



Metodologias Alternativas à Experimentação Animal: Aplicação no Controle da Qualidade de Produtos sujeitos à Ação da Vigilância Sanitária

Introdução

A intervenção da autoridade regulatória no mercado é fundamental e se justifica face à necessidade de garantir a saúde da população e os direitos do consumidor. No entanto, alguns ensaios utilizados rotineiramente no controle da qualidade de produtos, por exemplo, testes de rotina descritos nas Farmacopéias e em outras diretrizes internacionais, tais como o teste *in vivo* para detecção de contaminantes pirogênicos, o teste de determinações de DL₅₀ em roedores, os testes de irritação dérmica e ocular em coelhos e os testes de avaliação de potência de produtos biológicos, têm sido questionados por grupos defensores dos direitos dos animais.

Além de questões éticas, a busca por métodos alternativos que se mostrem vantajosas em termos de confiabilidade, redução de custos e maior facilidade de difusão e incorporação por outros laboratórios, é uma questão de grande relevância para os laboratórios oficiais de controle da qualidade. Assim, com a tendência mundial de substituição do uso

de animais, alguns setores das indústrias internacionais, em especial a de cosméticos, passaram a desenvolver e apresentar resultados de testes *in vitro* para a comprovação da segurança de seus produtos. Grande parte dos estudos relacionados ao desenvolvimento de metodologias alternativas concentra-se na área dos estudos de toxicidade de produtos cosméticos, como por exemplo, os teste de irritação cutânea, irritação ocular, dermo-sensibilização, fototoxicidade, irritação de mucosas, corrosividade cutânea, entre outros (Anvisa, 2003). Embora estes testes tenham aplicação também na avaliação de segurança de outros produtos, como medicamentos de uso tópico e na avaliação da exposição ocupacional a substâncias químicas, sua utilidade é sem dúvida fortemente relacionada à avaliação de segurança de ingredientes isolados de produtos cosméticos e/ou produtos acabados que os contenham.

Apesar das metodologias *in vitro* representarem uma opção pro-

■ **Clarice Lima do Canto Abreu**
Médica Veterinária, CRMV-RJ nº7101, Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária, Departamento de Imunologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – FIOCRUZ
E-mail:
clarice.abreu@incqs.fiocruz.br

■ **Octavio Augusto França Presgrave**
Biólogo, CRBio nº 07.437/02-D, Departamento de Farmacologia e Toxicologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – FIOCRUZ
E-mail:
Octavio.presgrave@incqs.fiocruz.br

■ **Isabella Fernandes Delgado**
Bióloga, CRBio nº 32.705/02, Departamento de Imunologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - FIOCRUZ

Endereço para correspondência:
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos –
Rio de Janeiro –RJ

E-mail:
isabella.delgado@incqs.fiocruz.br

EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

missora para a pesquisa na área biomédica e poderem vir a substituir um número considerável de métodos *in vivo* hoje preconizados em compêndios oficiais, há de se considerar que o processo de desenvolvimento e validação de novos métodos alternativos é laborioso e requer grande investimento de tempo, dinheiro e pessoal capacitado. Assim alguns países, percebendo a complexidade de tal processo, se organizaram e criaram centros de pesquisa e fomento para o desenvolvimento e validação de metodologias alternativas ao uso de animais, como é o caso do *European Center for Validation of Alternative Methods* (ECVAM) em Ispra na Itália,

o *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM) nos EUA, o *Japanese Center for the Validation of Alternative Methods* (JaCVAM) no Japão, o *Fund for Replacement of Animal Medical Experiments* (FRAME) na Inglaterra e o *Center for Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments* (ZEBET) na Alemanha, entre outros. Dentre os principais objetivos destes centros de estudos, destacam-se: **I.** o desenvolvimento de novos métodos alternativos em consonância com o princípio dos 3R's, **II.** o estabelecimento da base de dados sobre métodos alternativos ao uso de animais, **III.** o fo-

mento de projetos de pesquisa relacionados aos métodos alternativos e a cooperações com outras agências de fomento nacionais e internacionais e centros de validação, **IV.** a ordenação de estudos interlaboratoriais de validação; e por fim, **V.** a promoção de fóruns de discussão sobre métodos alternativos ao uso de animais.

