



***MERCOSUL/CMC/DEC. N° 23/14  
COOPERAÇÃO NO MERCOSUL  
FORMULÁRIO PERFIL TÉCNICO DE PROJETO***

**Nome do Projeto:**

Plataforma Regional de Métodos Alternativos do MERCOSUL – PReMASul

**Objetivo Geral:**

Inserir o tema “Métodos alternativos” no MERCOSUL e promover a criação de uma infraestrutura laboratorial e de recursos humanos especializados capazes de implantar métodos alternativos ao uso de animais em seus respectivos países.

**Data de elaboração:** 20.06.2015

**Data de atualização:** 16.11.2015

**Localização geográfica do projeto:**

Primeira etapa: Brasil

Etapas seguintes: países membros do MERCOSUL

**MARCO INSTITUCIONAL**

**Grupo de Trabalho Beneficiário:**

Comissão Plataforma Biotecsul / RECyT

**Instituições Executora nos Estados Partes:**

Ministério de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva – Argentina

Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação – Brasil

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología – Paraguay

Ministerio de Educación y Cultura – Uruguay

Ministerio del Poder Popular para Educación Universitaria, Ciencia y Tecnología – Venezuela

**Unidade de Gestão do Projeto:** Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI),  
Brasil

**Duração:** três anos (36 meses)

**Montante estimado do projeto:** US\$ 7,5 milhões

**Montante estimado da contrapartida:** a negociar

**Pontos focais do projeto por instituição / Estado Parte:**

**Fórum:** Comissão Plataforma Biotecsul / RECyT

**Estado Parte Argentina:**

Nome completo: Héctor Omar Pralong, a confirmar

Instituição: Ministério de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva – MINCYT

Telefone: +54 11 4899-5000 int 4124

Página Web: <http://www.mincyt.gob.ar>

E-mail: [hpralong@mincyt.gob.ar](mailto:hpralong@mincyt.gob.ar)

**Estado Parte Brasil:**

Nome completo: Luiz Henrique Mourão do Canto Pereira, a confirmar

Instituição: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação – MCTI

Telefone: +55 61 2033.7623

Página Web: <http://www.mcti.gov.br>

E-mail: [luiz.canto@mcti.gov.br](mailto:luiz.canto@mcti.gov.br)

**Estado Parte Paraguai:**

Nome completo: José Schvartzman, a confirmar

Instituição: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Telefone: +595 21 506223

Página Web: <http://conacyt.gov.py>

E-mail: [jschvartzman@conacyt.gov.py](mailto:jschvartzman@conacyt.gov.py)

**Estado Parte Uruguai:**

Nome completo: Graciela Morelli, a confirmar

Instituição: Ministerio de Educación y Cultura/ Dirección de Ciencia y Tecnología –  
MEC/DICyT

Telefone: +598 29014285

Página Web: <http://mec.gub.uy/dicyt>

E-mail: [gmorelli@dicyt.gub.uy](mailto:gmorelli@dicyt.gub.uy)

**Estado Parte Venezuela:**

Nome completo: María Eugenia Carrasquel, a confirmar

Instituição: Ministerio del Poder Popular para Educación Universitaria, Ciencia y Tecnología – MPPEUCT  
Telefone: +0212 555-74-07  
Página Web: <http://www.mppeuct.gob.ve>  
E-mail: [mcarrasquel@mppeuct.gob.ve](mailto:mcarrasquel@mppeuct.gob.ve)

## SÍNTESE DA PROPOSTA

### 1. Contextualização e antecedentes

A criação de uma Plataforma Regional de Métodos Alternativos ao Uso de Animais de Experimentação vem ao encontro do panorama internacional que fomenta e privilegia o princípio dos 3Rs (*Reduction* ou Redução, reflete a obtenção de nível equiparável de informação com o uso de menos animais; *Refinement* ou Refinamento promove o alívio ou a minimização da dor, sofrimento ou estresse do animal; *Replacement* ou Substituição, estabelece que um determinado objetivo seja alcançado sem o uso de animais vertebrados vivos). Diversos são os produtos de uso corrente que requerem testes de segurança e eficácia antes de sua autorização comercial e que geralmente utilizam modelos animais. É o caso de cosméticos, produtos saneantes, agrotóxicos e fármacos e medicamentos. Neste contexto, destaca-se a União Europeia, que desde 2013 proíbe a venda, em seu território, de produtos cosméticos testados em animais.

O MERCOSUL é privilegiado por deter uma porcentagem considerável da biodiversidade mundial. As possibilidades advindas de seu uso sustentável são inúmeras, destacando-se alimentos, fármacos, cosméticos e produtos químicos diversos. Para que produtos inovadores produzidos a partir da biodiversidade sejam comercializados, à exceção dos alimentos, são necessários testes toxicológicos que, muitas vezes, utilizam animais. Ante a iniciativa da União Europeia de banir os produtos cosméticos testados em animais, para ser competitivo num mercado cada vez mais globalizado, faz-se necessário adequar a produção à luz de inovações tecnológicas que propiciem novos testes toxicológicos capazes de gerar resultados tão confiáveis quanto aqueles gerados por meio da experimentação com animais. Abre-se, portanto, uma oportunidade para os Estados Parte do MERCOSUL.

No Brasil, a temática de métodos alternativos ao uso de animais de experimentação aparece timidamente na legislação que regulamenta o uso de animais para fins científicos, mas compete ao Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal – CONCEA monitorar e avaliar as técnicas alternativas que substituam animais. Em 2011, o MCTI estruturou a RENAMA (Rede Nacional de Métodos Alternativos), cujos objetivos incluem o estímulo à implantação de ensaios alternativos e o treinamento técnico nas metodologias necessárias, além de promover o desenvolvimento, a validação e a certificação de novos métodos alternativos ao uso de animais. Atualmente, a RENAMA conta com competências instaladas no país que poderão ser compartilhadas com os sócios do MERCOSUL.

