporte a tomadas de decisão das agências regulatórias, e paralelamente, reduzir a utilização de animais neste processo.

2. OBJETIVO(S)

A proposta do presente trabalho é discutir o tema metodologias alternativas ao uso de animais no Brasil e no mundo na atualidade, no âmbito regulatório. Ademais, pretende-se abordar aspectos como evolução histórica, desenvolvimento e aceitação de métodos alternativos no ambiente regulatório para substâncias químicas, verificando a importância dos avanços técnico-científicos no desenvolvimento de novos métodos alinhados ao conceito dos 3R's, ou seja, visando reduzir o uso de animais; refinar as técnicas experimentação; e substituir os animais por alternativas tecnológicas ou por animais de ordens inferiores.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho baseou-se na revisão bibliográfica de artigos científicos publicados nos últimos 20 anos sobre o tema métodos alternativos ao uso de animais em experimentação, com ênfase nos aspectos regulatórios. A consulta foi efetuada nas principais bases de dados como Web of knowledge, SciFinder, NCBI, e biblioteca virtual da FAPESP, que apresentaram informações pertinentes ao tema. A pesquisa bibliográfica foi finalizada em 16 de junho de 2019.

A estratégia de pesquisa utilizada foi a busca individual ou em combinação dos termos “métodos alternativos”, “experimentação animal”, “bioética”, “registro”,

“avaliação do risco”, “praguicidas”, “toxicologia”, “3R”, e “novas abordagens”, sendo este último seguido de “experimentação animal” ou “avaliação do risco”. Os correspondentes em inglês dos termos mencionados também foram empregados na consulta.

Adicionalmente, a pesquisa bibliográfica realizou-se em websites das agências US-EPA, ECHA, EFSA, CONCEA, e páginas de websites e revistas científicas de relevância para o tema desenvolvido, como Altex, Revista Pesquisa Fapesp, e Revista Bioética.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Evolução histórica da regulamentação do setor químico

No século passado, em meio ao despontar técnico-científico da revolução industrial, novas substâncias foram desenvolvidas e lançadas no mercado com poucos, ou até mesmo na ausência de estudos toxicológicos (van Ravenzwaay, 2013). Nesse sentido, a regulamentação dos produtos e serviços, ao longo dos anos, se fez necessária para promover segurança ao ser humano quanto consumidor, e estabeleceu normas e requisitos de qualidade, segurança e eficácia para a comercialização e utilização dos produtos.

No passado, o conceito aplicado à pesquisa e desenvolvimento quanto a medidas de segurança se baseava fundamentalmente em limitar a exposição e definir as circunstâncias de uso. Ainda hoje tais parâmetros são válidos e implementados, embora atualmente a avaliação do risco de substâncias seja muito mais complexa. Atualmente, a fim de comprovar a segurança de uma dada molécula com potencial ação praguicida, ensaios de potencial de sensibilização, de mutagenicidade, carcinogenicidade, toxicidade reprodutiva, dentre outros, são exigidos para registro (Foth & Hayes, 2008).

Nesse racional, a avaliação do risco no contexto regulatório é realizada com base em experimentação animal, uma vez que as informações de biologia são

robustas o suficiente para extrapolar tais informações para humanos, permitindo a definição de estimativas de risco e de parâmetros de segurança para seres humanos. No estado atual da arte, os avanços tecnológicos não obtiveram êxito em substituir completamente tais estudos, e ainda não se sabe se futuramente este cenário será possível, no entanto, nos últimos anos, medidas têm sido tomadas no sentido de mitigar o uso de animais na ciência, através dos métodos alternativos ao uso de animais.

O processo necessário para a implementação desta abordagem no contexto regulatório abrange desde o desenvolvimento de novos métodos e tecnologias, a validação, e por fim, a aceitação regulatória. Tratando-se de aceitação regulatória para as novas metodologias alternativas ao uso de modelos animais, é necessária a elaboração de diretrizes de estudo (do inglês “*guidelines*”), que são devidamente avaliadas, validadas e aprovadas pelas autoridades regulatórias. Tais diretrizes, uma vez aceitas internacionalmente, são incorporadas na estratégia regulatória de cada país, por determinação de suas respectivas agências reguladoras (Cazarin; Corrêa; Zambrone,, 2004).

A fim de compreender as perspectivas do tema métodos alternativos à experimentação animal é necessário entender a ciência regulatória e sua evolução ao longo da história em nível internacional. Historicamente, os Estados Unidos e a Europa são reconhecidos como direcionadores do ambiente regulatório, entretanto, possuem diferentes visões, sendo os Estados Unidos mais voltado para uma abordagem de risco, enquanto a Europa apresenta uma conduta mais voltada para o princípio da precaução (Busquet, 2017).

4.1.2. Estados Unidos

Ao remontar a história de uma das agências reguladoras mais influentes na atualidade, a FDA (*Food and Drug Administration*), verifica-se que sua criação foi fortemente influenciada por uma tragédia ocorrida em 1937, cuja principal causa

envolve a ineficiência do sistema regulatório para substâncias presentes no mercado (Krewski et al., 2010).

Com a passagem de uma sociedade essencialmente agrícola para a urbana, houve um aumento de produtos processados, motivo pelo qual as primeiras legislações se referiam a segurança alimentar, considerando que a comercialização de alimentos adulterados e contaminados era muito comum (Gad & Chengelis, 2001).

Em 1906, a promulgação do “*Pure Food and Drugs Act*”, conferiu poder às autoridades sanitárias no sentido de intervir nos casos de alimentos e medicamentos mal rotulados e adulterados. Os casos de adulteração eram investigados apenas “post-facto”, ou seja, após a ocorrência de algum incidente relacionado com o produto (Gad & Chengelis, 2001). Basicamente, a atuação das autoridades sanitárias era restrita a assuntos envolvendo rotulagem inadequada dos produtos no mercado.

Nesse cenário de regulamentação e fiscalização precárias, na cidade de Bristol, no estado norte-americano do Tennessee, a empresa Massengil Company lançou no mercado seu produto denominado “*Elixir da Sulfanilamida*”. Os desdobramentos trágicos de tal acontecimento colocaram em foco a necessidade de uma autoridade regulamentadora sólida, capaz de regular as substâncias químicas no mercado para garantir a segurança à saúde humana (Gad & Chengelis, 2001; Krewski et al., 2010).

Na época, a sulfanilamida era comumente administrada como antibiótico para tratar infecções estreptocócicas, porém, devido ao seu sabor desagradável, era rejeitada, especialmente por crianças. Na tentativa de desenvolver uma formulação mais palatável, a empresa veiculou a sulfanilamida em dietilenoglicol, substância cuja toxicidade levou a morte de ao menos 73 pessoas, sendo na sua maioria, crianças (Gad & Chengelis, 2001; Krewski et al., 2010).

Tendo em vista que elixir, por definição, é um tipo de preparação que contém álcool como veículo, e o produto em questão era diluído em dietilenoglicol, a intervenção do FDA só foi possível devido à inconsistência do rótulo. Caso o

produto fosse rotulado corretamente, de acordo com a lei vigente, o FDA não poderia atuar (Gad & Chengelis, 2001; Krewski et al., 2010).

Frente às consequências trágicas do episódio, o Congresso norte-americano aprovou o “*Food, Drug, and Cosmetic Act*” (FDCA) no ano seguinte, estabelecendo estudos de toxicidade em animais como requisito para a comercialização de produtos (Gad & Chengelis, 2001). A partir de então, especialistas do FDA, academia e indústria, em resposta a necessidade de avaliação toxicológica no desenvolvimento de novas substâncias, estabeleceram os primeiros protocolos de estudos, especialmente entre os anos de 1950 e 1960 (Krewski et al., 2010).