Como resultado deste esforço mundial no desenvolvimento/validação de metodologias alternativas, existe hoje um número considerável de ensaios validados e aceitos para fins regulatórios, conforme exemplos demonstrados no Quadro 1. Tais métodos são aplicáveis ao controle da

Quadro 1: Exemplos de metodologias alternativas validadas/aceitas para fins regulatórios na Europa

Teste	Desfecho	Modelo	Validado *	Aceito para fins regulatórios
Teste de Irritação Dérmica	Potencial irritante de produtos acabados ou ingredientes	Modelos de pele reconstituída (EPISKIN®, EPIDERM®). Análise através de citotoxicidade (redução de MTT) e/ou liberação de interleucina.	2007	Não
Teste de Detecção de Endotoxinas <i>in vitro</i> (LAL)	Pirogenidade mediada por endotoxinas de origem bacteriana (Gran-negativa)	Ensaio gel-clot - gelificação de amebócito sanguíneos de carangueijo <i>Limulus</i> (ensaio colorimétrico)	1985	Farmacopéia Americana
Teste de Pirogênio <i>in vitro</i> (sangue ou células)	Pirogenidade - pirogênios em geral	Quantificação de IL-1 ou IL-6 em sangue total humano fresco ou criopreservado, ou quantificação de IL-6 em linhagem celular Mono-Mac 6 ou em células monocíticas isoladas de sangue humano periférico	2006	Não
Ensaio do Linfonodo Local Murino	Potencial sensibilizante de xenobióticos	Quantificação de ³ H-timidina nos linfonodos auriculares de camundongos tratados com substância teste	2000	2002 (OECD test guideline 429)
Ensaio de Fototoxicidade (3T3-NRU)	Potencial fototóxico de ingredientes de produtos preconizados para pele humana (exposição à luz solar)	Utilização de linhagem celular 3T3 e corante Vermelho Neutro	1998	2002 (Directiva 67/548/EEC; Draft OECD test guideline 432)
Teste de Potência do Componente Tetânico	Potência do componente tetânico presente em vacinas de uso humano como DTP, DT, dT e DTP acelular e no soro anti-tetânico	Teste <i>in vitro</i> de inibição de ligação da toxina (ToBI)	2000	2003, (EDQM* /Farmacopéia Européia)

*ECVAM / *EDQM: The European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care.

qualidade de produtos sujeitos à ação da Vigilância Sanitária e - via de regra - apresentam boa especificidade, sensibilidade e precisão. Além disso, são considerados vantajosos quando comparados aos ensaios *in vivo* que pretendem substituir. Dentre as principais vantagens, quando consideramos tais metodologias alternativas, pode-se citar:

1. Questões éticas: embora a utilização de animais em experimentos científicos ocorra há muitos anos (Raymundo e Goldim, 2002) e sejam inegáveis os benefícios alcançados para o desenvolvimento da ciência e de novas tecnologias, principalmente na área da saúde, é necessário o comprometimento do meio científico pela busca, sempre que possível, de modelos alternativos.

2. Maior rapidez de resposta: ensaios alternativos apresentam - em sua grande maioria - menor duração que ensaios *in vivo*.

3. Maior precisão de resultados: muitos ensaios *in vivo* apresentam desfechos subjetivos, que muitas vezes dependem de um treinamento criterioso dos técnicos envolvidos na análise final dos resulta-

dos (por exemplo, análise qualitativa de alterações da pele ou olho após aplicação de um determinado produto). Estes desfechos podem ser hoje substituídos por ensaios automatizados e cuja análise final é objetiva (por exemplo, quantificação de citocinas por ELISA ou estabelecimento da IC₅₀ - concentração inibitória 50% - em testes de citotoxicidade).