Na Argentina, de acordo com o artigo “Bienestar animal y el uso de animales de laboratorio en la experimentación científica” (2014), publicado pela Revista Argentina de Microbiología, alguns métodos alternativos já vem sendo utilizados sem, contudo, existir uma legislação que regule o uso científico de animais ou que incentive o uso de tais técnicas. Também existe na Argentina a Comisión Nacional Asesora de Bienestar

Animal foi criada em 2002 e sua atuação se restringe às espécies agropecuárias para produção de alimentos.

O Uruguai dispõe de legislação específica para uso de animais com fins científicos, bastante semelhante à brasileira, no entanto, não faz menção ao estímulo a técnicas alternativas. No Uruguai, a Comisión Nacional de Experimentación Animal – CNEA atua exclusivamente em temas ligados à experimentação animal no ensino e na pesquisa científica.

O Paraguai dispõe de legislação específica de bem estar animal, fortemente aplicável a animais domésticos. Não há legislação relativa ao uso científico de animais em vigor e tampouco a respeito de métodos alternativos ao uso de animais de experimentação.

Na Venezuela, o Código de Bioética e Biossegurança (1999) estabelece normas gerais para o uso de animais com fins científicos. Nesse país, houve algum avanço com a constituição dos CIUCAs (Comités Institucionales para el Uso y Cuidado Animal), mas não existe uma legislação específica, nem uma instituição nacional que regule o uso de animais em pesquisa científica e que promova o desenvolvimento e uso de métodos alternativos.

No âmbito da Reunião Especializada de Ciência e Tecnologia – RECyT, a presente proposta está alinhada aos objetivos estratégicos e aos princípios do Programa-Quadro de Ciência, Tecnologia e Inovação do MERCOSUL 2015-2019. Ante a o problema apresentado, surge uma oportunidade de desenvolvimento científico tecnológico para o MERCOSUL em uma área ainda incipiente no mundo. Capacitar nossos cientistas e técnicos e promover o desenvolvimento e a validação de métodos alternativos ao uso de animais, pode representar um diferencial nos produtos oriundos da biodiversidade do MERCOSUL. É ciência, tecnologia e inovação atuando para que a economia do conhecimento possa contribuir incisivamente em mais emprego e renda para a população do bloco.

## **2. Objetivo Geral**

O projeto tem como objetivo geral inserir o tema “Métodos alternativos” no MERCOSUL e promover a criação de uma infraestrutura laboratorial e de recursos humanos especializados capazes de implantar métodos alternativos ao uso de animais em seus respectivos países.

Por se tratar de um tema ainda incipiente no mundo, o problema apresentado constitui-se numa importante oportunidade de desenvolvimento conjunto de capacidades científicas e tecnológicas, o que contribuirá sobremaneira para que os países da região sejam reconhecidos entre os pioneiros no desenvolvimento de técnicas alternativas ao uso de animais.

A longo prazo, espera-se ainda que os países do MERCOSUL possam se firmar como referências na América Latina na substituição de animais de experimentação em diversos ensaios pré-clínicos e não-clínicos.

## **3. Objetivos específicos**

Com este projeto, pretende-se, especificamente:

- (i) Estimular, no MERCOSUL, a adoção de métodos alternativos validados;
- (ii) Promover a capacitação e o treinamento de recursos humanos qualificados;

- (iii) Promover a pesquisa, o desenvolvimento e a validação de novos métodos alternativos;
- (iv) Criar competência laboratorial no MERCOSUL visando à prestação de serviços para o setor industrial, em consonância com as diretrizes da OCDE.

A partir do alcance destes objetivos, espera-se que os países do bloco possam estar aptos a desenvolver e validar métodos alternativos ao uso de animais que representem não apenas um avanço científico-tecnológico, mas também um meio para o desenvolvimento e a promoção de produtos inovadores advindos do uso sustentável da biodiversidade. Este projeto pode ser, ainda, um incentivo para um maior envolvimento do setor industrial do MERCOSUL em P,D&I.

Ao lograr êxito com esta iniciativa, será possível ao MERCOSUL, a longo prazo, firmar-se como referência na América Latina em métodos alternativos ao uso de animais de experimentação e, com isso, poderá, além de desenvolver novos produtos, oferecer serviços para indústrias internacionais, serviços estes de alto nível e padronizados em conformidade com a normatização internacional.

Considerando-se o contexto atual dos países do bloco na temática, o Brasil pode contribuir significativamente para o primeiro passo da iniciativa proposta, que seria a capacitação de pessoal. A partir desse passo, estarão aumentadas as possibilidades de aprendizagem mútua e de aprimoramento da infraestrutura laboratorial dos países do MERCOSUL, o que diminuirá as assimetrias existentes entre eles, pelo menos no que diz respeito à área de C,T&I.

#### **4. Análise dos problemas, justificativa e pertinência do projeto**

Ante o cenário internacional, cada vez mais propício a reduzir drasticamente o uso de animais em ensaios toxicológicos, faz-se necessário promover no âmbito do MERCOSUL a internalização, o desenvolvimento, a certificação e a validação de tecnologias e de métodos alternativos ao uso de animais para os testes de segurança e eficácia de produtos de interesse da saúde (fármacos, medicamentos, cosméticos, saneantes e agrotóxicos). No território do bloco, encontra-se parte significativa da biodiversidade mundial que, sendo adequadamente explorada, pode gerar produtos e processos com as mais diversificadas utilidades. Trata-se, portanto, de uma iniciativa estratégica para o MERCOSUL.

O Brasil deseja intercambiar sua experiência na área de métodos alternativos ao uso de animais com os demais países do bloco, tendo em conta um futuro bem próximo, no qual haverá drástica diminuição no uso de animais de experimentação para testes de produtos diversos, o que contribuirá grandemente com a economia baseada no conhecimento, com ênfase na bioeconomia. O benefício do investimento na formação e capacitação de pessoal se dará em benefício mútuo dos países do bloco, com a liderança do Brasil nesse processo, uma vez que este país já possui uma Rede estruturada, com objetivos definidos e com significativo avanço tecnológico, atraindo inclusive a atenção do setor industrial e de outros blocos econômicos.