Ao se tratar da regulamentação de praguicidas, foi aprovado pelo congresso norte-americano no ano de 1910, o “*Federal Insecticide Act*”, que atribuía ao Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) a autoridade, ainda que bastante limitada, de regular o uso de inseticidas (Wade, 1985).

Em 1947, devido à necessidade de normas mais rígidas para uso de praguicidas, estabeleceu-se o “*Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act*” (FIFRA), que ainda hoje regulamenta o registro, distribuição, venda e uso de praguicidas (US-EPA, 2018; Gad & Chengelis, 2001; McClintock, Kough & Sjoblad, 1994; Wade, 1985). De acordo com o FIFRA, os praguicidas são definidos como quaisquer substâncias ou misturas que são utilizadas com a finalidade de prevenir, destruir, ou repelir qualquer praga agrícola ou urbana, incluindo também substâncias com a função de desfolhante, dessecante, ou regulador vegetal, bem como estabilizantes de nitrogênio (US-EPA, 2018). Em 1954, uma emenda ao FDCA estabeleceu limites de tolerância de praguicidas presentes em alimentos, sob o âmbito e fiscalização da FDA (Gad & Chengelis, 2001).

Em 1970, com a fundação da agência de proteção ambiental norte-americana US-EPA, o FIFRA foi transferido do domínio do US-DA para a nova agência de proteção ambiental, que ainda nos dias de hoje é a agência responsável pelo registro e fiscalização de atividades como comércio, distribuição e aplicação dos praguicidas (Gad & Chengelis, 2001; Wade, 1985).

Ao longo dos anos, várias emendas foram adicionadas ao FIFRA, com destaque ao “*Food quality protection act*” (FQPA) em 1996, estabelecendo parâmetros mais rígidos para a avaliação do risco na exposição dietária à resíduos de praguicidas presentes em alimentos, bem como direcionou o US-EPA a considerar fontes de exposição não-ocupacionais. Ainda, por meio de uma emenda ao “*Safe Drinking Water Act*” (SDWA), o FQPA determinou o monitoramento de substâncias químicas na água de consumo (Gad & Chengelis, 2001).

Outras delimitações do FQPA incluíam o requerimento de parâmetros para a avaliação da exposição às crianças, considerando-as como um grupo de risco especial, e o desenvolvimento e implementação de um programa de triagem de moléculas com o potencial de atuar como disruptores endócrinos (Krewski et al., 2010; Fenner-Crisp; Maciorowski; Timm, 2000).

As moléculas denominadas disruptores endócrinos têm despertado preocupação no ambiente regulatório. Estas são definidas como substâncias exógenas que possuem a capacidade de alterar a homeostasia do sistema endócrino por diferentes mecanismos, como por exemplo, exercendo ação agonista ou antagonista de hormônios; ligando-se a proteínas transportadoras no sangue ou células; ou também, podendo modificar a produção ou metabolismo de hormônios no organismo (European Commission, 2019).

Tendo em vista o possível impacto à saúde humana e ao meio ambiente relacionado ao uso indiscriminado de tais substâncias, o objetivo principal do programa proposto pelo FQPA foi desenvolver e validar metodologias de triagem com aplicação regulatória (Juberg, 2014).

Os ensaios do programa de triagem de disruptores endócrinos se subdividem em dois níveis, sendo: nível 1, composto por cinco ensaios *in vitro*, quatro ensaios *in vivo* em mamíferos, e dois ensaios *in vivo* em animais não-mamíferos. Os ensaios de nível 2 consistem em cinco testes multi-geração *in vivo*. Resumidamente, os ensaios de nível 1 objetivam identificar substâncias com potencial de interferência no sistema endócrino, nas vias estrogênicas, androgênicas e tireoideanas, enquanto os ensaios de nível 2 buscam estabelecer

uma relação dose/resposta com os efeitos biológicos (Ward, 2012; Fenner-Crisp; Maciorowski; Timm, 2000).

Dentro do escopo de possíveis disruptores endócrinos, constam cerca de 85 mil substâncias, entre praguicidas, cosméticos, aditivos alimentares, e contaminantes. Considerando a inviabilidade de testar todas essas substâncias, foi realizada uma priorização por meio da construção de um banco de dados, denominado *Endocrine Disruptor Priority-setting Database* (EDPSB). Dentre os critérios de priorização incluem-se a disponibilidade de informações em literatura sobre a molécula, volume de produção e condições de exposição (Fenner-Crisp; Maciorowski; Timm, 2000).

Os desafios envolvidos no desenvolvimento do programa de triagem de disruptores endócrinos, e comuns aos estudos toxicológicos de modo geral, se relacionam, principalmente, ao elevado número de moléculas a ser testado, à alta demanda de tempo, de recursos, e da grande quantidade de animais requerida para a condução dos testes. Tal quadro evidenciou a necessidade de novas abordagens científicas para o desenvolvimento de metodologias mais eficazes (Juberg, 2014).

Tendo em vista tal problemática, e predizendo o impacto do surgimento de novas tecnologias em toxicologia, o US-EPA reconheceu a necessidade de reavaliar as estratégias e visões para a avaliação toxicológica de substâncias químicas no país. Assim, o Comitê em Testes Toxicológicos e Avaliação de Agentes Ambientais (do inglês “Committee on Toxicity Testing and Assessment of Environmental Agents”) foi formado em 2004, integrando especialistas de diversas áreas, incluindo: toxicologia do desenvolvimento, toxicologia reprodutiva, neurotoxicologia, imunologia, pediatria e neonatologia, epidemiologia, bioestatística, modelos e métodos *in vitro*, farmacologia, toxicogenômica, oncogênese e avaliação de risco (Krewski et al., 2010).

A proposta do comitê consistiu em fundamentar a avaliação regulatória de uma substância em necessidades práticas, envolvendo fatores como o tipo de utilização da substância e a probabilidade de exposição humana, conduzindo a avaliação toxicológica para refletir as necessidades do manejo do risco. Assim,

objetiva-se a implementação de uma estratégia toxicológica mais preditiva do que observacional. (US-EPA, 2019; NTP, 2004; Krewski et al., 2010).

Os quatro conceitos que direcionaram as ações do comitê foram profundidade, amplitude, bem-estar animal e conservação. A profundidade se refere a busca de informações mais precisas e relevantes para direcionar a identificação dos perigos e avaliação da relação dose-resposta; a amplitude, no sentido de gerar e aproveitar os conhecimentos com uma visão mais ampla em toxicologia; o bem-estar animal, de maneira a buscar alternativas alinhadas ao conceito dos 3R; e por fim, conservação, minimizando gastos de recursos e tempo em revisões regulatórias (Krewski et al., 2010).

Os resultados atingidos pelo comitê foram tão promissores que o US-EPA, o Instituto Nacional de Saúde Norte-Americano (do inglês *National Institute of Health-NIH*), e o FDA se uniram em uma iniciativa conjunta para transformar os estudos toxicológicos no país, intitulada *Toxicologia no Século 21*, abreviada para *Tox21* (do inglês *Toxicity in 21st Century*). As estratégias envolvidas no *Tox21* fundamentam-se no desenvolvimento de uma base robusta de conhecimentos sobre mecanismos e vias fisiológicas, para então entender como as moléculas interferem no funcionamento normal do organismo, e assim, conseguir prever os efeitos nocivos e perigos relacionados à substância (US-EPA, 2019; NTP, 2004; Krewski et al., 2010).

