

Métodos alternativos in vitro e in silico: métodos auxiliares e substitutivos à experimentação animal

Julia Costa Victal

Farmacêutica Bioquímica graduada pelas Faculdades Oswaldo Cruz. Cursando especialização em Assuntos Regulatórios em Cosméticos e Medicamentos na Faculdades Oswaldo Cruz. Analista de Assuntos Regulatórios no Sindusfarma.

Laura Brisighelo Valério

Farmacêutica Bioquímica graduada pelas Faculdades Oswaldo Cruz. Analista da avaliação do risco humano na Syngenta.

Mariana Cardoso Oshiro

Farmacêutica Bioquímica graduada pelas Faculdades Oswaldo Cruz. Analista de Registro da Vigna Brasil Consultoria em Assuntos Estratégicos e Regulatórios Ltda.

Stephanie Costa Baptista

Farmacêutica Bioquímica graduada pelas Faculdades Oswaldo Cruz. Analista de informações médicas na Boehringer Ingelheim do Brasil.

Fabriciano Pinheiro

Biomédico, IB-UNESP/Botucatu. Mestre em Toxicologia e Análises Toxicológicas, FCF-USP/SP. Coordenador e professor do curso de pós-graduação em Ciências Toxicológicas das Faculdades Oswaldo Cruz/SP. Coordenador da Comissão de Estudos “Informações sobre Segurança, Saúde e Meio Ambiente relacionados a Produtos Químicos” (CE-10:101.05) do Comitê Brasileiro de Química (ABNT/ CB-10). Diretor técnico da Intertox.

RESUMO

Há uma grande quantidade de substâncias químicas presentes no mercado mundial, como por exemplo, nos setores de agroquímicos e cosméticos, e devido a necessidade da comprovação de segurança humana e ambiental, inúmeros animais são utilizados em experimentação. Nas últimas décadas, esta prática vem sendo alvo de muitas críticas por vários segmentos da sociedade que questionam o sofrimento dos animais. Na busca de uma abordagem que reduza, refina e substitua o uso dos animais, surgem metodologias alternativas embasadas na política dos 3R's. Assim, neste trabalho, reúnem-se análises e discussões para emprego de testes *in vitro* e modelos *in silico* como metodologia alternativa para testes *in vivo*, considerando o bem estar animal, e a presença dessas novas metodologias no cenário regulatório nacional e internacional. A partir do exposto observa-se que os métodos alternativos podem se comportar como ferramentas complementares aos testes *in vivo*, bem como ser um substitutivo à experimentação animal.

Palavras-chave: Bem estar animal. Métodos alternativos. Programa 3R's. Experimentação animal. Toxicologia. Sistema de Teste Integrado.

ABSTRACT

There are a lot of chemical substances present in the world market in areas such as agrochemicals and cosmetics, and because the need for human and environmental safety assessment, many animals are used in experiments. In recent decades, this practice has been the target of much criticism by various segments of society, questioning the suffering of animals. In search of an approach to reduce, refine and replace the use of animals, alternative methodologies arise based in the 3R's program. In this work, reviews and discussions for the employment of "in vitro" tests and "in silico" models as an alternative methodology to "in vivo" tests are gathered considering animal welfare and the presence of these new methodologies in the national and international regulatory scenario. From the foregoing, it can be seen that the alternative methods may behave as complementary tools for "in vivo" testing, as well as being a substitute for animal experimentation.

Keyword: Animal welfare. Alternative methods. 3R's Program. Animal experimentation. Toxicology. Integrated Testing Strategies.

INTRODUÇÃO

A utilização de animais para a compreensão de processos biológicos começou na antiguidade, provavelmente com os estudos de Hipócrates (450 a.C.), que relacionavam o aspecto de órgãos humanos doentes com os de animais. Desde então, experimentos em animais começaram a ser amplamente realizados a fim de produzir conhecimento científico útil aos seres humanos. A utilização de animais em experimentação é realizada por inúmeros motivos, dentre estes, para avaliar a toxicidade de produtos químicos de uso final, como cosméticos e agrotóxicos.

A avaliação da toxicidade de uma substância tem como objetivo prever os efeitos nocivos que esta poderá desencadear quando em contato com humanos pelas diferentes vias de exposição (oral, dérmica, inalatória, dentre outras). Para cumprir este propósito, o modelo animal, em mamíferos, é o mais utilizado nos estudos toxicológicos e, requerido nos processos investigativos, desde o desenvolvimento de produtos até seu registro e comercialização (CAZARIN *et al.* 2004). Entretanto, nas últimas décadas, essa prática vem sendo alvo de muitas críticas por diversos segmentos da sociedade, os quais questionam o sofrimento destes animais, exigindo da comunidade científica e das autoridades, testes alternativos à experimentação animal.

Atualmente, alguns métodos alternativos à experimentação animal estão disponíveis para avaliação da toxicidade. Nos Estados Unidos, por exemplo, o *NTP Interagency Center for the Evaluation of alternative Toxicological Methods* (NICEATM) juntamente com *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM) disponibilizam em seu website uma relação de métodos alternativos validados e já adotados por agências internacionalmente reconhecidas, como a *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD). Neste artigo, reúnem-se informações a respeito de metodologias alternativas *in vitro* e *in silico*, além de análise e discussão do emprego dessas novas técnicas dentro do panorama regulatório da indústria cosmética e agroquímica.

O USO DE ANIMAIS NA ÁREA CIENTÍFICA

A experimentação animal tem servido, ao longo de muitos anos, como um meio de se determinar a eficácia e a segurança de diversas substâncias e

VICTAL, Julia Costa;VALÉRIO, Laura Brisighelo;OSHIRO, Mariana Cardoso;BAPTISTA, Stephanie Costa;PINHEIRO, Fabriciano. Métodos alternativos *in vitro* e *in silico*: métodos auxiliares e substitutivos à experimentação animal. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 7, n. 2, p. 36-57, jun. 2014.

produtos, em inúmeras áreas. A princípio, qualquer animal pode servir à experimentação, porém tem-se procurado utilizar um modelo que apresente melhor resposta a um determinado estímulo, seja por sua maior sensibilidade, facilidade de manejo e evidenciação do efeito ou por sua similaridade anatômica, fisiológica ou metabólica com o homem (ANVISA 2012).