Neste sentido e em concordância com o princípio da solidariedade, esta proposta de projeto, em uma etapa posterior, apresenta a possibilidade de consecução de avanço no desenvolvimento dos países do bloco, no que concerne a novas tecnologias no campo de ensaios de segurança e eficácia de diversos produtos de interesse da saúde. Numa sociedade globalmente competitiva, o uso e o desenvolvimento de métodos alternativos

em testes de produtos diversos, especialmente cosméticos e saneantes é estratégico. Enquanto bloco econômico, o MERCOSUL pode se beneficiar ao investir esforços em uma área ainda incipiente no mundo, podendo ser, futuramente, reconhecido como liderança mundial no desenvolvimento e validação de métodos alternativos.

Como exemplo da problemática envolvendo métodos alternativos, pode-se citar empresas de cosméticos do MERCOSUL, que têm contratado testes toxicológicos de seus produtos na Europa, em empresas prestadoras de serviços, que oferecem tais testes com métodos alternativos validados e certificados internacionalmente. Isso agrega valor aos produtos, ao tempo em que abre portas nos mercados internacionais. Não obstante, o custo das empresas é grande, por ter que contratar serviços em outro continente. Em havendo infraestrutura e pessoal capacitado no MERCOSUL para realizar tais testes nos níveis de exigência internacionais, tais empresas, além de laboratórios públicos e privados, poderão se beneficiar enormemente.

A temática proposta tem alinhamento com outra iniciativa em curso no âmbito da RECyT, que é o projeto “Programa de Apoio ao Desenvolvimento de Biotecnologias no MERCOSUL II – Biotech II”. Ao financiar a pesquisa, o desenvolvimento e a inovação conjuntamente entre os sócios no projeto financiado pela União Europeia, tem-se a possibilidade de gerar produtos e processos biotecnológicos. Para aqueles produtos da área da saúde, para que possam eventualmente alcançar o mercado, são necessários testes toxicológicos. Caso estes sejam feitos utilizando métodos alternativos validados e internacionalmente certificados, agrega-se mais valor a estes produtos e os torna mais aptos a mercados específicos, como a Europa, por exemplo.

## **5. Resultados necessários para alcançar os objetivos específicos do projeto**

Após um ano, durante o qual serão ofertados de três a cinco cursos de capacitação, espera-se ter no MERCOSUL recursos humanos capacitados para o desenvolvimento de metodologias para substituição de animais em testes pré-clínicos, especialmente de cosméticos, fármacos, medicamentos, saneantes e agrotóxicos. Pretende-se, numa primeira etapa, capacitar entre 40 e 60 profissionais oriundos dos cinco países membros do MERCOSUL.

A médio prazo, espera-se que o MERCOSUL disponha de uma Plataforma qualificada e apta (segundo as normas da OECD) a atender às expectativas de mercados externos com relação a produtos que necessitem ensaios toxicológicos, especialmente cosméticos, considerando-se a rica biodiversidade que a região abriga.

A longo prazo, espera-se que o bloco possa se firmar como uma referência na América Latina na substituição de animais de experimentação em diversos ensaios pré-clínicos e não-clínicos.

Considerando-se que os projetos em C,T&I normalmente geram conhecimento, este projeto busca resultar, ademais, uma mudança na cultura do bloco no que diz respeito aos ensaios toxicológicos em geral, mas especialmente para cosméticos e saneantes.

## **6. Lista das principais atividades do projeto e custos estimados**

- (i) Primeira etapa: capacitação de recursos humanos em metodologias e técnicas alternativas – custo estimado: R\$ 200 mil + contrapartida dos parceiros. Esta atividade será a primeira a ser desenvolvida e o Brasil, buscando nivelar os parceiros, oferecerá aos países do bloco a possibilidade de capacitação em

instalações brasileiras já adequadas à validação e desenvolvimento de métodos alternativos, nos laboratórios centrais da RENAMA, como o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS/FIOCRUZ e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO. Ainda, o Brasil oferecerá hospedagem e alimentação durante o período do curso. A contrapartida dos demais Estados Parte se resume aos custos de transporte de seus respectivos participantes.

- (ii) Segunda etapa: incremento da Infraestrutura Laboratorial e Desenvolvimento e Validação de Métodos Alternativos: US\$ 7,5 milhões. Esta atividade demanda captação de recursos externos ao MERCOSUL. A Rede brasileira, RENAMA, tem obtido sucesso na captação de recursos junto parceiros públicos e privados, modelo que poderá ser aplicado ao MERCOSUL.

## **7. Atores envolvidos no projeto**

De imediato, estão envolvidos neste projeto os pontos focais da Comissão Plataforma Biotecsul – CPB. A proposta foi apresentada pelo ponto focal do Brasil e após discussões e consultas internas com os Estados Parte, chegou-se a um consenso sobre a importância de se levar a cabo este projeto. Ademais, os pontos focais dos demais países membros deram grande contribuição a esta proposta.

A segunda etapa do projeto, que será elaborada detalhadamente, para apresentação a possíveis fomentadores/financiadores, será construída conjuntamente com todos os pontos focais da Comissão Plataforma Biotecsul e, eventualmente, poderá contar com o auxílio de *experts*.

Neste contexto, cabe observar que esta proposta está alinhada aos objetivos estratégicos e aos princípios do Programa-Quadro de Ciência, Tecnologia e Inovação do MERCOSUL 2015-2019. Além disso, apresenta forte aderência aos seus Eixos Programáticos, notadamente o Eixo I, de Dimensão Estratégica, pois está relacionado a Biotecnologia e Saúde e fármacos; e o Eixo IV, que abarca os Sistemas Nacionais de Ciência, Tecnologia e Inovação, uma vez que este eixo versa sobre o fortalecimento da integração dos sistemas de C,T&I do MERCOSUL, de forma a adequar e expandir a infraestrutura comum de laboratórios e centros de referência e a ampliação do pessoal qualificado, neste caso, para a condução e execução de projetos de P,D&I com importante aplicação para a indústria.