Nesse sentido, modelos computacionais associadas a automatização e robótica, como na triagem de alto desempenho (do inglês “*high-throughput screening*”), podem ser implementados nos estudos toxicológicos, para estabelecer relação dose-efeito quanto a perturbação da homeostasia nos sistemas fisiológicos, em menos tempo e com reduzida utilização de animais quando comparados aos métodos convencionais (Krewski et al., 2010; Juberg, 2014).

Um exemplo é o *Toxicity Forecaster (ToxCast)* do EPA. Lançado em 2007, o programa gera dados e modelos preditivos de substâncias de interesse para o EPA, utilizando triagem de alto desempenho e toxicologia computacional. Cerca

de 10000 moléculas estão sendo testadas para o potencial de disruptor endócrino, e os resultados são utilizados no EDPSB (US-EPA, 2017).

A nova abordagem do EPA referente às tecnologias do século XXI, tem como visão a longo prazo, a substituição dos ensaios de nível 1 pela utilização de modelos computacionais e a triagem de alto desempenho. É importante ressaltar que os ensaios de nível 1 são empregados para determinar o potencial de uma molécula de interagir com o sistema endócrino, e se, conseqüentemente, deve passar para os ensaios de nível 2. Já os resultados dos testes de nível 2 podem ser empregados para a avaliação do risco (Juberg, 2014).

A utilização de modelos animais ainda é necessária pois permite a incorporação de informações farmacocinéticas nos resultados, contemplando os efeitos de absorção, distribuição, metabolização e excreção (ADME) que a substância teste está sujeita, da mesma forma para os seus metabólitos. Ademais, as enzimas envolvidas na biotransformação de xenobióticos varia consideravelmente de entre as espécies. Outro aspecto que confere vantagem aos modelos animais é a possibilidade de verificar a intensidade dos efeitos tóxicos em nível sistêmico (Juberg, 2014; Coecke *et al*, 2006).

Considerando o descrito sobre o programa de disruptores endócrinos, é possível verificar que houve engajamento quanto o conceito dos 3R de Russel & Burch, uma vez que conhecimentos de biologia somados a avanços em robótica, automação, e ciência computacional, permitiram a redução, substituição e refino de estudos com animais. Tal constatação decorre do fato que os conhecimentos sobre as vias endócrinas, informações de relação de estrutura e atividade das moléculas, bem como conhecimento de mecanismos de ação, foram utilizadas para construir modelos computacionais capazes de interpretar dados obtidos de testes automatizados, que utilizam linhagens celulares humanas e parâmetros bioquímicos, em curto tempo, para uma grande quantidade de moléculas (Krewski *et al.*, 2010).

Quanto a aceitação regulatória, esse tipo de abordagem é empregado para suplementar e complementar dados de estudos *in vivo*. Nesse sentido, para aumentar a confiabilidade dos métodos alternativos à experimentação animal,

visando a substituição completa de modelos animais, é necessário haver evidências de validação. A preocupação das agências quanto a validação de métodos *in vitro* gira em torno do metabolismo, já que é muito difícil realizar a modelagens que contemplem a complexidade do metabolismo de um organismo (Coecke et al., 2006).

A coordenação, desenvolvimento e validação de métodos em toxicologia é centralizado, nos Estados Unidos, no Programa Nacional de Toxicologia (NTP), no âmbito do Departamento Nacional de Saúde e Serviços Humanos (HHS), desde sua instituição no ano de 1978. O NTP tem sido fundamental na integração de novas estratégias em estudos toxicológicos no contexto regulatório, dentro do escopo da Tox21. Nesse sentido, a ramificação da NTP centrada no desenvolvimento de métodos alternativos à experimentação animal, o NICEATM, sigla do inglês para *NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods*, têm demonstrado grande êxito na redução, refino e substituição de estudos envolvendo modelos animais (Krewski et al., 2010).

Tratando-se de aceitação regulatória, os métodos desenvolvidos pela NTP são avaliados pela interagência norte-americana responsável pela validação de métodos alternativos, a ICCVAM, sigla do inglês para *The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (Krewski et al., 2010). O comitê é composto por 16 instituições regulatórias e de pesquisa, dentre as quais podemos citar o Instituto Nacional de Proteção Ambiental, a Comissão de Segurança do Consumidor, o FDA, o Instituto Nacional de Saúde, entre outros, que atuam ativamente no direcionamento de decisões regulatórias, tanto dentro dos EUA como em nível internacional. Nesse sentido, o ICCVAM integra o programa de diretrizes da OECD, bem como participa da Cooperação Internacional de Métodos Alternativos (do inglês *International Cooperation on Alternative Test Methods* - ICATM), cujo principal objetivo é promover parcerias internacionais para dialogar sobre o desenvolvimento e avaliação de metodologias alternativas à experimentação animal, visando a harmonização dos métodos. (U.S. Department of Health and Human Services, 2019).

Sob ação conjunta de organizações como o NICEATM, ICCVAM, ECVAM e da OECD, 105 métodos alternativos à experimentação animal são aceitos pelas agências norte-americanas (U.S. Department of Health and Human Services, 2019).

4.1.3. União Europeia

O início da química sintética nos países do continente europeu remonta ao ano de 1860. Porém, foi apenas em meados de 1940 que a indústria química teve seu auge, devido ao surgimento de novas tecnologias que proporcionaram a obtenção de matérias-primas antes obtidas exclusivamente por meio de processos extrativos, como o nitrogênio, que passou a ser sintetizado pela reação de Haber Bocsh; ou benzeno (Foth & Hayes, 2008).

Com o fim da Segunda Guerra Mundial e criação de União Européia (UE), se fez necessária uma regulamentação unificada para a avaliação do risco de substâncias nos 28 países integrantes da UE, considerando o avanço da indústria química e farmacêutica e a necessidade de proteger a saúde humana e o meio ambiente do risco que tal expansão desenfreada poderia ocasionar.

Um marco trágico para a regulamentação de medicamentos, em nível global, se deu na metade do século XX, com a descoberta da talidomida pelo cientista alemão Wilhelm Kunz. O fármaco se tornou reconhecido internacionalmente para tratamento de insônia após a comprovação de seus efeitos sedativos e hipnóticos em 1957, e foi comercializado com ao menos 52 marcas comerciais em todo o globo (Moro, 2017). Os estudos toxicológicos conduzidos na época eram realizados majoritariamente em ratos, raramente em porcos e outros animais. A substância não demonstrou toxicidade, e nem sequer uma dose letal foi estabelecida (Moro, 2017). Os testes para avaliação de teratogenicidade em ratos não mostrou nenhum efeito, porém, mais tarde, descobriu-se de forma desastrosa que fetos humanos eram sensíveis (Kim & Scialli, 2011). Os resultados foram catastróficos: no mundo todo, estima-se que entre dez e quinze mil crianças nasceram com anormalidades relacionadas a

talidomida, sendo que 40% não sobreviveram ao primeiro ano de vida (Moro, 2017).

O elevado risco à saúde humana quando do desconhecimento das propriedades tóxicas das substâncias, evidenciado no desastre da talidomida, colocou em foco a necessidade de uma regulamentação mais consistente e robusta.

Dois anos depois, a diretiva 67/548/EEC, de 27 de junho de 1967, harmonizou os parâmetros para classificação, embalagem, rotulagem de substâncias perigosas. Ainda, no anexo 1 desta diretiva, foram identificados os perigos de cerca de 8000 substâncias, cobrindo desfechos, ou seja, pontos críticos de segurança, relacionados a propriedades físico-químicas, medidas de precaução à saúde e também ambientais (Bobst, 2015).