Entretanto, o uso de animais em experimentos tem sido razão de muitas discussões em função da alta quantidade utilizada e do sofrimento causado aos animais. Há uma tendência mundial para reavaliar a utilização de animais nos experimentos, concretizada a partir de um programa denominado de 3R's (*Reduction, Refinement, Replacement*), que objetiva, diminuir o número de animais utilizados, minimizar a dor e o desconforto e buscar alternativas para a substituição dos testes *in vivo* (CAZARIN *et al.* 2004).

O PROGRAMA 3R's

O conceito dos 3R's surgiu em 1954, em um projeto da Federação das Universidades para o bem estar animal (*The Universities Federation for Animal Welfare*). Em 1959, Willian Russell e Rex Burch publicaram o livro *Princípios das Técnicas Experimentais Humanizadas (The Principles of Humane Experimental Technique)*, no qual afirmaram que a boa pesquisa em animais deve respeitar os princípios dos 3R's. O programa dos 3R's é assim denominado em função das iniciais em inglês, *Reduction* (redução), *Refinement* (refinamento) e *Replacement* (substituição) e tem como objetivo assegurar uma pesquisa racional e minimizar o uso de animais e o seu sofrimento, sem comprometer a qualidade do trabalho científico que está sendo executado, visualizando, futuramente, a total substituição de animais por modelos experimentais alternativos (ANVISA 2012; RUSSEL 1992)

A **redução** é a diminuição do número de animais utilizados em um único teste para avaliação de um determinado desfecho. Isso se torna possível quando algumas ações são adotadas, como: i) desenvolvimento de novos protocolos com a utilização de menor número de animais por experimento; ii) evitar a não replicação dos estudos conduzidos *in vivo* e a condução de estudos utilizando modelos animais que têm demonstrado irrelevância na extrapolação dos efeitos para a espécie humana; iii) desenvolvimento de metodologias *ex vivo* e *in vitro*, com o intuito de utilizá-las como triagem (*screening*) para a identificação do efeito de relevância e para posterior investigação; iv) aperfeiçoamento da qualidade técnica dos

VICTAL, Julia Costa;VALÉRIO, Laura Brisighelo;OSHIRO, Mariana Cardoso;BAPTISTA, Stephanie Costa;PINHEIRO, Fabriciano. Métodos alternativos in vitro e in silico: métodos auxiliares e substitutivos à experimentação animal. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 7, n. 2, p. 36-57, jun. 2014.

ensaios; e v) a obtenção do maior número possível de informações relevantes em um pequeno número de animais (RUSSEL 1992; BALLS 1994; CAZARIN et al. 2004).

No **refinamento**, o principal objetivo é a melhora na condução dos estudos no sentido de minimizar a dor e sofrimento dos animais, como por exemplo, o uso de anestésicos ou analgésicos (quando estes não interferirem nos experimentos) ou na manutenção dos animais em grupos, quando o desenho experimental não exige isolamento.

Já a **substituição** significa deixar de usar os animais, substituindo os estudos *in vivo* por outras metodologias (RUSSEL 1992; BALLS 1994; CAZARIN et al. 2004).

METODOLOGIAS ALTERNATIVAS – IN VITRO

O uso de métodos alternativos apresenta diversas vantagens, que vão desde a não utilização de animais, quando se trata de métodos de substituição, até a redução de custos, já que não se faz necessária a existência de infraestrutura de biotérios para criação e manutenção dos animais. Adicionalmente os métodos *in vitro* apresentam como benefício o fato de serem menos sujeitos a interferentes externos, já que os animais sofrem influência de presença de ruídos, alterações de metabolismo em função de alguma modificação de temperatura, ciclo de luz, umidade etc. Da mesma forma, o espaço requerido para um teste *in vitro* é muito menor do que necessário para o estabelecimento de um biotério. Isso facilita de forma significativa a difusão e implantação desses métodos (PRESGRAVE *et al.* 2010).

A seguir, são apresentados alguns métodos alternativos realizados *in vitro* que possuem metodologia mundialmente reconhecida para a avaliação de *endpoints* toxicológicos para: irritação/corrosão dérmica, irritação/corrosão ocular, método alternativo para avaliação de citotoxicidade ocular e sensibilização.

Irritação/corrosão dérmica

Alguns métodos *in vitro* são recomendados para substituir os ensaios em pele de coelhos, minimizando a dor e o sofrimento dos animais. Porém, a maioria dos ensaios atualmente propostos consegue identificar apenas as substâncias corrosivas e diferenciá-las das não corrosivas, não medindo o

potencial de causar irritação dérmica, como no teste clássico *in vivo* (CORRÊA et al. 2009).

Neste contexto, até o presente momento há quatro protocolos de testes *in vitro* com modelos de pele humana e/ou animal, adotados internacionalmente pela OECD (430, 431, 432 e 435) e validados pela *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM) para avaliar corrosão dérmica. Embora não substitua na sua totalidade o teste *in vivo* para avaliar este *endpoint* toxicológico, o ICCVAM recomenda que os quatro métodos devam ser utilizados como parte de uma análise de peso da evidência em um sistema de teste integrado para irritação/corrosão dérmica (NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM 2012b).