Por tratar-se de tema ainda incipiente no mundo e intrinsecamente relacionado a atividades de P,D&I, os atores afetados mais diretamente por este projeto são as ICTs do MERCOSUL, empresas e laboratórios públicos e privados que ofereçam serviços de testes toxicológicos. Além de pessoal capacitado e infraestrutura laboratorial, a obtenção de certificações internacionais requeridas para tais testes são um importante requisito e a garantia da qualidade do serviço prestado. Isto é um atrativo para indústrias estrangeiras e, especialmente, aquelas instaladas no território do bloco.

Em seguida, o setor industrial dos países, especialmente de cosméticos, saneantes, agrotóxicos e outros produtos químicos poderão ser beneficiados, pois seus produtos terão a oportunidade do diferencial dos testes por que passarem, o que proporcionará mais mercados.

Alguns sócios poderão tomar parte no projeto, especialmente no que diz respeito ao seu financiamento. Entre estes, destacam-se as próprias indústrias de cosméticos, saneantes

e agrotóxicos, além de agências de fomento internacionais e a União Europeia, a exemplo do projeto Biotech II.

## **8. Mudanças e inovações geradas pelo projeto**

A primeira mudança esperada é a inclusão do tema na pauta do MERCOSUL, tendo em conta que trata-se de um área incipiente e que afeta diretamente a P,D&I em áreas estratégicas do bloco, notadamente fármacos, medicamentos e agrotóxicos.

À exceção do Brasil, os membros do MERCOSUL não possuem políticas ou ações de incentivo voltadas à diminuição ou até mesmo ao banimento completo do uso de animais em alguns testes toxicológicos, experimentos e ensino. Desta forma, a partir do compartilhamento da bem sucedida experiência brasileira, espera-se levar aos demais países do bloco inovação tecnológica e metodológica no que concerne à substituição de animais de experimentação.

Espera-se ainda que o MERCOSUL, a partir da execução deste projeto, possa dispor de Plataforma qualificada e apta (segundo as normas da OCDE) a atender às expectativas de mercados externos com relação a produtos que necessitem ensaios toxicológicos, especialmente cosméticos, considerando-se a rica biodiversidade que a região abriga.

Portanto, este projeto propõe uma mudança estrutural e, mais ainda, conceitual na área de C,T&I para a saúde.

## **9. Análise dos riscos e fatores que possam incidir negativamente na execução do projeto**

O principal risco que pode incidir negativamente na execução do projeto é o financiamento insuficiente e a falta de garantia orçamentária dos Estados Parte no que concerne à contrapartida. Para a primeira etapa, o MCTI possui meios para receber participantes do MERCOSUL no Brasil, garantindo, além dos insumos laboratoriais que serão necessários, sua hospedagem e alimentação durante o período do curso.

A execução do projeto terá mais êxito se houver o envolvimento do setor industrial dos países do bloco, uma vez que este será o principal setor da economia a ser beneficiado com os resultados que esperamos alcançar.

## **10. Sustentabilidade do projeto**

Este projeto visa, em última análise, à capacitação dos países do MERCOSUL para a realização de testes de segurança de produtos de interesse da saúde. Neste sentido, a manutenção da infraestrutura laboratorial requererá algum envolvimento dos Estados Parte, o que pode ocorrer pelos meios de fomento usuais de cada país.

Especialmente no que concerne à possibilidade de prestação de serviços, os laboratórios poderão se auto sustentar e poderão, inclusive, gerar emprego e renda para seus respectivos países.

## 11. Outros

A Argentina já manifestou seu interesse em oferecer pelo menos um curso na temática. Os cursos propostos serão executados após apreciação pela CPB. Para iniciar o projeto, o Brasil oferecerá quatro cursos de 40 horas/aula, conforme as fichas abaixo.

<b>CURSO 1</b>
<b>1. TÍTULO DO CURSO:</b> Curso teórico-prático para utilização de Métodos Alternativos ao uso de animais <i>in vitro</i> para avaliação do potencial genotóxico de substâncias químicas.
<b>2. COORDENADOR DO CURSO:</b> Isabella Fernandes Delgado  <b>LOCAL DE EXECUÇÃO:</b> Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS / FIOCRUZ - Av. Brasil nº 4365 - Manguinhos, Rio de Janeiro - RJ, CEP 21040-900
<b>3. OBJETIVOS:</b> Capacitar e treinar pessoal em duas metodologias (alternativas ao uso de animais) utilizadas para avaliar o potencial genotóxico de uma substância: o ensaio cometa e o ensaio de micronúcleo (TG 487 OECD). Desta forma, os participantes terão base teórica e mínima experiência prática para multiplicar conhecimento e permitir a implantação destes ensaios no seu núcleo de origem, contribuindo para o aumento da capacidade laboratorial de oferta de ensaio no Brasil. Tais métodos são barreiras técnicas de exportação de produtos para a Comunidade Europeia e atualmente exigidos por regulamentação nacionais.
<b>4. JUSTIFICATIVA:</b>  <b>4.1 PANORAMA REGULATÓRIO</b>  Um marco na utilização de animais na experimentação científica foi a publicação do livro “ <i>Principles of Human Experimental Technique</i> ” pelos pesquisadores William Russel e Rex Burch em 1959. Com isto, teve início o movimento que preconiza o bem-estar de animais de experimentação e que discute a utilização de animais abordando questões éticas e científicas. A partir deste marco, o princípio dos 3R’s ( <i>Reduction, Refinement e Replacement</i> ) para o uso de animais é estabelecido: a <i>redução</i> reflete a obtenção de nível equiparável de informação com o uso de menos animais; o <i>refinamento</i> promove o alívio ou a minimização da dor, sofrimento ou estresse do animal; a <i>substituição</i> estabelece que um determinado objetivo seja alcançado sem o uso de animais vertebrados vivos.  Métodos Alternativos ao Uso de Animais podem ser definidos como qualquer método que possa ser usado para substituir, reduzir ou refinar o uso de animais de experimentação na pesquisa biomédica, ensaios ou ensino.  Internacionalmente, o princípio dos 3R’s entrou vigor através da regulamentação de cosméticos e químicos (Diretiva CE Nº 76/768/EEC, de 27 Julho de 1976 e o regulamento REACH <sup>1</sup> para registro e comercialização de químicos) na Comunidade Europeia.  Como o setor cosmético foi o mais pressionado para a não utilização de animais (Sétima emenda à

<sup>1</sup> REACH é o programa regulatório de químicos e seu uso seguro na [\(EC 1907/2006\)](#). O programa envolve *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical substances*. A lei entrou em vigor em 1<sup>o</sup> de junho de 2007.