Emendas importantes foram feitas à diretiva 67/548/EEC, com destaque a sexta emenda, diretiva 79/831/EEC de 1981, e sétima emenda, diretiva 92/32/EEC de 1993. A sexta emenda implementou a distinção regulatória entre substâncias químicas existentes, do inglês “*existing chemical substances*” (ECS), já regulamentadas, e as novas substâncias notificadas, do inglês “*new notified substances* (NNS)”, introduzindo a obrigatoriedade de testar novas substâncias para propriedades perigosas, como explosividade, inflamabilidade, corrosividade, dentre outras, sob parâmetros de Boas Práticas de Laboratório (BPL). A sétima emenda, por sua vez, determinou a avaliação do risco à saúde humana e ao meio ambiente para as NNS (Foth & Hayes, 2008). A diretiva 1999/45/EC surgiu com a finalidade de harmonizar os parâmetros para classificação, embalagem, rotulagem de preparações perigosas (Bobst, 2015).

Ainda em 1993, a regulamentação 793/93/EEC, conhecida como Regulamentação de Substâncias Existentes, do inglês *Existing Substances Regulation* (ESR), introduziu o processo de quatro etapas na avaliação do risco para substâncias que haviam sido reportadas entre os anos de 1971 e 1981, e que por isso, faziam parte do inventário europeu de substâncias conhecidas, o *European Inventory of Existing Commercial Substances* EINECS. As etapas no

processo em questão envolviam a busca de dados, definição de prioridades, avaliação do risco, e redução do risco (Bobst, 2015).

As diretrizes 93/67/EEC, de 20 de julho de 1993, e EC nº 1488/94, de 28 de junho de 1994, definiram os princípios da avaliação do risco para as duas classes de moléculas, NNS e as ECS, respectivamente. As etapas de avaliação do risco são as consideradas ainda na atualidade, que consistem em: (1) identificação do perigo, (2) estabelecimento da relação dose-resposta, (3) caracterização do risco, e (4) definição das condições e vias de exposição a tais substâncias (Bobst, 2015).

Apesar de todas as diretrizes e políticas de segurança a saúde humana, a situação quanto a regulamentação e avaliação de substâncias químicas no mercado europeu era insatisfatória. Em 2002, cerca de 100,000 de substâncias encontravam-se disponíveis no mercado da União Europeia, sendo que quase um terço dessas substâncias eram produzidas em grandes volumes. Informações toxicológicas robustas estavam disponíveis apenas para uma pequena fração dessas substâncias, dificultando a avaliação do risco efetivo relacionado ao uso de tais químicos. Desse quadro de insegurança surgiu a necessidade de uma reforma regulatória (Hengstler et al, 2006).

A regulamentação atual da União Europeia para substâncias químicas é denominada REACH, do inglês *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*, sob diretriz 1907/2006/EC, que foi aprovada em dezembro de 2006. O âmbito da REACH, como explicitado nas palavras que compõem a sua sigla, é o registro, avaliação, autorização, e restrição, se aplicando a todas as substâncias manufaturadas ou importadas para a União Europeia em quantidades maiores que uma tonelada ao ano. (ECHA, 2019; Grindon & Combes, 2008; Williams, Panko & Paustenbach 2009) A ideia da REACH foi implantada em uma reunião informal entre ministros do meio ambiente em 1998, e nessa linha, em 2001, a Comissão Europeia emitiu a *Estratégia para a Futura Política de Substâncias Químicas*, que fundamentou os princípios da REACH (Grindon & Combes, 2008).

Nesse contexto, a REACH representou a consolidação de diretrizes e políticas relacionadas à proteção da saúde humana e do meio ambiente. A REACH adota uma postura baseada no princípio da precaução, sendo mais restritiva quanto a substâncias que apresentam ameaças de danos sérios ou irreversíveis, divergindo da filosofia regulatória norte-americana, que possui uma abordagem mais relacionada com o risco, ou seja, perigo *versus* exposição (Williams, Panko & Paustenbach 2009).

A REACH harmonizou requisitos na avaliação toxicológica das NNS e ECS, e transferiu a responsabilidade de conduzir os estudos e realizar a avaliação toxicológica dos órgãos regulatórios para a indústria (Grindon & Combes, 2008). Nesse sentido, os objetivos principais da REACH são: reunir informações físico-químicas, toxicológicas e ecotoxicológicas para cada substância; estabelecer parâmetros de segurança e manejo seguro de substâncias; determinar o perigo potencial de cada substância na avaliação regulatória; prevenir o uso de substâncias avaliadas como perigosas, e sem aprovação da ECHA; e restringir o uso de químicos para os quais não foi possível estabelecer parâmetros de uso seguro (Williams, Panko & Paustenbach 2009).

Tendo em vista a abordagem precaucionária da REACH, em uma estimativa realizada em 2003 pelo Instituto de Saúde e Proteção ao Consumidor do Centro de Pesquisa da Comissão Europeia, a adoção do novo sistema regulatório acarretaria no aumento do gasto com testes adicionais, de 1143 a 2274 milhões de euros e de 2.1 a 3.9 milhões de animais para a indústria (Grindon & Combes, 2008). Nos primeiros 15 anos, estima-se que o uso de animais de experimentação, majoritariamente ratos e camundongos, seria de aproximadamente 7,5 a 45 milhões de animais (Hengstler et al, 2006).

Nesse cenário, considerando o elevado número de animais que seriam utilizados em estudos para atender os requisitos da REACH, preocupações sobre ética em experimentação animal ganharam força. A ECOPA (European Consensus Platform on Alternatives), uma organização não-governamental constituída por cientistas, levantou o questionamento sobre o substancial aumento de experimentação animal que resultaria da nova regulação, e apontou o

desenvolvimento de metodologias que não utilizem modelos animais como uma alternativa para tal impasse (Höfer, 2004).

Com a crescente mobilização, a REACH adotou o seguinte princípio: a utilização de animais em experimentação deverá ser o último recurso, apenas na ausência de outros métodos cientificamente confiáveis para avaliar os potenciais efeitos nocivos de substâncias para humanos e meio ambiente (ECHA, 2017).

A validação de métodos alternativos à experimentação animal na Europa é responsabilidade do Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos (ECVAM), como determinado pela diretiva 2010/63/EU, em vigor desde 22 de setembro de 2010, que atualiza a diretiva 86/609/EEC, sobre a proteção de animais utilizados com fins científicos. A diretiva em questão é fortemente fundamentada no conceito de 3R, e dentro de seu escopo estão fetos de mamíferos no último trimestre de gestação e cefalópodes, bem como animais utilizados em ensino básico. Além disso, estabelece parâmetros e condições mínimas para a acomodação e cuidado dos animais em pesquisa (European Commission, 2019).

Conforme o 2º relatório da ECHA sobre o Uso de Métodos Alternativos à Experimentação Animal sob a REACH, publicado em 2014, são três as maiores estratégias para a evitar a condução de experimentação animal desnecessária, sendo elas: compartilhamento de dados e submissão conjunta; utilização do método de agrupamento de substâncias e comparação por interpolação ou a ponderação da suficiência da prova; e comunicação mais próxima com os registrantes (ECHA, 2014).

Dentro da legislação da REACH, os registrantes são obrigados a compartilhar dados obtidos em estudos conduzidos em vertebrados, e por vezes em invertebrados, e adicionalmente, os interessados em registrar a mesma molécula devem colaborar e compartilhar informações para uma submissão conjunta. Estrategicamente, tal prática assegura que não haja condução de estudos em animais que gerem informações redundantes e desnecessárias (ECHA, 2017).