• **OECD 430: *In vitro skin corrosion – Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER)***, teste de resistência elétrica transcutânea, de 2013, que permite a avaliação de substâncias e misturas corrosivas, possibilitando discriminar de forma confiável os corrosivos dérmicos dos não corrosivos. Materiais corrosivos são identificados pela habilidade de produzir a perda da integridade do estrato córneo normal e da função de barreira, medida pela redução da resistência elétrica transcutânea (medida da impedância elétrica da pele através de uma corrente elétrica de baixa voltagem); geralmente, substâncias não corrosivas para os animais não causam redução da resistência elétrica transcutânea (TER). Um sistema de corante é utilizado no teste para confirmar resultados positivos. O teste não fornece informações sobre irritação dérmica, assim como não permite classificar as substâncias corrosivas em subcategorias, como proposto pelo Sistema de Classificação de Perigo GHS (*Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals*), da ONU (CORRÊA et al. 2009; ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT 2013b).

• **OECD 431: *In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method – (EpiDerm™, EPISKIN™)***, teste com modelo de epiderme humana, de 2013, que permite a identificação de substâncias e misturas corrosivas. O princípio do método é baseado na hipótese de que as substâncias corrosivas são capazes de penetrar o estrato córneo por difusão ou erosão, sendo citotóxicas para as células das camadas mais profundas (CORRÊA et al. 2009; ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT 2013a).

• **OECD 435: *In vitro* membrane barrier test method for skin corrosion (Corrositex®)**, adotado em 2006, descreve um método que permite a identificação de substâncias e misturas corrosivas e possibilita a classificação destas em subcategorias de acordo com os critérios do GHS. O tempo decorrido entre a aplicação da substância-teste e a penetração na membrana é utilizado para classificar a substância em termos de corrosividade (CORRÊA *et al.* 2009; ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT 2006).

• **OECD 432: *In vitro* 3T3 NRU phototoxicity test**, teste de fototoxicidade *in vitro* em células 3T3 NRU, de 2004, avalia o dano à pele por meio da fototoxicidade, que é a resposta tóxica provocada ou aumentada após exposição subsequente à luz, ou que é induzida por irradiação na pele após administração sistêmica da substância. Esse teste é utilizado para identificar o potencial fototóxico das substâncias e mensurado pela redução da viabilidade de células expostas à substância-teste na presença e ausência de luz (ANVISA 2012; CORRÊA *et al.* 2009; ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT 2004a).

Irritação/corrosão ocular

Através de um conjunto de métodos *in vitro* (BCOP, ICE, HET-CAM, citotoxicidade pela difusão em gel de agarose, citotoxicidade pelo método do Vermelho Neutro, citotoxicidade pelo método do NRU, MTT, RBC), agrupam-se informações que oferecem subsídios para garantir a segurança do produto a nível ocular. Como há mais de um mecanismo de irritação ocular, apenas um ensaio *in vitro* não é suficiente para uma completa avaliação. O ideal é a obtenção de dados relacionados à vascularização (Het-Cam), opacidade/permeabilidade (BCOP) e citotoxicidade (NRU, MTT, RBC) (ANVISA 2012).

• **OECD 437: *Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants*** – O teste de opacidade e permeabilidade da córnea bovina, de 2013, foi desenvolvido para que pudessem ser utilizados os órgãos de uma espécie que é rotineiramente abatida para fins alimentícios, visando substituir futuramente o teste de irritação ocular *in vivo*, ou ocular de Draize (ICCVAM 2012a). O método mensura o potencial de corrosividade ocular ou irritação severa de uma substância, medida pela habilidade daquela em induzir opacidade e aumentar a permeabilidade na córnea bovina isolada

(ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT 2013c).

• **OECD 438: *Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants***, de 2013. Esse método avalia o potencial em causar corrosão e/ou irritação severa medida pela habilidade de induzir toxicidade em olhos anucleados de galinhas. Os efeitos tóxicos são determinados pela avaliação qualitativa da opacidade e do dano ao epitélio (retenção da fluoresceína), pela medida quantitativa do aumento do edema e pela avaliação qualitativa dos danos morfológicos macroscópicos na superfície. A opacidade da córnea, o edema e os danos oculares após exposição à substância-teste são avaliados individualmente e então combinados para derivar a classificação de irritação ocular (CORRÊA et al. 2009; ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT 2013d).

• **HET-CAM – Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane (Teste da membrana cório-alantóide do ovo de galinha)**, o método tem como objetivo identificar e avaliar o potencial irritante de um produto ou substância química sobre a Membrana Cório-Alantóide (CAM) do ovo embrionado da galinha no décimo dia de incubação. O ensaio é baseado na observação dos efeitos irritantes (hiperemia, hemorragia e coagulação), após 5 minutos da aplicação do produto, puro ou diluído, sobre a cório-alantóide (ANVISA 2012). O método HET-CAM tem o potencial de reduzir e refinar o uso de animais nos testes de irritação ocular. As substâncias identificadas como corrosivas ou irritantes seriam excluídas dos testes *in vivo*, o que reduziria o número de coelhos para o teste e pouparia o sofrimento dos mesmos. Além disso, o método reduz o tempo necessário para avaliar uma substância quando comparado com o método *in vivo* (ICCVAM 2012b).

Citotoxicidade

A **Citotoxicidade pelo Método MTT** é avaliada com ajuda do um corante vital, o (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Os parâmetros de avaliação observados são a porcentagem de morte celular e a inibição de 50% do crescimento celular. Este teste não se aplica a produtos insolúveis em água (ANVISA 2012).

Na **Citotoxicidade pelo Método de Vermelho Neutro**, utiliza-se uma cultura de células fibroblásticas de córnea de coelho da linhagem SIRC CCL 60, adicionadas ao corante Vermelho Neutro ou MTT. A captação do

VICTAL, Julia Costa;VALÉRIO, Laura Brisighelo;OSHIRO, Mariana Cardoso;BAPTISTA, Stephanie Costa;PINHEIRO, Fabriciano. Métodos alternativos *in vitro* e *in silico*: métodos auxiliares e substitutivos à experimentação animal. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 7, n. 2, p. 36-57, jun. 2014.

corante pelas células viáveis é quantificada por espectrofotometria através de um leitor automático de microplacas. Este método pode ser utilizado para todo tipo de formulação, exceto aquelas que possuam propriedades fixadoras, como as formulações alcoólicas (ANVISA 2012).