Diretiva EC 76/768/EEC de cosméticos de 27 Julho de 1976, que proíbe a comercialização de produtos cosméticos que tenham sido testados em animais desde março de 2013), os desfechos tópicos relacionados à avaliação toxicológica destes produtos foram os que tiveram mais avanços nos últimos anos. Como exemplo, podemos citar o desenvolvimento de equivalentes de epiderme *in vitro* para abordar a irritação/corrosão cutânea e recentes ensaios que substituem o uso de animais para identificação e classificação de sensibilizadores cutâneos.

De forma similar, a regulamentação de químicos (REACH) da Comunidade Europeia, em vigor desde 2007, evita os testes em animais e prefere os testes alternativos *in vitro*. O propósito do REACH é registro, avaliação e autorização de químicos para sistematicamente avaliar os riscos para a saúde humana e meio-ambiente de mais de 30.000 substâncias químicas que são produzidas ou importadas para Comunidade Europeia num volume de mais de uma tonelada por ano.

Com base na atual regulamentação de cosméticos [*Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products*] e a regulamentação REACH, os ensaios alternativos ao uso de animais representam uma barreira técnica à exportação, na medida em que setores impactados por estas regulamentações dependem da realização destes ensaios para a avaliação dos seus produtos.

No Brasil foi construído nos últimos cinco anos um arcabouço legal para que iniciativas que visam à disseminação, desenvolvimento e validação de Métodos Alternativos no país, permitindo que a superação de barreiras técnicas, inserção do Brasil no processo internacional de validação de métodos, entre outras, sejam possíveis.

Destaca-se a lei Arouca (nº 11.794, de 08 de outubro de 2008) que versa sobre o uso de animais na experimentação e no ensino, regulamentada através do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, que estabelece o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) — que entre outras atribuições tem a responsabilidade de monitorar e avaliar a introdução de métodos alternativos.

O CONCEA, através das Resoluções Normativas nº. 17 e nº.18 (2014) reconheceu 17 métodos alternativos ao uso de animais como validados e aceitos em território nacional, que passam a ser obrigatórios a partir de 2020. Além disto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) acompanhou a decisão do CONCEA, exigindo a utilização de métodos alternativos para pedidos de registro de medicamentos, cosméticos, produtos para saúde, produtos de limpeza, entre outros produtos.

Para disponibilizar no país as condições necessárias para a disseminação, desenvolvimento e validação de métodos alternativos ao uso de animais, a Rede Nacional de Métodos Alternativos foi criada pelo MCTI (Portaria nº 491) em 3 de julho de 2012. Soma-se a esta iniciativa a criação do Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (Bracvam) pelo Instituto Nacional de Controle de qualidade em saúde (INCQS/Fiocruz).

O Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro) foi designado como um dos três Laboratórios Centrais da RENAMA – conjuntamente ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) e ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio).

A RENAMA tem por objetivos:

- I - estimular a implantação de ensaios alternativos ao uso de animais através do auxílio e do treinamento técnico nas metodologias necessárias;*
- II - monitorar periodicamente o desempenho dos laboratórios associados através de comparações interlaboratoriais;*
- III - promover a qualidade dos ensaios através do desenvolvimento de materiais de referência químicos e biológicos certificados, quando aplicável;*
- IV - incentivar a implementação do sistema de qualidade laboratorial e dos princípios das boas práticas de laboratório (BPL); e*
- V - promover o desenvolvimento, a validação e a certificação de novos métodos alternativos ao uso de animais.*

Desta forma, a presente proposta, capitaneada por um dos laboratórios Centrais da RENAMA (Inmetro), que conta com a participação de especialistas da RENAMA, contribuirá para a disseminação dos métodos alternativos relevantes para o cenário internacional e nacional.

#### **4.2 METODOLOGIAS DE ENSAIO PROPOSTAS**

Conforme mencionado anteriormente, o CONCEA estabeleceu através da Resolução Normativa nº. 18 de 24 de setembro de 2014, por desfecho toxicológico, os métodos alternativos ao uso de animais que devem ser implementados no Brasil até 2020.

A validação científica de um método alternativo ao uso de animais tem seu início com a criação do primeiro Centro de Validação de Métodos Alternativos (ECVAM) na Comunidade Europeia em 1981, o atual EURL-ECVAM<sup>2</sup>. A validação consiste em demonstrar a reprodutibilidade e relevância de um dado método (científica e capacidade preditiva da resposta *in vivo*) para uma determinada aplicação. Estes métodos, validados conforme o documento guia nº. 34 (2015) da OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*) são em sua maioria desenvolvidos para avaliação de perigo de substâncias e podem ser agrupados de acordo com o desfecho toxicológico para o qual contribuem com informação (irritação cutânea, irritação ocular, etc.).

De interesse do presente curso, destacamos o seguinte desfecho e métodos reconhecidos:

- Para avaliação da genotoxicidade o CONCEA reconhece o método OECD TG 487 – Teste do Micronúcleo em Célula de Mamífero *in vitro*.

Vale lembrar que alterações genéticas em células somáticas e/ou germinativas estão associadas a efeitos graves para a saúde, o que, em princípio, podem ocorrer mesmo em níveis de exposição baixos a agentes tóxicos.