4. Menor custo: apesar dos altos custos envolvidos no processo de desenvolvimento/validação de uma nova metodologia, pode-se dizer que, uma vez validadas, as metodologias alternativas apresentam um custo menor do que aquelas relacionadas à manutenção de animais e infra-estrutura de biotérios. O cumprimento das normas internacionais de bioterismo exige cuidados especiais com o ambiente (controle de temperatura, umidade, luminosidade, troca de ar etc.), com os animais (frequência de trocas, limpeza de caixas e gaiolas etc.) bem como o treinamento e atualização dos técnicos que manipulam esses animais (National Research Council, 2003), o que eleva muito o custo destes ensaios.

5. Maior facilidade de disseminação para outros laboratórios de saúde pública, por exemplo, laboratórios centrais de Saúde Pública (LACENS), laboratórios da Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (REBLAS) e universidades, pois eliminam a necessidade de infra-estrutura para a criação e manutenção de animais de experimentação.

O Princípio dos 3R's

Em 1959, Willian Russel e Rex Burch apresentaram à comunidade científica o livro *Principles of Humane Experimental Technique*, definindo os 3R's, cuja sigla representa "*refinement*", "*reduction*" e "*replacement*", que significam respectivamente: (1) refinamento: a modificação de algum procedimento operacional com animais, objetivando minimizar a dor e/ou o estresse. A experiência da dor e do estresse tem como resultado mudanças fisiológicas que interferem nos resultados obtidos. Sendo assim, o interesse dos cientistas é assegurar

Quadro 2: Métodos alternativos ao clássico método de DL50% utilizado na avaliação da toxicidade aguda sistêmica preconizados em compêndios oficiais

Guidelines	Nº de animais/ teste	Nº de mortes/teste	Objetivos
OECD 420	5-7	1	Identificar o menor nível de dose em que se observa sinal evidente de toxicidade.
OECD 423	Aprox. 7	2-3	Identificar o menor nível de dose em que se observa mortalidade.
OECD 425	6-9	2-3	Estimar a DL50%.

Fonte: Bothan, 2002

EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



que as condições ambientais para os animais sejam as melhores possíveis; (2) redução: diminuição no número de animais utilizados no teste, sem a perda, no entanto, de qualidade na informação fornecida pelo mesmo; e (3) substituição: dos testes *in vivo* por testes *in vitro* (Hendriksen, 1994; Presgrave, 2002; Corrado, 2007; Anvisa, 2003).

Apesar da pouca atenção por

parte da comunidade científica à regra dos 3R's durante a década de 1960, este conceito evoluiu como uma tendência mundial durante os anos seguintes, iniciando uma forte pressão quanto a implicações éticas para a não utilização de animais em pesquisas científicas e a mobilização de várias entidades e órgãos regulatórios no árduo trabalho da validação de métodos alternativos na área biomédica.

Nas décadas de 1970 e 1980 a discussão sobre o uso de animais em pesquisa científica tornou-se mais abrangente e madura. Estas décadas viveram a discussão de temas, tais como: meios para reduzir tanto o número de animais de laboratório utilizados por experimento, quanto o número de experimentos realizados; otimização das condições que promovessem um maior bem-estar de animais em experimentação; desenvolvimento de métodos de refinamento das técnicas convencionais, além de, sempre que possível, a tentativa de substituir modelos *in vivo* por modelos *in vitro*.

Em 1975, o filósofo australiano Peter Singer lançou o livro intitulado *Animal Liberation* (Singer, 1975), despertando o movimento de proteção aos animais e apontando o teste de irritação ocular de Draize (teste preditivo para a determinação da irritabilidade oftálmica induzida por drogas, cosméticos e substâncias químicas descrito por John Draize e colaboradores - Draize *et al.*, 1944), como um importante alvo de combate para os ativistas (Wilhelmus, 2001). A partir de então, o teste de Draize gerou muitos protestos, principalmente contra a indústria de cosméticos, que o utilizava em grande escala. Uma grande campanha

deflagrada por ativistas dos direitos civis contra a indústria de cosméticos REVLON culminou com a publicação de cartazes no jornal *The New York Times*, com os seguintes dizeres: "Cego pela beleza" e "Quantos coelhos a REVLON cega em nome da beleza?". Após tais protestos, a REVLON providenciou fundos para pesquisas em métodos alternativos ao uso de animais. Outras companhias, como AVON e Bristol-Myers, seguiram o mesmo caminho, passando a colaborar no fomento a pesquisas afins (Raymundo e Goldim, 2002).