O teste de **Citotoxicidade pela Difusão em Gel de Agarose** é indicado para emulsões e géis com fase contínua aquosa. A aplicação desses produtos na superfície de um gel agarose em contato com as células do tecido conjuntivo de camundongo gera um halo. O diâmetro do halo corresponde a citotoxicidade do produto testado e a sua capacidade de se difundir no gel agarose. Como indicador, utiliza-se um corante vital como o MTT ou Vermelho Neutro (ANVISA 2012).

Sensibilização

Para ensaios de sensibilização da pele, pode-se empregar o teste chamado **RBC (Red Blood Cells System)**. Este ensaio permite quantificar e avaliar os efeitos adversos dos tensoativos empregados em xampus, sabonetes líquidos e produtos de higiene sobre a membrana plasmática das hemácias de carneiro e a consequente liberação da hemoglobina (hemólise). O índice de desnaturação da hemoglobina é avaliado através de sua forma oxidada e ambos quantificados por espectrofotometria. A relação entre a hemólise e a oxidação da hemoglobina fornece um parâmetro de caracterização dos efeitos dessas substâncias *in vitro* (ANVISA 2012).

METODOLOGIAS ALTERNATIVAS – IN SILICO

Os modelos *in silico* são desenvolvidos utilizando programas computacionais que permitem a predição do risco e perigo de uma substância química segundo sua estrutura molecular. A análise de uma substância química pelo método *in silico* engloba os seguintes conceitos: (Quantitative) Structure-Activity Relationship [(Q)SAR] e sistemas inteligentes (EUROPEAN CHEMICALS AGENCY 2008).

QSAR e SARs em conjunto são referidos como (Q)SAR, modelos teóricos que podem ser usados para prever as características físico-químicas, biológicas e propriedades de destino ambiental de compostos a partir de um conhecimento da sua estrutura molecular (EUROPEAN CHEMICALS AGENCY 2008). Os dois termos podem ser definidos da seguinte forma:

SAR é um modelo teórico qualitativo que oferece informações sobre o potencial de atividade biológica (por exemplo, toxicidade) de determinado fragmento molecular ou subestrutura (SANTOS 2013).

Um QSAR é um modelo matemático que relaciona a resposta biológica com as propriedades físico-químicas e estruturais (variáveis independentes) de uma molécula. Através de um modelo matemático é possível interpretar, por exemplo, o modo de ação de um agente químico (ligação a um receptor-alvo, ligação à molécula de DNA, entre outros) (SANTOS 2013).

Os sistemas inteligentes têm como objetivo mimetizar o pensamento humano realizando predições sobre a estrutura molecular e sua possível atividade biológica através de uma base de conhecimento. Esses sistemas seriam capazes de resolver problemas, tomar decisões e ser criativo, diferentemente do sistema QSAR tradicional mais simplificado que não leva em consideração a formação de metabólitos, derivados da molécula analisada e suas possíveis atividades toxicológicas (JUDSON 1992).

Atualmente, uma ampla gama de ferramentas de software está disponível gratuitamente e comercialmente a fim de prever propriedades químicas, parâmetros toxicológicos e outros efeitos toxicológicos e biológicos, assim como o destino no ambiente e nos organismos biológicos. É observada também uma crescente literatura científica que relata inúmeros modelos QSAR (EUROPEAN CHEMICALS AGENCY 2008).

Tabela 1: Ferramentas de software comumente utilizadas e gratuitamente disponíveis

Software	Metodologia	Comentários
EPI Suite; US EPA	Estatístico	Ferramenta adequada para usuários não especializados.
OncoLogic®; US EPA	Baseada no conhecimento	Ferramenta adequada para usuários com um conhecimento limitado da química. Previsões transparentes.
Toxtree; EC – JRC	Híbrido - Estatística e baseada no conhecimento	Ferramenta de código aberto e adequada para usuários não especializados.
Toxmatch; EC – JRC	Estatístico	Ferramenta de pesquisa e de código aberto para análise de similaridade química. Conhecimentos especializados necessários.
OECD QSAR Toolbox	Híbrido - Estatística e baseada no conhecimento	Ferramenta de pesquisa de mecanismos de perfis, grupos de química e leitura de diâmetro. Conhecimentos especializados necessários
Lazar; <i>In silico</i>	Estatístico	Ferramenta de código Web acessível e

VICTAL, Julia Costa;VALÉRIO, Laura Brisighelo;OSHIRO, Mariana Cardoso;BAPTISTA, Stephanie Costa;PINHEIRO, Fabriciano. Métodos alternativos in vitro e in silico: métodos auxiliares e substitutivos à experimentação animal. *RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*, v. 7, n. 2, p. 36-57, jun. 2014.

Toxicology (Freiburg university)		aberto em desenvolvimento no projeto OpenTox. Adequado para usuários não especializados.
CAESAR project models	Estatístico	Ferramenta de código Web acessível e aberto desenvolvido no projeto da UE César. Adequado para usuários não especializados
PASS	Estatístico	Acessível via web e gera previsões “online” após a inscrição.
T.E.S.T.	Estatístico	Ferramenta de código aberto que realiza estimativa de toxicidade. Desenvolvida pelo EPA dos EUA, é adequado para usuários não especializados.

Fonte: (JOINT RESEARCH CENTER 2011).