As mutações em células somáticas podem ocorrer em proto-oncogenes, genes supressores de tumores e/ou genes de reparo de DNA, e nestes casam levam a uma variedade de doenças genéticas, incluindo o câncer. E as mutações em células germinais podem levar a abortos espontâneos, infertilidade ou danos que são herdados pela prole e, possivelmente, para as gerações subsequentes. Além disto, o acúmulo de danos à molécula de DNA em células somáticas também um papel

---

<sup>2</sup> European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing  
<https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/>

importante em doenças degenerativas, como o envelhecimento acelerado, disfunção imune, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas.

Para uma adequada avaliação do potencial genotóxico três *endpoints* precisam ser avaliados: *mutação de genes, aberrações cromossômicas estruturais, aberrações cromossômicas numéricas*. Portanto, é necessária uma bateria de testes para uma cobertura adequada de todos os *endpoints*.

A avaliação do perigo genotóxico para os seres humanos geralmente requer que a substância seja testada em primeiro lugar na bateria de testes *in vitro*. De acordo com algumas legislações (por exemplo, REACH e a Directiva Cosméticos), se uma substância é negativa na bateria *in vitro*, ela é classificada como não genotóxico. Enquanto que um resultado positivo em um ou mais dos testes *in vitro* requer confirmação em ensaios *in vivo* apropriados. Outros requisitos regulamentares (por exemplo, ICH para produtos farmacêuticos e VICH para medicamentos veterinários) prevêm que a bateria de testes *in vitro* é sempre seguida por ensaios *in vivo*. Isto implica claramente que, apesar de estarem disponíveis vários testes *in vitro* para a avaliação da genotoxicidade, eles não podem substituir integralmente os ensaios em animais necessários para avaliar a segurança das substâncias.

Desta forma, os participantes terão base teórica e mínima experiência prática para multiplicar conhecimento e permitir a implantação destes ensaios no seu núcleo de origem.

**5. CARGA HORÁRIA:** 40 horas/curso

**Nº DE VAGAS:** 10 vagas, sendo seis para brasileiros.

**DATA DE REALIZAÇÃO DO CURSO:** 1º. Trimestre de 2016

## **6. REQUISITOS BÁSICOS PARA PARTICIPAR DO CURSO**

Graduados em Ciências Biológicas ou em Ciências da Saúde com experiência em cultura de células. Preferencialmente ter concluído ou estar cursando uma pós-graduação *strictu sensu* e/ou com atuação profissional relacionada aos métodos alternativos ao uso de animais.

## **7. CORPO DOCENTE**

*Helena Zamith* – Possui graduação em Farmácia Industrial pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (1977), mestrado em Biologia Celular e Molecular pela Fundação Oswaldo Cruz (1996) e doutorado em Biologia Celular e Molecular pela Fundação Oswaldo Cruz (2003). Atualmente é pesquisadora titular da Fundação Oswaldo Cruz responsável pelo Setor de Citotoxicidade e Genotoxicidade do Departamento de Farmacologia e Toxicologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). Tem experiência na área de Toxicologia Genética, atuando principalmente nos seguintes temas: genotoxicidade e mutagenicidade em células de mamífero, dentre eles o ensaio Cometa, bem como, na área de Farmacologia com métodos *in vivo* e *in vitro* em preparações de órgãos isolados e em cultura de células. Especialista no ensaio cometa.

*Isabella Delgado* – possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Gama Filho (1989) e doutorado em Ciências pela Universidade Livre de Berlim, Alemanha (1996). Atualmente é Vice Diretora de Pesquisa, Ensino e Projetos Estratégicos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Participa como docente permanente dos cursos de mestrado e doutorado do Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária (INCQS) é membro do comitê de avaliação da área Interdisciplinar da CAPES e representante do INCQS na

Rede Nacional de Métodos Alternativos ao uso de Animais (RENAMA). É editora executiva do periódico científico Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia e membro da equipe responsável pelo Programa de Residência Multiprofissional em Saúde na área de Vigilância Sanitária com ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços. Tem experiência na área de Vigilância Sanitária, principalmente nos seguintes temas: controle da qualidade de produtos, estudo de estratégias integradas para a avaliação de segurança de produtos para saúde e desenvolvimento/validação de métodos alternativos ao uso de animais.

*Izabel Vianna Villela* - Possui Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pelotas (1998), mestrado em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2001) e doutorado em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2006). Possui larga experiência como Responsável pela Garantia da Qualidade de laboratório, é avaliadora da Associação Rede de Metrologia e Ensaio do Rio Grande do Sul e avaliadora especialista do INMETRO. Tem experiência na área de Genética, com ênfase em Mutagênese, atuando principalmente nos seguintes temas: genotoxicidade, mutagenicidade, poluição ambiental, biomonitoramento, toxicologia pré-clínica, métodos alternativos ao uso de animais e sistemas da qualidade em laboratórios de ensaios (BPL e ISO17025). Especialista no ensaio de micronúcleo (TG 487 OECD).

#### 8. PROGRAMA:

CRONOGRAMA		
<b>DIA 1 (8h)</b>		
8h00-8h30	Boas-vindas, apresentação do curso, apresentação dos participantes	Isabella Delgado
8h30-9h00	Métodos Alternativos-RENAMA e contexto nacional	
9h00-12h00	Módulo teórico - Mecanismos de genotoxicidade e métodos existentes para avaliar o potencial genotóxico. Histórico de validação e apresentação do ensaio de Micronúcleo (OECD 487) e Cometa	Izabel Vianna Villela & Helena Zamith
Almoço		
13h00-17h00	Módulo teórico - Princípio e aplicação do teste; equipamentos e materiais; preparação de suspensões de células individuais; Módulo prático – Ensaio Cometa – Preparação de lâminas com agarose Módulo prático – Planejando os ensaios Mn vitro. Prática Sistema teste (CHO-K1)- Observação ao microscópio (morfologia esperada), tripsinização, plaqueamento para o ensaio	Izabel Vianna Villela & Helena Zamith
<b>DIA 2 (8h)</b>		
8h00-12h00	Módulo prático: Realização do Ensaio Cometa - Realização do teste com células de sangue humano; Tratamento mutagênico <i>in vitro</i> ; Preparação das lâminas; lise das preparações	Izabel Vianna Villela & Helena Zamith