Apesar da década de 1970 ter sido de amadurecimento, como dito anteriormente, no que se refere à discussão de questões éticas em experimentação animal, a primeira publicação oficial sobre a aplicação dos 3R's só surgiu em meados de 1980, quando foi criada na Europa a Directiva 86/906/EEC que descreve as leis que regem a proteção de animais usados em experimentação científica (Rowan, 1997; Balls e Fentem, 1997). Assim, pode-se dizer que foi somente nos anos 1980 que o interesse pela busca de novas metodologias alternativas à utilização de animais na pesquisa científica se consolidou. Novas legislações passaram a aderir ao conceito dos 3R's e as pesquisas em métodos alternativos aumentaram consideravelmente (Rowan e Andrutis, 1990; Paixão, 2001). Como resultado deste processo, pôde-se observar entre as décadas de 1980 e 1990 uma diminuição significativa do número de animais utilizados em pesquisa científica, sobretudo em alguns países europeus (Spielmann, 2002). Uma análise mais detalhada destes números revela que esta diminuição foi devida - predominantemente - ao número de ani-

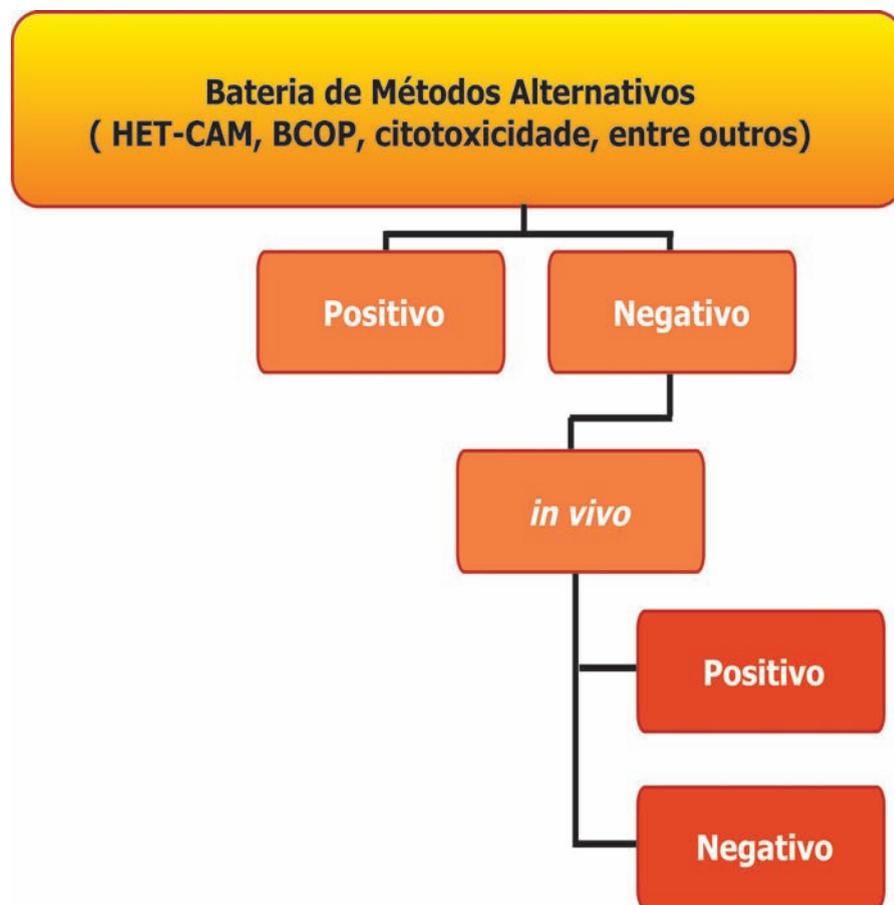


FIGURA 1
Exemplo de bateria de métodos alternativos propostos para irritação ocular

mais usados em pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de novos fármacos.