O método comparativo por interpolação e agrupamento de substâncias têm sido o método alternativo à experimentação animal mais utilizado pelas empresas registrantes no âmbito de registro. Este método utiliza informação relevante de substâncias análogas para prever as propriedades de substâncias de estudo, agrupando substâncias sob critério de similaridade (ECHA, 2019). Já a abordagem de ponderação da suficiência da prova emprega uma combinação de informações de diversas fontes independentes, para originar elementos de prova suficientemente robustos a fim de cumprir determinado requisito de informação (ECHA, 2019).

A comunicação mais próxima e transparência nas tomadas de decisões têm sido uma estratégia efetiva. As empresas registrantes tem espaço para propor junto à ECHA estratégias e métodos para minimizar a utilização de animais em seus processos de desenvolvimento e registro. Tais propostas vão para consulta pública, permitindo à interação de diversos setores da sociedade, com destaque à ONG's defensoras dos animais, outras empresas e pessoas comuns (ECHA, 2014).

A ideia de desenvolver modelos computacionais para auxiliar na avaliação toxicológica de substâncias acompanhou a ECHA desde 2007. Nesse sentido, em parceria com a OECD, a ECHA desenvolveu um software baseado em QSAR, ou seja, estudo da relação quantitativa da estrutura-atividade de moléculas, denominado QSAR Toolbox. O software possui funcionalidades que incluem a geração de informações sobre o perigo de determinada substância, integrando cerca de 60 bancos de dados, sendo possível simular o metabolismo e as propriedades produtos químicos (ECHA, 2014).

No 2º relatório de Uso de Métodos Alternativos à Experimentação Animal sob a REACH, de 2014, a ECHA levantou que o número de dossiês de registro submetidos aumentou de 24.560 dossiês para 4.599 substâncias, em 2011, para 38.711 dossiês para 8.729 substâncias, em 2013, ou seja, um aumento de cerca de 57% no número de submissões. Tal aumento pode ter sido atribuído ao vencimento do prazo dado pela REACH para registro de substâncias produzidas ou importadas em quantidades entre 100 e 1000 toneladas/ano (ECHA, 2014).

No que tange a aplicação de métodos alternativos à experimentação animal nos pleitos de registro desse período, a estratégia mais utilizada foi o método comparativo por interpolação, seguido do método ponderação da suficiência da prova, e por último, por QSAR, um modelo de relação estrutura-atividade quantitativa (ECHA, 2014).

Para o relatório publicado em 2017, à ECHA afirma que as estratégias para minimizar a utilização de animais em pesquisa, descritas no relatório anterior, têm obtido êxito em seu propósito. O compartilhamento de dados e submissão conjunta têm evitado a condução de estudos desnecessários, e foi evidenciado o uso extensivo de abordagens alternativas à experimentação animal pelo setor registrante, tais como o método comparativo por interpolação, a ponderação de suficiência de prova, métodos *in vitro* e *in chemico* e modelagem computacional (ECHA, 2017).

Os dados publicados pela ECHA foram promissores, e revelam que dentre as 6.290 substâncias analisadas no período reportado (de 2014 a 2017), com relação à desfechos (*endpoints*) em animais vertebrados: 89% utilizaram justificativas ou adaptações substituindo a condução de estudos; 63% utilizam ao menos uma adaptação por emprego de método comparativo por interpolação; 43% contém ao menos um argumento de ponderação de suficiência de prova; e 34% possuem ao menos uma predição com base em relação estrutura-atividade QSAR (ECHA, 2017).

No meio regulatório da UE, os registrantes já preferem abordagens alternativas à experimentação animal se tratando de estudos de corrosão e irritação dermal, e irritação ocular, uma vez que 56% dos estudos para esses desfechos foram *in vitro* (ECHA, 2017).

No entanto, a ECHA apontou problemas relacionados à confiabilidade e qualidade das informações submetidas utilizando abordagens alternativas, como por exemplo no caso do método comparativo por interpolação. Como solução para tal problemática, a autoridade exige informações complementares ao registrante para adequação do pleito de registro. Outra medida tomada é à publicação de manuais e seminários online sobre as estratégias, para ajudar os registrantes a

aplicar corretamente os métodos alternativos à experimentação animal em seus processos (ECHA, 2017).

4.1.4. OECD

A Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) é um órgão formado de cooperação entre governos de 36 países, para desenvolver políticas e soluções para os desafios econômicos, sociais e ambientais no contexto da globalização. O fórum abre espaço para o compartilhamento de experiências políticas, para a discussão de problemas comuns aos países, para a identificação e definição de políticas e padrões internacionais em várias atividades econômicas (OECD, 2019; Krewski et al., 2010).

O surgimento da OECD se deu no contexto do pós-guerra. A Organização Européia de Cooperação Econômica (OEEC) se estabeleceu em 1948, para conduzir o Plano Marshall, financiado pelos Estados Unidos, em prol da reconstrução dois países devastados no pós-guerra. Nesse sentido, ao reconhecer a interdependência da economia dos países, a ideia de cooperação foi implementada (OECD, 2019; Krewski et al., 2010).

O Canadá e os Estados Unidos se uniram aos membros da OEEC, culminando na criação da OECD, em 30 de setembro de 1961. Posteriormente, outros países aderiram, iniciando com o Japão em 1964. Atualmente, 36 países constituem a OECD, sendo que existem países como Brasil e China, que não são membros, mas sim parceiros-chave da OECD. Como parceiro-chave, o Brasil pode participar e atuar dentro da OECD, porém de forma mais limitada do que um país membro (OECD, 2019; Mattke, Epstein & Leatherman, 2006).

A OECD desempenha papel fundamental no desenvolvimento e validação de diretrizes de avaliação toxicológica internacionalmente aceitas. Um dos conceitos-chave é a harmonização, que busca reduzir a redundância dos testes e diretrizes para avaliação toxicológica de substâncias químicas. A OECD também define os testes necessários para os conhecimentos toxicológicos mínimos para uma dada molécula. (Krewski et al., 2010). Diretrizes da OECD utilizando metodologias *in vitro* já estão disponíveis para corrosão e irritação ocular e dermal,

sensibilização cutânea, genotoxicidade e para disruptores endócrinos (OECD, 2019).

Nesse sentido, a OECD, desenvolveu a Abordagem Integrada para Testes e Avaliação, do inglês “Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA)”, definido como uma abordagem sistemática e pragmática, baseada na análise integrada de dados científicos existentes e também na geração novas informações utilizando estratégias modernas, como QSAR, métodos *in chemico* e *in vitro*, e tecnologias ômicas (metabolômica, proteômica, toxicogenômica, etc.) (European Commission, 2019; OECD, 2019).

Adicionalmente, a OECD aposta na aplicação do conceito do *Adverse Outcome Pathway (AOP)*, que se baseia no mapeamento da cadeia de eventos moleculares que ocorrem após a exposição a substância, o gatilho molecular, nos diferentes níveis de complexidade, ou seja, mensurar os desencadeamentos moleculares nas células, tecidos, órgãos, organismo, e finalmente, em nível de população. Dessa forma, a ideia seria integrar a abordagem de AOP à ferramentas como a triagem de alto desempenho (HTS), agregando confiabilidade, de modo que possa servir para a tomada de decisão-regulatória em nível mundial (OECD, 2019).

4.1.5. Brasil

No Brasil, a Agência Nacional De Vigilância Sanitária - Anvisa foi instaurada pela lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. A Anvisa é uma autarquia sob regime especial, caracterizado por sua autonomia administrativa. O objetivo da Anvisa é promover a saúde da população, através da regulamentação dos produtos no mercado, controle sanitário de estabelecimentos e processos submetidos à vigilância sanitária, e inclusive o controle de portos, aeroportos e recintos alfandegários (BRASIL, 1999; Anvisa, 2019).