Nos Estados Unidos, a *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) desenvolveu um programa de pesquisa em Toxicologia Computacional denominado *EPA's Computational Toxicology Research* (CompTox). Através da parceria com instituições de pesquisa, associações comerciais, agências federais, indústrias, ONGs, universidades e diversos colaboradores é possível o compartilhamento de dados de pesquisa e estudos e a criação de um banco de dados voltado para avaliação de risco de uma substância química, embasados em dados seguros e atualizados. Parcerias com empresas farmacêuticas e empresas de cosméticos permitem a redução dos testes em animais, diminuindo os custos da avaliação do potencial de toxicidade de uma substância (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY 2012a).

A seguir uma breve descrição dos projetos, bases de dados e ferramentas do CompTox:

Projetos, bases de dados e ferramentas do CompTox

- *Actor and ToxRefDB (Aggregated Computational Toxicology Resource and Toxicity Reference Database)*

Base de dados disponíveis aos cientistas e ao público em geral, permite a pesquisa e download de resultados de testes toxicológicos resultantes de milhares de substâncias químicas. O programa agrega mais de 500 fontes públicas de 500.000 substâncias químicas, sendo a fonte de dados principal, capaz de ligar e disponibilizar dados para os outros programas da *CompTox* (*ToxRefDB*, *DSSTox* e *ToxCastDB*) (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY 2012b).

- DSSTox (*Distributed Structure-Searchable Toxicity*)

O site oferece um fórum de discussão ao público, que permite publicações, downloads, pesquisa e arquivos químicos padronizados de estrutura química associados com dados de toxicidade (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY 2012b).

-ToxCast (*Toxicity Forecaster*)

Utilizando ferramentas computacionais para compreensão de como os processos do corpo humano podem ser afetados pela exposição a produtos químicos é possível determinar quais exposições são mais propensas a causar efeitos adversos à saúde (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY 2012c).

-ToxPi (*Toxicological Priority Index*)

Ferramenta de software que incorpora perfis, caminhos de toxicidade, estimativas de doses e descritores químicos estruturais para cálculo da pontuação de potencial tóxico de uma substância (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY 2012b).

-ExpoCast (*Exposure Forecaster*)

Trabalha em conjunto com o *ToxCast* e determina a prioridade de substâncias químicas que precisam de uma avaliação suplementar e desenvolvimento de novas abordagens para avaliação química baseada no potencial biologicamente relevante à exposição humana (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY 2012b).

-Virtual Tissues (*V-liver e V-Embryo*)

Modelos computacionais de fígado e embrião que possibilitam a predição de efeitos toxicológicos de substâncias químicas em humanos (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY 2012b).

PANORAMA REGULATÓRIO

A execução dos testes alternativos descritos anteriormente pode ser realizada por laboratórios do mundo inteiro, desde que os estudos tenham sua metodologia validada. Na União Europeia e Estados Unidos foram criados centros de validação de metodologia alternativa embasados na política dos 3R's.

O *European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing* (EURL ECVAM), centro de validação Europeu, possui parceria com órgãos reguladores e laboratórios europeus. O centro promove o VICTAL, Julia Costa;VALÉRIO, Laura Brisighelo;OSHIRO, Mariana Cardoso;BAPTISTA, Stephanie Costa;PINHEIRO, Fabriciano. Métodos alternativos in vitro e in silico: métodos auxiliares e substitutivos à experimentação animal. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 7, n. 2, p. 36-57, jun. 2014.

desenvolvimento e a difusão de métodos e abordagens alternativas, a sua aplicação na indústria e aceitação pelos órgãos reguladores (JOINT RESEARCH CENTER 2012b). Nos Estados Unidos, o centro de validação denominado ICCVAM também promove a validação de métodos alternativos, visando o atendimento das necessidades regulatórias das agências federais dos EUA (NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM 2012b).

No Brasil, a preocupação em validar métodos alternativos para a redução, substituição e refinamento do uso dos animais em estudos toxicológicos iniciou em Outubro de 2011. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em conjunto com o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), criou o Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM), o primeiro centro de validação de metodologias alternativas da América do Sul (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAUDE 2011). O BraCVAM foi inspirado em um órgão similar que existe na Europa (VIALLI 2012).

Internacionalmente, além dos centros de validação (ECVAM desde 1991 e ICCVAM desde 1997), há presença de leis que propõe a redução do número de animais em experimentação desde 1986. Temos como exemplo, a diretiva 86/609/CEE na União Européia e a Diretiva 2003/15/CE que definiu a proibição da comercialização dos produtos cosméticos que apresentam a formulação final e ingredientes testados em animais (UNIÃO EUROPEIA, 2003). O regulamento N° 1107/2009, de 21 de outubro de 2009, propõe que os ensaios em animais vertebrados só podem ser realizados se não houver métodos alternativos disponíveis autorizando o acesso e a partilha dos resultados dos estudos em animais entre as empresas (UNIÃO EUROPEIA 2009).

No contexto nacional, a filosofia dos 3R's pode ser observada nos "Princípios Éticos na Experimentação Animal" editado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), em junho de 1991 (COBEA 2012) e na Lei n° 11.794, ou Lei Arouca, adotada em 2008, que estabelece, entre outras disposições, a tarefa de monitorar e avaliar a introdução de métodos alternativos que substituam a utilização de animais em ensino e pesquisa através da criação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA (BRASIL 2008). Em 3/07/2012, por meio da Portaria n° 491, o Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação instituiu a Rede Nacional de Métodos Alternativos – RENAMA. Tal rede

tem como objetivo a implantação de ensaios alternativos, promovendo o desenvolvimento, a validação e a certificação dos novos métodos (BRASIL 2012). E mais recentemente, a Lei Estadual Nº 15.316/2014, aprovada no estado de São Paulo, proíbe o desenvolvimento, experimento e testes de produtos cosméticos, perfumes e produtos de higiene pessoal em animais (BRASIL 2014).