	<i>Almoço</i>	
13h00-17h00	Módulo prático – Ensaio Mn vitro - Preparo da substância teste. Tratamento com extrato de fígado S9. Exposição do sistema teste às substâncias de interesse	Izabel Vianna Villela & Helena Zamith
<b>Dia 3 (8h)</b>		
8h00-12h00	Módulo prático – Ensaio Cometa - Tratamento alcalino e eletroforese; Neutralização e secagem das lâminas	Dra Izabel Vianna Villela & Helena Zamith
	<i>Almoço</i>	
13h00-17h00	Módulo prático – Ensaio de MN vitro, tratamento com colchicina e preparação das lâminas	Dra Izabel Vianna Villela & Helena Zamith
<b>Dia 4 (8h)</b>		
8h00- 12h00	Módulo prático – Ensaio Cometa - Coloração e avaliação microscópica	Izabel Vianna Villela & Helena Zamith
	<i>Almoço</i>	
13h00-17h00	Módulo prático – Ensaio Mn vitro – coloração e análise das lâminas	Izabel Vianna Villela & Helena Zamith
<b>Dia 5 (8h)</b>		
8h00-12h00	Módulo prático - interpretação de resultados e elaboração de relatório	Izabel Vianna Villela & Helena Zamith
	<i>Almoço</i>	
13h00-17h00	Módulo prático - interpretação de resultados e elaboração de relatório  Avaliação do curso	Izabel Vianna Villela & Helena Zamith

### **9. MECANISMOS DE AVALIAÇÃO:**

Participação no curso (mínimo de 75% de frequência) e elaboração de relatório de ensaio e preenchimento de ficha de avaliação do curso.

## **CURSO 2**

**1. TÍTULO DO CURSO:** Curso teórico-prático de Métodos Alternativos que utilizam a linhagem Balb 3T3 como sistema teste: citotoxicidade conforme GD 129 OECD & fototoxicidade conforme TG 432 OECD.

**2. COORDENADOR DO CURSO:** Luciene Bottentuit López Balottin

**LOCAL DE EXECUÇÃO:** Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – Inmetro, Av. Nossa Senhora das Graças no. 50, Xerém, Duque de Caxias, RJ, CEP 25250-025.

**3. OBJETIVOS:** Capacitar e treinar pessoal nas metodologias básicas de cultivo celular da linhagem Balb 3T3, como contagem de células, tripsinização, expansão, criopreservação e controle de qualidade e nas metodologias associadas ao ensaio de citotoxicidade e fototoxicidade também serão apresentadas e discutidas: preparo das soluções (cálculos de concentração e diluição); viabilidade celular por captação de vermelho neutro; cálculo de IC50, estimativa da dose inicial, cálculo de MPE e PIF. O curso terá um módulo sobre as metodologias *in silico*, aplicada aos desfechos relacionados no curso (toxicidade aguda oral e Fototoxicidade). Desta forma os participantes terão base teórica e mínima experiência prática para multiplicar conhecimento e permitir a implantação destes ensaios no seu núcleo de origem, contribuindo para o aumento da capacidade laboratorial de oferta de ensaio no Brasil e no mercosul. Tais métodos são barreiras técnicas de exportação de produtos para a Comunidade Europeia e atualmente exigidos por regulamentação brasileira.

### **4. JUSTIFICATIVA:**

#### **4.1 PANORAMA REGULATÓRIO**

Um marco na utilização de animais na experimentação científica foi a publicação do livro “*Principles of Human Experimental Technique*” pelos pesquisadores William Russel e Rex Burch em 1959. Com isto, teve início o movimento que preconiza o bem-estar de animais de experimentação e que discute a utilização de animais abordando questões éticas e científicas.

A partir deste marco, o princípio dos 3R's (*Reduction, Refinement e Replacement*) para o uso de animais é estabelecido: a *redução* reflete a obtenção de nível equiparável de informação com o uso de menos animais; o *refinamento* promove o alívio ou a minimização da dor, sofrimento ou estresse do animal; a *substituição* estabelece que um determinado objetivo seja alcançado sem o uso de animais vertebrados vivos.

Métodos Alternativos ao Uso de Animais podem ser definidos como qualquer método que possa ser usado para substituir, reduzir ou refinar o uso de animais de experimentação na pesquisa biomédica,

ensaios ou ensino.

Internacionalmente, o princípio dos 3R's entrou vigor através da regulamentação de cosméticos e químicos (Diretiva CE Nº 76/768/EEC, de 27 Julho de 1976 e o regulamento REACH<sup>3</sup> para registro e comercialização de químicos) na Comunidade Europeia.

Como o setor cosmético foi o mais pressionado para a não utilização de animais (Sétima emenda à Diretiva EC 76/768/EEC de cosméticos de 27 Julho de 1976, que proíbe a comercialização de produtos cosméticos que tenham sido testados em animais desde março de 2013), os desfechos tópicos relacionados à avaliação toxicológica destes produtos foram os que tiveram mais avanços nos últimos anos. Como exemplo, podemos citar o desenvolvimento de equivalentes de epiderme *in vitro* para abordar a irritação/corrosão cutânea e recentes ensaios que substituem o uso de animais para identificação e classificação de sensibilizadores cutâneos.

De forma similar, a regulamentação de químicos (REACH) da Comunidade Europeia, em vigor desde 2007, evita os testes em animais e prefere os testes alternativos *in vitro*. O propósito do REACH é registro, avaliação e autorização de químicos para sistematicamente avaliar os riscos para a saúde humana e meio-ambiente de mais de 30.000 substâncias químicas que são produzidas ou importadas para Comunidade Europeia num volume de mais de uma tonelada por ano.

Com base na atual regulamentação de cosméticos [*Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products*] e a regulamentação REACH, os ensaios alternativos ao uso de animais representam uma barreira técnica à exportação, na medida em que setores impactados por estas regulamentações dependem da realização destes ensaios para a avaliação dos seus produtos.