Dados mais recentes, no entanto, demonstram que a partir do ano de 2000 houve novo aumento do número de animais utilizados nas áreas mais básicas da pesquisa biomédica, como por exemplo, no desenvolvimento de animais geneticamente modificados (Hudson, 2007). Em contrapartida a este aumento, percebe-se uma redução do número de animais em pesquisa aplicada, sobretudo em análises toxicológicas, em decorrência de benefícios oferecidos por alguns governos às indústrias para a implementação da filosofia dos 3R's (União Européia, 2007).

Exemplos de aplicações da regra dos 3R's no controle da qualidade de produtos sujeitos à ação da Vigilância Sanitária

Leis que regem metodologias de substituição, redução e de refinamento (3R's) nas pesquisas científicas foram aprovadas nos Estados

Unidos, Reino Unido, Alemanha e União Européia. No entanto, a plena implementação desta nova abordagem legislativa depende da habilidade do meio científico em compreender temas relacionados ao bem-estar animal e da aceitação da legitimidade dos interesses públicos na condução da ciência (Zurlo *et al.*, 1996).

Neste contexto, pode-se dizer que além de buscar pela validação de novos métodos, cabe a comunidade científica o bom senso de excluir de seus compêndios oficiais metodologias obsoletas, que pouco contribuam no fornecimento de dados relevantes para a ciência e que utilizam um grande número de animais e/ou que provoquem dor, angústia e sofrimento aos mesmos.

Um exemplo desta conduta é a exclusão do método de dose letal 50% (DL₅₀) em 2001, da Directiva 67/548/EEC e das *guidelines* da OECD e a inclusão de métodos alternativos, recentemente validados (ESAC/ECVAM 2007), como o Teste de Dose Fixa, adotado desde em 1992 (OECD 420), o Teste de Toxicidade Aguda de Classe, adotado em 1996 (OECD 423), ou ainda o Teste *Up-and-down*, adotado em 1998, pela OECD 425 (Botham, 2002). Estes métodos, mesmo utilizando um número muito menor de animais que o preconizado no método clássico de DL₅₀, são capazes de: **I.** classificar substâncias químicas quanto ao seu potencial de toxicidade aguda, **II** fornecer informações sobre possíveis órgãos alvo e **III.** evidenciar sinais de toxicidade aguda (Quadro 2).

Alguns métodos alternativos recentemente validados podem substituir por completo o uso de animais (por exemplo, modelos de pele

EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Quadro 3: Aplicação da filosofia dos 3R's em testes de controle da qualidade de insumos para a saúde sob a fiscalização da Vigilância Sanitária

Métodos Alternativos	Testes <i>in vivo</i>	Aplicação dos 3R's	Validações
Modelos de pele reconstituída (EPISKIN® EPIDERM® - citotoxicidade/liberação de IL-1)	Teste de irritação dérmica (coelhos)	Substituição	2007
Teste Detecção de Endotoxinas <i>in vitro</i> (LAL)	Teste de pirogênio (coelhos)	Substituição	1985
Ensaio do Linfonodo Local Murino	Teste de Buehler e Teste de Maximização (cobaias)	Refinamento/ Redução	2000
Ensaio de Fototoxicidade (3T3-NRU)	Teste de fototoxicidade <i>in vivo</i> (cobaia)	Substituição	1998
Teste <i>in vitro</i> de inibição de ligação da toxina (ToBI)	Teste de potência do componente tetânico (cobaias e camundongos)	Refinamento/ Redução	2000

reconstituída para avaliação da irritabilidade dérmica induzida por xenobióticos e testes *in vitro* para detecção da presença de contaminantes pirogênicos em imunobiológicos, fármacos, parenterais de grande volume etc). Em outras situações, como a descrita anteriormente, a substituição plena ainda não é possível (Alves e Colli, 2006). No entanto, é importante destacar que toda pesquisa na área de métodos alternativos é válida e recomendada pelas agências de validação internacionais, havendo diversos exemplos de estudos que geraram importantes contribuições em termos de refinamento das técnicas e/ou redução do número de animais por desfecho toxicológico avaliado (Abreu, 2008).