Para os agrotóxicos a avaliação da toxicidade, de acordo com a sua regulamentação, só pode ser razoavelmente realizada através de estudos em animais. Temos como exemplos, o Decreto 4074/02 e a Portaria nº 84, de 1996 do IBAMA, ambos regulamentam o registro e comercialização de agrotóxico, e estabelecem somente teste com utilização animal (BRASIL 2002; BRASIL 1996). O mesmo ocorre com a Portaria nº 03 de 16 de janeiro de 1992 – ANVISA, que avalia e classifica toxicologicamente os agrotóxicos e afins e baseia sua classificação toxicológica somente com resultados toxicológicos realizados em animais (BRASIL 1992).

DISCUSSÃO

Foi encontrada uma diversidade de testes alternativos *in silico* e *in vitro* atualmente disponíveis e muitos já validados. A substituição da experimentação animal pelas metodologias alternativas existentes dependerá do contexto em que estas metodologias estarão inseridas e do *endpoint* desejado.

Por exemplo, métodos *in vitro* que medem citotoxicidade basal ainda não são considerados como substitutos para os testes de toxicidade aguda oral em roedores, porém alguns desses métodos foram validados para estabelecer a dose inicial aos testes de toxicidade aguda que serão conduzidos posteriormente a fim de reduzir o uso de animais (NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM 2012a). Alguns métodos *in vitro* são recomendados para substituir os ensaios em pele de coelhos, minimizando a dor e o sofrimento dos animais. Mas, a maioria dos ensaios atualmente propostos consegue identificar apenas as substâncias corrosivas e diferenciá-las das não corrosivas, não medindo o potencial de causar irritação dérmica, como no teste clássico *in vivo* (CORRÊA *et al.* 2009).

Outro exemplo é, no caso do registro por equivalência entre agrotóxicos, no qual impurezas desconhecidas são encontradas em baixas concentrações em produto técnico. A impossibilidade da obtenção de

quantidades suficientes para fins de testes biológicos faz com que os modelos *in silico* não sejam apenas complementares, mas também a única forma possível de identificar as características toxicológicas desta impureza (BRASIL 2011).

É interessante perceber que, em um contexto geral, através dos testes *in silico*, *in vitro* e em último caso *in vivo*, é possível agrupar uma série de dados e avaliá-los dentro de um sistema de teste integrado, de maneira a gerar informações concretas para a avaliação de toxicidade de uma substância química, a chamada *Integrated Testing Strategies* (ITS) ou *Integrated Assessment and Testing Approaches* (IATA). Assim, através de uma forma integrada e sistemática de organização dos dados toxicológicos, as técnicas alternativas tornam-se não só testes substitutos autônomos à experimentação animal, mas vão suportar outros tipos de informação, ajudando, priorizando e otimizando a avaliação da toxicidade de uma substância (JAWORSKA & HOFFMANN 2010; BASKETTER et al. 2012).

Não se pode deixar de notar também, que o meio regulatório e científico internacional tem avançado quanto à tendência a diminuir o uso de animais em experimentações. A presença do ICCVAM nos Estados Unidos e EURL ECVAM na União Européia incentivaram a introdução dos métodos alternativos em substituição à experimentação animal no cenário regulatório (JOINT RESEARCH CENTER 2012b). E até mesmo o desenvolvimento de uma nova abordagem através do ITS já está sendo reconhecida no meio regulatório internacional. No Brasil, o desenvolvimento e difusão de métodos e abordagens alternativas, a sua aplicação na indústria e aceitação pelos órgãos reguladores está apenas no começo. As metodologias alternativas previstas no “Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos” (BCOP, ICE, 3T3 NRU, absorção cutânea *in vitro*, epiderme reconstituída, TER e LLNA) não estão validadas no Brasil, mas obtiveram aceitação regulatória por órgãos oficiais (OECD, FDA, etc.), dessa forma, assumem o mesmo *status* perante a ANVISA e estão sujeitos, somente, às alterações dos órgãos internacionais (ANVISA 2012).

Ressalta-se que o surgimento do princípio dos 3R's foi de extrema importância não somente para reavaliar a necessidade dos ensaios em animais, como também impulsionar pesquisas para o desenvolvimento de novas alternativas (MORALES 2008). Podemos considerar que, graças a estes princípios, hoje há inúmeras metodologias *in vitro* e *in silico* sendo desenvolvidas (PRESGRAVE et al. 2010).

CONCLUSÃO

Conclui-se que os métodos alternativos podem ser adotados como ferramentas complementares aos testes *in vivo*, como também, substitutivas à experimentação animal, dependendo do contexto que estão inseridas, uma vez que os estudos *in vitro* e *in silico*, e até mesmo os testes *in vivo*, não conseguem mimetizar a complexa fisiologia humana individualmente. Mas em conjunto, se tornarão ferramentas indispensáveis para a compreensão do comportamento de substâncias no organismo humano, dos mecanismos de ação e das linhas de evidência, elementos primordiais para a análise de riscos e estabelecimento de limites considerados seguros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos*. Brasília, 2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/html/index.htm>>. Acesso em: 15 ago. 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos*. 2 ed. Brasília, 2012. <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/04707f804e1c33cea541b7c09d49251b/Guia_cosmeticos_grafica_final.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em: 08 dez. 2013.

BASKETTER, D. A et al. A roadmap for the Development of Alternative (Non-Animal) Methods for Systemic Toxicity Testing. In: 21st Century Validation Strategies for 21st Century Tools. 2012, Baltimore. p. 5-12.