No que se refere à utilização de animais em pesquisa, observa-se um considerável atraso do Brasil quanto às discussões sobre o tema ao redor do globo. Apenas em 2008 foi promulgada a Lei 11.794/2008, de 8 de abril de 2008,

que regulamenta o uso científico de animais no Brasil. Conhecida como Lei Arouca, em homenagem ao sanitarista Sérgio Arouca, é considerada como o marco regulatório para a experimentação animal em pesquisa, regulamentando o inciso VII do § 1º do artigo 225 da Constituição Federal (BRASIL, 2008; Regis & Cornelli, 2012).

Paralelamente, foi criado o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, no âmbito do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações – MCTIC, instância colegiada multidisciplinar responsável por normatizar o uso de animais em ensino e pesquisa científica (BRASIL, 2009).

Na legislação brasileira, segundo o Decreto 6.899/09, de 15 de julho de 2009, que regulamenta a Lei 11.794/2008, os métodos alternativos à experimentação animal são definidos como “procedimentos validados e internacionalmente aceitos que garantam resultados semelhantes e com reprodutibilidade para atingir, sempre que possível, a mesma meta dos procedimentos substituídos por metodologias que: não utilizem animais; usem espécies de ordens inferiores; empreguem menor número de animais; utilizem sistemas orgânicos *ex vivos*; ou diminuam ou eliminem o desconforto.” (BRASIL, 2009).

Nesse contexto, laboratórios oficiais, universidades e setores da indústria começaram a desenvolver metodologias alternativas ao uso de animais em experimentação. Os estudos eram conduzidos de forma dispersa, evidenciando a necessidade de uma instituição que centralizasse as discussões sobre o tema, de forma a validar os métodos desenvolvidos. Embora os procedimentos internacionalmente aceitos fossem considerados validados no Brasil, existiam necessidades específicas do país que não eram contempladas nessas diretrizes. Ademais, a Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003, que publica a Diretriz para a Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, falhava em definir a cadeia completa em validação e as instituições responsáveis por cada etapa (BRASIL, 2003; Presgrave et al, 2010).

Em 2005, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) organizou o Encontro sobre Métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa, onde problemas em relação à validação de métodos alternativos e dificuldades no financiamento quanto ao desenvolvimento de tais estudos foram levantados (Presgrave et al, 2010). Em 2008, foi idealizada o BracVam, sigla para *Brazilian Center for Validation of Alternative Methods*, e publicada na revista *Alternatives to Laboratory Animals – ATLA*. A iniciativa recebeu apoio da comunidade científica nacional e internacional, sendo viabilizada pela Portaria nº 491, de 3 de julho de 2012, juntamente com a criação da Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA). (BRASIL, 2012; Presgrave et al, 2008).

A Resolução Normativa nº 17, de 3 de julho de 2014, do CONCEA, determinou os parâmetros para a aceitação de métodos alternativos ao uso de animais em ensino e pesquisa no Brasil. Nessa resolução, os métodos alternativos reconhecidos, ou seja, aceitos do ponto de vista regulatório, são métodos considerados relevantes e confiáveis para avaliar determinado parâmetro toxicológico, que passaram por etapas de desenvolvimento, pré-validação, validação e revisão por especialistas, e avaliados pelos Centros para Validação de Métodos Alternativos, sendo o BracVam o centro de validação nacional (BRASIL, 2014).

Nesse sentido, o CONCEA estabeleceu, por meio da Resolução Normativa nº17, de 3 de julho de 2014, os critérios para o reconhecimento dos métodos alternativos à experimentação animal em ensino e pesquisa no território nacional. Meses depois, através da Resolução nº 18, de 24 de setembro de 2014, foram relacionados os 17 métodos validados, e ainda, estabeleceu-se o prazo de 5 anos como limite para a substituição obrigatória do método original pelo método alternativo (BRASIL, 2014).

Em consonância pela crescente conscientização popular sobre o tema, a Anvisa publicou a RDC nº 35, de 07 de agosto de 2015, que trata da aceitação para fins regulatórios de metodologias alternativas à experimentação animal. A resolução dispõe que quaisquer metodologias reconhecidas pelo CONCEA são aceitas nas petições submetidas à Anvisa. São reconhecidos, atualmente, 17

métodos alternativos (BRASIL, 2015). Entretanto, o parágrafo único da resolução indica que “Excetuam-se do previsto no caput deste artigo os casos específicos em que a Anvisa, mediante justificativa técnica devidamente fundamentada, apresente a inadequação e inaplicabilidade dos métodos reconhecidos pelo Conceca”. Esta redação sinaliza para a análise caso a caso, em situações que a Agência entender que, embora seja apresentado um método validado e aceito pelo CONCECA, o mesmo não atende aos requisitos da petição, se resguardando o direito de solicitar estudos complementares, quando aplicável.

As dificuldades na implementação de métodos alternativos à experimentação animal são diversas. Como exemplo, podemos citar o Método “OECD TG 431 - Corrosão dérmica in vitro: Teste da Epiderme Humana Reconstituída” (OECD, 2016). No Brasil, segundo o artigo 199 da Constituição Federal, fica vedada a comercialização de tecidos humanos, conforme descrito no § 4º:

A lei disporá sobre as condições e os requisitos que facilitem a remoção de órgãos, tecidos e substâncias humanas para fins de transplante, pesquisa e tratamento, bem como a coleta, processamento e transfusão de sangue e seus derivados, sendo vedado todo tipo de comercialização.

Tendo em vista que o estudo é conduzido em epiderme humana reconstituída, obtida a partir de queratinócitos epidérmicos humanos não-transformados, e a comercialização pele humana é proibida por lei, não há legislação clara para a distribuição de pele humana no Brasil, constituindo entrave quanto a implementação do testes OECD TG 431 no país.

Dessa forma, este insumo é obtido majoritariamente através de doações de material provindos de clínicas de procedimentos cirúrgicos com consentimento dos doadores e com avaliação de comitês de ética, tanto para pesquisa de novos métodos mais refinados (Pedrosa et al, 2017; Vasconcelos, 2016), como para a

prestação de serviços para a condução dos testes para avaliação toxicológica de xenobióticos com diversos fins, para o desenvolvimento de praguicidas, cosméticos e medicamentos.

Adicionalmente, outro aspecto que configura um entrave em relação ao uso de métodos alternativos para a avaliação de corrosividade e irritação dermal no Brasil incluem dificuldades alfandegárias que, na prática, impossibilitam a importação de kits já validados na Europa pelo ECVAM, como EpiDerm™ Skin Corrosivity Test, and EpiSkin™ Standard Model (Catarino et al, 2018; Pedrosa et al, 2017; Vasconcelos, 2016).

Apesar dos entraves anteriormente mencionados, muito se têm feito em prol dos métodos alternativos ao uso de animais no país. Ainda tratando-se de estudos em pele humana reconstituída, a fim de ilustrar os avanços realizados na pesquisa no sentido de contemplar o desenvolvimento de modelos *in vitro* mais fidedignos, podemos mencionar o “*full thickness skin model*”, desenvolvido com participação de pesquisadores da Universidade de São Paulo. O método busca adicionar um nível de complexidade ao OECD TG 431 - Teste de Epiderme Humana Reconstituída (OECD, 2016), promovendo maior similaridade com a pele humana natural. O método atende aos requisitos estabelecidos pela OECD no controle de qualidade, constantes no documento ENV/JM/MONO(2015)27 (Pedrosa et al, 2017), e uma análise comparativa entre o novo modelo e o previamente validado pela OECD, demonstrou que o “*full thickness skin model*” melhorou propriedades relacionados a barreira dermal quando comparado com o teste convencional (Catarino et al, 2018).