Para alguns desfechos, embora permaneça a situação de utilização de animais de laboratório, alcançou-se importante grau de refina-

mento na técnica previamente preconizado (Quadro 3). Como exemplo, pode-se citar o ensaio do linfonodo local murino (LLNA, da sigla em inglês *Local Lymph Node Assay*), que é realizado em camundongos e se baseia na resposta imune celular (*i.e.* na ativação e proliferação específica de linfócitos), característica da fase de indução (1ª fase) do processo de hipersensibilidade dérmica. Das vantagens deste teste em relação aos seus precursores, listam-se: **I.** o parâmetro final analisado é quantitativo (incorporação de ³H-timidina), **II.** o teste se passa na fase de indução, e por isso tem a duração de 5 dias, enquanto os ensaios anteriores duravam em média 35 dias, **III.** características referentes a natureza da substância, tal como cor, não interferem com desfecho do teste, **IV.** o número de animais utilizados por substância-teste é cerca de

50% menor do que nos testes mais antigos, e por fim, **V.** os animais são poupados da dor e do desconforto decorrentes das reações de fase 2 (processo inflamatório) (Basketeer *et al.*, 2007; Basketeer e Kimber, 2007; Loveren *et al.*, 2008).

Um outro bom exemplo da aplicação da regra dos 3R's no laboratório de controle da qualidade é o uso dos métodos *in vitro* para avaliação da potência de imunobiológicos de uso humano. A potência dos componentes diftérico e tetânico, presentes em vacinas como DTP, DT, dT e DTP acelular, por exemplo, é determinada a partir de um teste em duas etapas (imunização e soroneutralização) que utiliza cobaias e/ou camundongos. A etapa de soroneutralização é a que envolve maior número de animais, cerca de 80 a 90% do total utilizado no ensaio. Alguns métodos alternativos foram propostos a fim de substituir

Quadro 4: Prazos estimados para substituição definitiva do uso de animais na avaliação de alguns desfechos toxicológicos investigados pela indústria de cosméticos

Desfechos toxicológicos	Proibições definitivas da comercialização de produtos cujos ingredientes tenham sido testados <i>in vivo</i>	Validações de metodologias alternativa	Substituições plenas do uso de animais na Comunidade Econômica Européia
Corrosividade cutânea	2009	Já validado	OECD 431
Fototoxicidade aguda	2009	Já validado	OECD 432
Absorção dérmica	2009	Já validado	OECD 428
Irritação dérmica	2009	Já validado	2008
Irritação ocular	2009	2008	2009

Fonte: União Européia, 2003

os animais utilizados na etapa de soroneutralização. Destaca-se, neste contexto, o teste de inibição de ligação da toxina (ToBI) realizado *in vitro* (ESAC/ECVAM, 2000). Assim, mesmo que permanecendo a necessidade de animais na etapa de imunização, a implementação de ensaios *in vitro* para avaliação da soroneutralização permite uma redução significativa do número de animais utilizados (*i.e.* cerca de 70 animais por lote de cada produto analisado).

Nas circunstâncias em que o teste em animais não possa ser substituído por um único método alternativo (o que parece hoje ser a situação para alguns testes, como por exemplo, o teste de irritação ocular de Draize), o desenvolvimento de esquema de avaliação que envolva uma bateria de testes deve ser levado em consideração (Figura 1) podendo também ser desenvolvido um sistema hierárquico no qual os animais somente sejam utilizados para a confirmação da ausência de toxicidade, reduzindo ao máximo o risco desses

animais sofrerem quaisquer efeitos tóxicos (Spielmann e Goldberg, 1999).

Hoje, apesar das duras críticas e de existirem controvérsias quanto à validade dos resultados, o teste de irritação ocular de Draize permanece preconizado em diretrizes internacionais para avaliação de segurança de substâncias químicas (OECD, 2002) e é o único teste aceito pela entidade regulatória brasileira, *i.e.* ANVISA, para a avaliação do efeito irritante ocular de produtos sujeitos à ação da Vigilância Sanitária.