BALLS, M. Replacement of animal procedures: alternatives in research, education and testing. *Lab. Animals*, v. 28, p. 193-211, 1994.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Avaliação de Produtos Técnicos por Equivalência – Procedimentos técnicos e Administrativos. Brasília, 5 outubro 2011. Disponível em:<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/0395ec8048ade2ed8c74edfbd8335c80/Apresenta%C3%A7%C3%A3o+Of%C3%ADcio+Circular+Equival%C3%Aancia+05OUT2011+pdf.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 23 set. 2012

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 03 de 16 de janeiro de 1992. Ratifica os termos das "Diretrizes e orientações referentes à

VICTAL, Julia Costa; VALÉRIO, Laura Brisighelo; OSHIRO, Mariana Cardoso; BAPTISTA, Stephanie Costa; PINHEIRO, Fabriciano. Métodos alternativos *in vitro* e *in silico*: métodos auxiliares e substitutivos à experimentação animal. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 7, n. 2, p. 36-57, jun. 2014.

autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins - nº 1, de 9 de dezembro de 1991. Disponível em: <
http://www.google.com.br/#hl=pt-BR&client=psyab&q=Portaria+03+de+16+de+janeiro+de+1992+mapa&oq=Portaria+03+de+16+de+janeiro+de+1992+mapa&gs_l=hp.3...8106.9203.1.9559.5.5.0.0.0.212.615.0j1j2.3.0...0.0...1c.1.MFNfQJzhiTM&pbx=1&bav=on.2,or.r_gc.r_pw.r_qf.&fp=7ab036d2cf338ca7&biw=1366&bih=612 >. Acesso em: 24 ago. 2012.

BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Portaria nº 84 de 15 de outubro de 1996 . Disponível em:<http://servicos.ibama.gov.br/ctf/manual/html/Portaria_84.pdf >. Acesso em: 01 set. 2012

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. 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. Disponível em: <http://www.lex.com.br/legis_23490615_PORTARIA_N_491_DE_3_DE_JULHO_DE_2012.aspx>. Acesso em: 09 jan. 2014.

BRASIL. República Federativa do Brasil. Decreto 4074 de 4 de janeiro de 2002.Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Disponível em:<http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm >.Acesso em: 24 ago. 2012

BRASIL. República Federativa do 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. Disponível em:<http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm>. Acesso em: 25 ago. 2012.

BRASIL. República Federativa do Brasil. Lei nº 15.316, de 23 de janeiro de 2014. Proíbe a utilização de animais para desenvolvimento, experimento e teste de produtos cosméticos e de higiene pessoal, perfumes e seus componentes e dá outras providências. Disponível em:<

VICTAL, Julia Costa;VALÉRIO, Laura Brisighelo;OSHIRO, Mariana Cardoso;BAPTISTA, Stephanie Costa;PINHEIRO, Fabriciano. Métodos alternativos in vitro e in silico: métodos auxiliares e substitutivos à experimentação animal. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 7, n. 2, p. 36-57, jun. 2014.

<http://s.conjur.com.br/dl/lei-proibe-uso-animais-teste-produtos.pdf>>. Acesso em: 24 fev. 2014.

CAZARIN K.C.C, CORREA C.L, ZAMBRONE F.A.D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* São Paulo, SP, v. 40, n.3, p.289-299, jul.-set. 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v40n3/04.pdf> >. Acesso em: jan. 2012.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. *Princípios éticos na experimentação animal*. 1991. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/index.php?option=com_content&view=article&id=102&Itemid=119>. Acesso em: 22 set. 2012.

CORRÊA, C.L., et al. *Bases Científicas para a Avaliação da Toxicidade de Agrotóxicos*. 1ª ed. São Paulo, Brasil: ILSI Brasil – International Life Sciences Institute do Brasil, 2009.

EUROPEAN CHEMICALS AGENCY. Guidance on information requirements and chemical safety assessment Chapter R.6: QSARs and grouping of chemicals. c2008. Disponível em: <http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r6_en.pdf>. Acesso em: 30 ago. 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAUDE. Entrevista com Isabella Delgado, vice-diretora de Pesquisa e Ensino do INCQS. 2011. Disponível em: <http://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=743:entrevista-com-isabella-delgado-vice-diretora-de-pesquisa-e-ensino&catid=36:pagina-principal > Acesso em: 22 set. 2012.

INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION ALTERNATIVE METHODS - ICCVAM. *Introduction and Rationale for Proposed Use of In Vitro Test Methods to Identify Ocular Corrosives and Severe Irritants*. BCOP. EUA, 24 Jul. 2012a. Disponível em: <<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ocutox.htm>>. Acesso em: Agosto 2012.

INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION ALTERNATIVE METHODS - ICCVAM. *Introduction and Rationale for Proposed Use of In Vitro Test Methods to Identify Ocular Corrosives and Severe Irritants*. HET-CAM. EUA, 24 Jul. 2012b. Disponível em: <<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ocutox.htm> >. Acesso em: Agosto 2012.

VICTAL, Julia Costa;VALÉRIO, Laura Brisighelo;OSHIRO, Mariana Cardoso;BAPTISTA, Stephanie Costa;PINHEIRO, Fabriciano. Métodos alternativos in vitro e in silico: métodos auxiliares e substitutivos à experimentação animal. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 7, n. 2, p. 36-57, jun. 2014.

JAWORSKA, J; HOFFMANN, S. Integrated Testing Strategy (ITS) – Opportunities to Better Use Existing Data and Guide Future Testing in Toxicology. In: 21st Century Validation Strategies for 21st Century Tools. 2010, Baltimore. p. 231-242.

JOINT RESEARCH CENTER. Scientific and Technical Reports. The Use of Computational Methods in the Toxicological Assessment of Chemicals in Food: Current Status and Future Prospects. European Union. 2011. Disponível em: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/111111111/16180/1/reqno_jrc63826_eur_24748_final%5b1%5d.pdf>. Acesso em: 30 ago. 2012.

JOINT RESEARCH CENTER. Alternatives to Animal Testing – EURL ECVAM. c2012a. Disponível em: <http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing>. Acesso em: 28 jul. 2012.

JOINT RESEARCH CENTER. European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing. c2012b. Disponível em: <http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/intro> Acesso em: 22 set. 2012.