5. CONCLUSÃO(ÕES)

Neste trabalho foi possível verificar que as autoridades reguladoras da saúde em nível global, como EPA e ECHA, em suas diferentes visões e trajetórias, estão alinhados quanto ao estímulo ao desenvolvimento de novas metodologias consonantes com os 3R no âmbito da avaliação toxicológica. Os avanços técnico-científicos das últimas décadas, como a triagem de alto desempenho, ciências

ômicas, e modelagem computacional estão sendo utilizados para desenvolver novas ferramentas para dar suporte às decisões regulatórias em toxicologia.

Vale ressaltar ainda que, por meio da atuação de comitês internacionais na OECD, discussões são levantadas e avanços relacionados a metodologias alternativas à experimentação animal são obtidos em nível global, servindo como modelo para países ao redor do globo, incluindo o Brasil.

No Brasil, observa-se um atraso em relação ao tema quando comparado aos países anteriormente mencionados, sendo que o país assume mais a postura de expectador, implementando as diretrizes desenvolvidas internacionalmente. As dificuldades são estruturais e amplas, e em contrapartida, muito se têm feito em universidades públicas no sentido de desenvolver novos métodos dentro do país.

No atual estado da arte, os desafios no desenvolvimento de tais metodologias incluem: manter as funções fisiológicas normais do tecido quando *in vitro*; manter o sistema biológico artificial estável; o teste de misturas, que envolve uma rede mais complexa de vias metabólicas e enzimas; e ainda, mimetizar os efeitos de ADME e farmacocinéticos nos métodos sem o uso de animais como cobaias.

Nesse sentido, reconhecendo que os modelos animais ainda são importantes na proteção da saúde humana e avaliação do risco, surge como estratégia a aplicação do conceito dos 3R no que tange aos modelos animais em experimentação, de modo a ser mais assertivo na condução dos testes, sem deixar de impulsionar o desenvolvimento de métodos mais fidedignos ao organismo humano com base nas tecnologias emergentes. Além disso, nota-se uma evidente necessidade de reformular e aprimorar a legislação brasileira nesse tema, que apresenta ainda muitos entraves e pontos de melhoria.

6. BIBLIOGRAFIA

1. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Institucional**. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/institucional>> Acesso em 22 mai. 2019

2. BRASIL. [Constituição (1988)]. Artigo 199. **Constituição da República Federativa do Brasil**. Presidência da República. Brasília, DF. Disponível em:
<https://www.senado.leg.br/atividade/const/con1988/CON1988_05.10.1988/art_199_.asp> Acesso em 04 jun 2019
3. BRASIL. Decreto n.6.899 de 15 de julho de 2009. Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria-Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais - CIUCA, mediante a regulamentação da Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Seção I, p.1. de 16 de julho de 2009. Disponível em <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Ato2007-2010/2009/Decreto/D6899.htm> Acesso em 22 mai.2019
4. BRASIL. Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Seção I, p.1., 9 de outubro de 2008. Brasília, DF. Disponível em <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Ato2007-2010/2008/Lei/L11794.htm> Acesso em 22 mai.2019
5. BRASIL. Lei 9.782/1999 (Lei Ordinária), de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional De Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial**, de 27 de janeiro de 1999. p. 1, Brasília, DF.
6. BRASIL. Portaria Nº 491, de 3 de julho de 2012. Institui a Rede Nacional de Métodos Alternativos - Renama e sua estrutura no âmbito do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI, que será supervisionada por um Conselho Diretor. **Diário Oficial da União**, nº 129 de 05 de julho de 2012, Seção 1, p. 19, Brasília, DF.

7. BRASIL. Resolução Normativa nº 17, de 3 de julho de 2014. Dispõe sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, nº 126, de 04 de julho de 2014. Seção 1, p. 51, Brasília DF
8. BRASIL. Resolução Normativa nº 18, de 24 de setembro de 2014. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil, nos termos da Resolução Normativa nº 17, de 03 de julho de 2014, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Nº 185, 25 de setembro de 2014. Seção I, p.9. Brasília, DF.
9. BRASIL. Resolução RDC Nº. 35, de 07 de agosto de 2015. Dispõe sobre a aceitação dos métodos alternativos de experimentação animal reconhecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - Concea. **Diário Oficial da União**, nº 151 de 10 de agosto de 2015, Seção I, p. 44. Brasília, DF
10. BRASIL. Resolução RE Nº. 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". **Diário Oficial da União**, nº 104 de 02 de junho de 2003, Seção I, p. 56-59. Brasília, DF
11. BAUMANS, V. Use of animals in experimental research: an ethical dilemma?. **Gene Therapy**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.64-66, 29 set. 2004. Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302371>
12. BUSQUET, Francois. Corrigendum to The need for strategic development of safety sciences. **Altex**, [s.l.], p.316-316, 2017. ALTEX Edition. <http://dx.doi.org/10.14573/altex.1703281>
13. CAZARIN, Karen Cristine Ceroni; CORRÊA, Cristiana Leslie; ZAMBRONE, Flávio Ailton Duque. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [s.l.], v. 40, n. 3, p.289-299, set. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-93322004000300004>.

14. COECKE Sandra, *et al.* (2006). Metabolism: A bottleneck in in vitro toxicological test development. **ATLA**. v34: p.49–84. Jan 2006
15. CUGOLA, Fernanda R. *et al.* The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, [s.l.], v. 534, n. 7606, p.267-271, 11 maio 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature18296>.
16. DOKE, Sonali K.; DHAWALE, Shashikant C.. Alternatives to animal testing: A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s.l.], v. 23, n. 3, p.223-229, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2013.11.002>.
17. ESKES, Chantra, *et al.* (2009). Proposal for a Brazilian Centre on Alternative test Methods. **ALTEX** 26, 295-298.
18. European Chemicals Agency. **Agrupamento de substâncias e métodos comparativos por interpolação.** Disponível em: <<https://echa.europa.eu/pt/support/registration/how-to-avoid-unnecessary-testing-on-animals/grouping-of-substances-and-read-across>>. Acesso em: 08 jun. 2019.
19. European Chemicals Agency. The Use of Alternatives to Testing on Animals for the REACH Regulation. **Second report under Article 117(3) of the REACH Regulation.** Helsinki, Finland, v. 2, n. -14-07, p.24-68, 2 jun. 2014.
20. European Commission. **Legislation for the protection of animals used for scientific purposes.** Disponível em: <https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm>. Acesso em: 07 jun. 2019.
21. European Commission. **IATA - Integrated Approaches to Testing and Assessment.** Disponível em: <<https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/ecvam/alternative-methods-toxicity-testing/iata>>. Acesso em: 12 jun. 2019.
22. European Commission. **What are endocrine disruptors?** (2019). Disponível em: <https://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/definitions/endo_dis_en.htm>. Acesso em: 16 jun. 2019.