Na questão específica do controle da qualidade de cosméticos, esta situação gera um importante impasse, que dificulta enormemente a exportação de nossos produtos para outros países. Isto porque, enquanto o Brasil exige a comprovação de segurança de cosméticos através de testes *in vivo*, a Europa já proíbe desde 2004 a comercialização de produtos acabados testados em animais e estabelece novos prazos para a proibição do uso de animais na avaliação de segurança de ingredientes isolados (por

exemplo, tensoativos) utilizados em cosméticos em países membros da Comunidade Econômica Européia (União Européia, 2003), conforme demonstrado na Quadro 4.

Considerações Finais

A pressão política exercida por setores ativistas que lutam em defesa dos direitos dos animais tem gerado grande impacto na pesquisa científica, sobretudo na área biomédica. Neste contexto, pode-se dizer que diversos setores da indústria, entre elas as áreas de cosméticos, imunobiológicos e fármacos, assim como órgãos governamentais de regulamentação e controle da qualidade de produtos, estão sob crescente pressão para que busquem, sempre que possível, substituir a experimentação animal por metodologias alternativas.

Além disso, é importante ressaltar que o controle da qualidade e segurança de insumos para a saúde

EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

é ferramenta essencial para a garantia da Saúde Pública e o desenvolvimento de metodologias efetivas para o alcance deste objetivo é papel primordial da Vigilância Sanitária.

Por fim, cabe destacar a substituição dos animais por metodologias *in vitro* como uma realidade mundial e o fato do Brasil estar trabalhando na busca por este objetivo, sobretudo no que tange a busca por metodologias aplicadas ao controle da qualidade de produ-

tos. Porém, sabe-se que ainda existe um longo caminho pela frente e que este fato se configura em uma revolução nos padrões de condução da experimentação científica mundial. Acredita-se, no entanto, que revoluções são necessárias e úteis para o progresso da humanidade, em todos os seus aspectos, quando conduzidas de maneira pensada, metódica e organizada.

Agradecimentos: Os autores agradecem à Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado de CLCA e à Coordenação de Pós-graduação em Vigilância Sanitária pelo apoio durante o decorrer do curso. Parte do estudo de desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais - conduzido pelo nosso grupo de pesquisa - recebeu apoio financeiro do PDTSP-SUS/Fiocruz e do convênio Brasil-Alemanha CNPq/MCT/DAAD/BMbf e do do Edital MCT/CNPq 14/2008.

Referências Bibliográficas

ABREU, C.L.C. Avaliação da citotoxicidade induzida por produtos cosméticos pelo método de quantificação de proteínas totais em células 3T3. Rio de Janeiro, 2008. 101p. Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz

ALVES, M.J.M., COLLI, W. Experimentação com animais: Uma polêmica sobre o trabalho científico. **Ciência Hoje**, v.39, n. 231, p. 25-29. 2006

ANVISA. Guia para a avaliação da segurança de produtos cosméticos. Brasília, 2003. 47p.

BALLS, M., FENTEM, J. Progress towards the validation of alternatives tests. *Alternatives to Laboratory Animals (ATLA)*, v.25, p.33-43, 1997

BASKETEER, D.A., KIMBER, I. Information derived from sensitization test methods: test sensitivity, false positives and false negatives. **Contact Dermatitis**, v.56, n.1, p.1-4, 2007

BASKETEER, D.A., GERBERICK, G.F., KIMBER, I. The local lymph node assay: Current position in the regulatory classification of skin sensitizing chemicals. **Cutaneous and Ocular Toxicology**, v. 26, n.4, p.293-301, 2007

BOTHAM, P.A. **Acute Systemic Toxicity. Institute for Laboratory Animals Research (ILAR)**, v.43 (Supplement) 2002

CORRADO, M.C. Uso do HET-CAM como modelo alternativo ao teste de irritação da mucosa oral em hamsters na avaliação do potencial tóxico de dentífricos. Rio de Janeiro, 2007. 89p. Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz

DRAIZE, J.H., WOODARD, G., CALVERY, H.O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.82, n.3, p.377-390, 1944

ESAC/ECVAM. Toxin Binding Inhibition (ToBI) test for batch potency testing of tetanus vaccines for human use. EUROPEAN COMMISSION. Institute for Health and Consumer Protection. European Center for Validation of Alternative Methods. 2000

ESAC/ECVAM. ESAC statement on the OECD adopted Test Guidelines for acute oral toxicity testing. EUROPEAN COMMISSION. Institute for Health and Consumer Protection. European Center for Validation of Alternative Methods. 2007

HENDRIKSEN, C.F.M. A short history of use of animals in vaccine development and quality control. **Developments in Biological Standardization**. v.86, p.3-10, 1994.

HUDSON, M. Why do the numbers of laboratory animals

procedures conducted continue to rise? An analysis of the Home Office Statistics of Scientific Procedures on Living Animals: Great Britain 2005. **Alternatives to Laboratory Animals (ATLA)**, v. 35, p.177-187, 2007

LOVEREN, H.V., COCKSHOT, A., GEBEL, T., UNDERTREMY, U., De JONG, W.H., MATHESON, J., MCGARRY, H., MUSSET, L., SELGRADE, M.K., VICKERS, C. Skin sensitization in chemical risk assessment: Report of a WHO/IPCS international workshop focusing on dose-response assessment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.50, n.2, p.155-199, 2008

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neurosciences and Behavioral Researches**. Washington DC. National Academy Press. 2003

OECD Test Guideline 405. Acute eye irritation/corrosion, in: **OECD Guidelines for testing of Chemicals**. Paris, 2002

PAIXÃO, R.L. Experimentação Animal: Razões e Emoções para Uma Ética. Rio de Janeiro, 2001. 189p. Tese (Doutorado) - Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca (ENSP). Fundação Oswaldo Cruz

PRESGRAVE, O.A. Alternativas para animais de laboratório: do animal ao computador. In: ANDRADE, A., PINTO, S.C., DE OLIVEIRA, R.S. (ed). **Animais de Laboratório – Criação e Experimentação**, Rio de Janeiro, 2002, p.361-367
RAYMUNDO, M.M., GOLDIM, J.R. **Ética da pesquisa em modelos animais**. Bioética, v.10, n.1, p. 31-44, 2002

ROWAN, A.D. **The three R's (reduction, refinement and replacement) of animals in experimentation: a historical**

perspective. American Anti-vivisection Society. PA, p. 6-12, 1997

ROWAN, A.N., ANDRUTIS, K.A. Alternatives - a sociopolitical commentary from the USA. **Alternatives to Laboratory Animals (ATLA)**, v.18, p.3-10, 1990

SINGER, P. Animal Liberation. **Towards an end to man's inhumanity to animals**. Granada Publishing, 1975

SPIELMANN, H. **Animal use in the safety evaluation of chemicals: Harmonization and emerging needs**. Institute for Laboratory Animal Research (ILAR), v.43, n.2, p. 11-17, 2002

SPIELMANN, H., GOLDBERG, A.M. *In vitro* Methods. In: HANS, M., SCHÄFER, G.S., ROGER, O.M., WELSH, F. (ed). **Toxicology**. San Diego: Califórnia, 1999, p.1131-1138

UNIÃO EUROPÉIA. Directive 2003/15/EEC. **Amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the law of the Member States relating to cosmetic products**. Bruxelas, 2003

UNIÃO EUROPÉIA. **5th report on statistics on the number of animals used for experimental and other scientific purposes in the member states of the European Union**. Bruxelas, 2007

WILHELMUS, K. R. Therapeutic Reviews: the Draize Eye Test. **Survey of Ophthalmology**, v.45, n.6, p.393-397, 2001

ZURLO, J., RUDACCILE, D., GOLDBERG, A.M. The Three R's: the way forward. **Environmental Health Perspectives**. v.104, n.8, p.878-880, 1996