JUDSON, P. N. Qsar and Expert Systems in the prediction of Biological Activity. Pestic. Sci. vol. 36, p.155-160, 1992.

MORALES, Marcelo M. Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade. *Cienc. Cult.* vol.60, n.2, pp. 33-36. 2008. ISSN 0009-6725. Disponível em: <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_issuetoc&pid=000967252008000&ng=pt&nrm=is> Acesso em: 17 jun. 2012.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. *NICEATM-ICCVAM - Acute Oral Toxicity.* 25 jul 2012a. Disponível em <<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/acutetox.htm>>. Acesso em: 20 ago 2012.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. *NICEATM-ICCVAM - Dermal Corrosivity and Irritation.* 24 jul. 2012b. Disponível em: <<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/dermal/dermal.htm>> Acesso em: 20 Ago. 2012.

VICTAL, Julia Costa;VALÉRIO, Laura Brisighelo;OSHIRO, Mariana Cardoso;BAPTISTA, Stephanie Costa;PINHEIRO, Fabriciano. Métodos alternativos in vitro e in silico: métodos auxiliares e substitutivos à experimentação animal. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 7, n. 2, p. 36-57, jun. 2014.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. *NICEATM-ICCVAM - Test Method Evaluations*. 09 Abril 2012c. Disponível em: <<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/methods.htm>> Acesso em: 02 de Setembro de 2012.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. *OECD Guideline for the testing of chemicals: In vitro 3T3 NRU phototoxicity test*. Guideline 432. Paris, France, April 2004a. Disponível em: <<http://www.oecd.org/home/>>. Acesso em: 22 Jul. 2012.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. *OECD Guideline for the testing of chemicals: In vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test*. Guideline 431. Paris, France, July. 2013a. Disponível em: <<http://www.oecd.org/home/>>. Acesso em: 08 Jan. 2014.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. *OECD Guideline for the testing of chemicals: In vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER)*. Guideline 430. Paris, France, July. 2013b. Disponível em: <<http://www.oecd.org/home/>>. Acesso em: 08 Jan. 2014.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. *OECD Guideline for the testing of chemicals: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion*. Guideline 435. Paris, France, August 2006. Disponível em: <<http://www.oecd.org/home/>>. Acesso em: 22 Jul. 2012.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. *OECD Guidelines for testing of chemicals: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants*. Guideline 437. Paris, France, July. 2013c. Disponível em: <<http://www.oecd.org/home/>>. Acesso em: 08 Jan. 2014.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. *OECD Guidelines for testing chemicals: Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants*. Guideline 438. Paris, France, July. 2013d. Disponível em: <<http://www.oecd.org/home/>>. Acesso em: 08 Jan. 2014.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Principles for the Validation for Regulatory Purposes of (Quantitative) Structure Activity Relationship Models. 2012b. Disponível em:

VICTAL, Julia Costa;VALÉRIO, Laura Brisighelo;OSHIRO, Mariana Cardoso;BAPTISTA, Stephanie Costa;PINHEIRO, Fabriciano. Métodos alternativos in vitro e in silico: métodos auxiliares e substitutivos à experimentação animal. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 7, n. 2, p. 36-57, jun. 2014.

<<http://www.oecd.org/chemicalsafety/assessmentofchemicals/37849783.pdf>>. Acesso em: 22 Set. 2012.

PRESGRAVE, F. A. O. *et. al.* Métodos Alternativos ao Uso de Animais: Uma Visão Atual. *Ciênc. vet. tróp.*, v. 13, suplemento 1, p. 106 – 117. Ago 2010.

RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. L. *The principles of humane experimental technique*. London: Universities Federation for Animal Welfare (UFAW), 1992. ISBN: 0900767782. Special Edition. Disponível em: <http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc>. Acesso em: 17 ago 2012.

SANTOS, C. E. M. Toxicologia in Silico Fundamentos e Aplicações. 1. ed. São Paulo: Plêiade, 2013.

UNIÃO EUROPÉIA. Diretiva 2003/15/CE, de 27 de fevereiro de 2003. Relativa à aproximação das legislações dos Estados-Membros respeitantes aos produtos cosméticos. Jornal Oficial da União Européia, L66, 11 mar. 2003. p. 26-35.

UNIÃO EUROPÉIA. Regulamento nº1107/2009, 21 de outubro de 2009. Relativo à colocação dos produtos fitofarmacêuticos no mercado e que revoga as Directivas 79/117/CEE e 91/414/CEE do Conselho. Parlamento Europeu e do Conselho. Jornal Oficial da União Européia, L309, 24 nov. 2009. p. 1-50.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 2012a. Computational Toxicology Research. Disponível em: <<http://www.epa.gov/ncct/>>. Acesso em: 30 ago. 2012.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 2012b. Science in Action. Computational Toxicology Research Program. Disponível em: <http://www.epa.gov/ord/priorities/docs/comptox_research_program.pdf>. Acesso em: 30 ago. 2012.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 2012c. ToxCast™ Screening Chemicals to Predict Toxicity Faster and Better. Disponível em: <<http://www.epa.gov/ncct/toxcast/>> . Acesso em: 30 ago. 2012.

VIALLI, A. Uso de animais na área de cosméticos ainda é preciso. Folha de São Paulo, São Paulo, julho, 2012. Caderno Equilíbrio. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/fsp/equilibrio/53617-uso-de-animais-na-area-de-cosmeticos-ainda-e-preciso.shtml>>. Acesso em: 22 set. 2012.

VICTAL, Julia Costa; VALÉRIO, Laura Brisighelo; OSHIRO, Mariana Cardoso; BAPTISTA, Stephanie Costa; PINHEIRO, Fabriciano. Métodos alternativos in vitro e in silico: métodos auxiliares e substitutivos à experimentação animal. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 7, n. 2, p. 36-57, jun. 2014.