23. FENNER-CRISP, Penelope A.; MACIOROWSKI, Anthony F.; TIMM, Gary E.. The Endocrine Disruptor Screening Program Developed by the U.S. Environmental Protection Agency. **Ecotoxicology**, [s.l.], v. 9, n. 1/2, p.85-91, 2000. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1008972330318>
24. FOTH, H; HAYES, Aw. Background of REACH in EU regulations on evaluation of chemicals. **Human & Experimental Toxicology**, [s.l.], v. 27, n. 6, p.443-461, jun. 2008. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/0960327108092296>.
25. FREIRES, Irlan Almeida et al. Alternative Animal and Non-Animal Models for Drug Discovery and Development: Bonus or Burden?. **Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 34, n. 4, p.681-686, 17 nov. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-016-2069-z>
26. GAD SC, CHENGELIS CP. Agricultural chemicals: regulation, risk assessment, and risk management. **Regulatory toxicology**. London: Taylor & Francis; 2001. pp. 215–244
27. GOVERNO DO BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. **Concea reconhece 17 métodos alternativos ao uso de animais. Educação & Ciência, 23 de dezembro de 2017. Disponível em <<http://www.brasil.gov.br/noticias/educacao-e-ciencia/2014/09/concea-reconhece-17-metodos-alternativos-ao-uso-de-animais>> Acesso em: 25 jan 2019**
28. GRINDON, Christina; COMBES, Robert. Introduction to the EU REACH Legislation. **Alternatives to Laboratory Animals**, [s.l.], v. 36, n. 1, p.1-6, out. 2008. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/026119290803601s02>.
29. HENGSTLER, Jan G. et al. The REACH concept and its impact on toxicological sciences. **Toxicology**, [s.l.], v. 220, n. 2-3, p.232-239, mar. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2005.12.005>
30. KIM, James H.; SCIALLI, Anthony R. Thalidomide: The Tragedy of Birth Defects and the Effective Treatment of Disease. **Toxicological Sciences**,


- [s.l.], v. 122, n. 1, p.1-6, 19 abr. 2011. Oxford University Press (OUP).
<http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfr088>
31. KREWSKI, Daniel et al. Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, [s.l.], v. 13, n. 2-4, p.51-138, 17 jun. 2010. Informa UK Limited.
<http://dx.doi.org/10.1080/10937404.2010.483176>
32. JUBERG, Daland R. et al. Lessons learned, challenges, and opportunities: The U.S. Endocrine Disruptor Screening Program. **Altex**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.63-78, 2014. ALTEX Edition. <http://dx.doi.org/10.14573/altex.1309171>.
33. MARQUES, Fabrício. **Sem eles não há avanço**: Experiências com animais seguem imprescindíveis, ao contrário do que dizem ativistas. Edição 144 fev. 2008. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/2008/02/01/sem-eles-nao-ha-avanco/>> Acesso em: 01 maio 2019.
34. MATTKE, Soeren; EPSTEIN, Arnold M.; LEATHERMAN, Sheila. The OECD Health Care Quality Indicators Project: history and background. **International Journal For Quality In Health Care**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.1-4, 1 set. 2006. Oxford University Press (OUP).
<http://dx.doi.org/10.1093/intqhc/mzl019>
35. MCCLINTOCK, J.t.; KOUGH, J.I.; SJOBLAD, R.d.. Regulatory Oversight of Biochemical Pesticides by the U.S. Environmental Protection Agency: Health Effects Considerations. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.115-124, fev. 1994. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1006/rtp.1994.1010>.
36. MIZIARA, Ivan Dieb et al. Ética da pesquisa em modelos animais. **Brazilian Journal Of Otorhinolaryngology**, [s.l.], v. 78, n. 2, p.128-131, abr. 2012. UNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1808-86942012000200020>.
37. MOTA, K. A. G. **Experimentação Animal no Brasil: uma abordagem normativa acerca da criação, manutenção e pesquisa com animais**. Dissertação (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. São Paulo, 2018

38. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. 2017. **Using 21st Century Science to Improve Risk-Related Evaluations.** Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/24635>.
39. National Research Council: **Use of laboratory animals in biomedical and behavioral research.** 1988, Washington D.C.: National Academy Press
40. National Toxicology Program. The NTP vision: Toxicology in the 21st century: The role of the National Toxicology Program. National Toxicology Program, National Institute for Environmental Health Sciences; Research Triangle Park, NC: 2004. Disponível em: <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/main_pages/NTPVision.pdf> Acesso 11 jun.2019
41. OECD. **Brazil and the OECD.** Disponível em: <<http://www.oecd.org/brazil/brazil-and-oecd.htm>> Acesso em: 12 jun. 2019.
42. OECD. Guidance Document for the Use of Adverse Outcome Pathways in Developing Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA). **Series On Testing & Assessment, Paris**, n. 260, p.1-25, 19 dez. 2016.
43. OECD. **Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA).** Disponível em: <<http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/iata-integrated-approaches-to-testing-and-assessment.htm>>. Acesso em: 12 jun. 2019.
44. OECD, Test No. 431: In Vitro Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Method, 2016. <http://doi.org/10.1787/9789264203822-en>.
45. PAIXÃO, Rita Leal. Experimentação animal: razões e emoções para uma ética. [Doutorado] Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública; 2001. p. 189
46. PEDROSA, Tatiana do Nascimento et al. A new reconstructed human epidermis for in vitro skin irritation testing. Toxicology In Vitro, [s.l.], v. 42, p.31-37, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2017.03.010>.

47. PRESGRAVE, Octavio et al. A Proposal to Establish a Brazilian Center for Validation of Alternative Methods (BraCVAM). **Altex**: Special Issue, Brazil, n. 27, p.47-51, 2010.
48. REGIS, A. H. P.; Cornelli, G.; **Experimentação animal: panorama histórico e perspectivas**. Revista bioética (Impr.) 2012; 20 (2) p.232-243
49. TAYLOR, K. et al. (2008). **Estimates for Worldwide Laboratory Animal Use in 2005**. ATLA – Alternatives to laboratory Animals (in press) v 36(3), p. 327-342.
50. TORRES, José A.; BOBST, Sol. **Toxicological Risk Assessment for Beginners**. Ohio: Springer, 2015. 266 p.
51. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US-EPA). Toxicology Testing in the 21st Century (Tox21). 2017. Disponível em: <<https://www.epa.gov/chemical-research/toxicology-testing-21st-century-tox21>> Acesso em: 14 maio 2019.
52. U.S. Department of Health and Human Services. **National Toxicology Program International Interactions**. 2019. Disponível em: <<https://ntp.niehs.nih.gov/pubhealth/evalatm/iccvam/internationalpartnerships/index.html>>. Acesso em: 12 maio 2019
53. U.S. Department of Health and Human Services. **National Toxicology Program**. NICEATM: Alternative Methods: About ICCVAM. 2019. Disponível em: <<https://ntp.niehs.nih.gov/pubhealth/evalatm/iccvam/index.html>>. Acesso em: 12 maio 2019
54. VAN RAVENZWAAY, B. **Innovative Approaches to Reduce Animal Testing**. ISBN 978-94-6173-616-1. Wageningen University. Wageningen, 2013.
55. VASCONCELOS, Yuri. Pele de laboratório: Pesquisadores brasileiros criam modelos de tecido humano para estudar doenças e substituir testes de cosméticos e medicamentos em animais. 2016. Pesquisa Fapesp. Edição 245. Jul 2016. Disponível em:

<<https://revistapesquisa.fapesp.br/2016/07/14/pele-de-laboratorio/>>. Acesso em: 16 jun. 2019.

56. WADE, Dale A. Pesticide Registration in the United States. **Texas Agricultural Extension Service**, San Angelo, TX 76901. Dec. 1985 p. 131-136
57. WILLIAMS, E. Spencer; PANKO, Julie; PAUSTENBACH, Dennis J.. The European Union's REACH regulation: a review of its history and requirements. **Critical Reviews In Toxicology**, [s.l.], v. 39, n. 7, p.553-575, ago. 2009. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10408440903036056>.


Maryanne Saory Ogasawara
23/09/2019


Prof. Drª Silvia Benanga de Moraes Barros
23/09/2019