No Brasil foi construído nos últimos cinco anos um arcabouço legal para que iniciativas que visam à disseminação, desenvolvimento e validação de Métodos Alternativos no país, permitindo que a superação de barreiras técnicas, inserção do Brasil no processo internacional de validação de métodos, entre outras, sejam possíveis.

Destaca-se a lei Arouca (nº 11.794, de 08 de outubro de 2008) que versa sobre o uso de animais na experimentação e no ensino, regulamentada através do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, que estabelece o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) — que entre outras atribuições tem a responsabilidade de monitorar e avaliar a introdução de métodos alternativos.

O CONCEA, através das Resoluções Normativas nº. 17 e nº.18 (2014) reconheceu 17 métodos alternativos ao uso de animais como validados e aceitos em território nacional, que passam a ser obrigatórios a partir de 2020. Além disto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) acompanhou a decisão do CONCEA, exigindo a utilização de métodos alternativos para pedidos de registro de medicamentos, cosméticos, produtos para saúde, produtos de limpeza, entre outros produtos.

Para disponibilizar no país as condições necessárias para a disseminação, desenvolvimento e

---

<sup>3</sup> REACH é o programa regulatório de químicos e seu uso seguro na [\(EC 1907/2006\)](#). O programa envolve *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical substances*. A lei entrou em vigor em 1º de junho de 2007.

validação de métodos alternativos ao uso de animais, a Rede Nacional de Métodos Alternativos foi criada pelo MCTI (portaria nº 491) em 3 de julho de 2012. Soma-se a esta iniciativa a criação do Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (Bracvam) pelo Instituto Nacional de Controle de qualidade em saúde (INCQS-Fiocruz).

O Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro) foi designado como um dos três Laboratórios Centrais da RENAMA – conjuntamente ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) e ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio).

A RENAMA tem por objetivo:

- I - estimular a implantação de ensaios alternativos ao uso de animais através do auxílio e do treinamento técnico nas metodologias necessárias;*
- II - monitorar periodicamente o desempenho dos laboratórios associados através de comparações interlaboratoriais;*
- III - promover a qualidade dos ensaios através do desenvolvimento de materiais de referência químicos e biológicos certificados, quando aplicável;*
- IV - incentivar a implementação do sistema de qualidade laboratorial e dos princípios das boas práticas de laboratório (BPL); e*
- V - promover o desenvolvimento, a validação e a certificação de novos métodos alternativos ao uso de animais.*

Desta forma, a presente proposta, capitaneada por um dos laboratórios Centrais da RENAMA (Inmetro), que conta com a participação de especialistas da RENAMA, contribuirá para a disseminação dos métodos alternativos relevantes para o cenário internacional e nacional.

#### **4.2 METODOLOGIAS DE ENSAIO PROPOSTAS**

Conforme mencionado anteriormente, o CONCEA estabeleceu através da Resolução Normativa nº. 18 de 24 de setembro de 2014, por desfecho toxicológico, os métodos alternativos ao uso de animais que devem ser implementados no Brasil até 2020.

A validação científica de um método com alternativo ao uso de animais tem seu início com a criação do primeiro Centro de Validação de Métodos Alternativos (ECVAM) na Comunidade Europeia em 1981, o atual EURL-ECVAM<sup>4</sup>. A validação consiste em demonstrar a reprodutibilidade e relevância de um dado método (científica e capacidade preditiva da resposta *in vivo*) para uma determinada aplicação. Estes métodos, validados conforme o documento guia nº. 34 (2015) da OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*) são em sua maioria desenvolvidos para avaliação de perigo de substâncias e podem ser agrupados de acordo com o desfecho toxicológico para o qual contribuem com informação (irritação cutânea, irritação ocular, etc.).

De interesse do presente curso, destacamos os seguintes desfechos e métodos reconhecidos:

---

<sup>4</sup> European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing  
<https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/>

- Para avaliação do potencial de fototoxicidade, o CONCEA reconhece o método OECD TG 432 – Teste de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU.
- Para avaliação da toxicidade aguda o CONCEA reconhece o método OECD TG 420 – Toxicidade Aguda Oral – Procedimento de Doses Fixas; o método OECD TG 423 – Toxicidade Aguda Oral – Classe Tóxica Aguda; o método OECD TG 425 – Toxicidade Aguda Oral – Procedimento “*Up and Down*”; o método OECD GD 129 – Estimativa da dose inicial para teste de toxicidade aguda oral sistêmica.

Pra a avaliação da toxicidade aguda oral de uma substância existe apenas um ensaio *in vitro* aplicável que estima as doses iniciais do ensaio de toxicidade aguda oral em animais. Este ensaio, OECD GD 129 – *Estimativa da dose inicial para teste de toxicidade aguda oral sistêmica*, utiliza como sistema teste a linhagem celular fibroblastóide 3T3 obtida de camundongos Balb e comercialmente disponível pela ATCC. Da mesma forma, o ensaio OECD TG 432 – Teste de Fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU, utiliza também a mesma linhagem e o parâmetro de viabilidade celular a captação do corante vermelho neutro por células viáveis.

Em ambos os casos, o cultivo adequado desta linhagem celular é fundamental para a correta execução e implementação do ensaio nos laboratórios interessados. Embora os dois ensaios tenham uma estratégia de teste similar, o modelo de predição dos ensaios é bastante específico e dependem do seu correto entendimento e aplicação.

Desta forma, o presente curso tem por objetivo capacitar e treinar pessoal nas metodologias básicas de cultivo celular da linhagem Balb 3T3 (como contagem de células, tripsinização, expansão, criopreservação e controle de qualidade) e nas metodologias associadas ao ensaio de citotoxicidade e fototoxicidade como: preparo das soluções (cálculos de concentração e diluição); viabilidade celular por captação de vermelho neutro; cálculo de IC50, estimativa da dose inicial, cálculo de MPE e PIF, dentre outras. O curso ainda terá um módulo sobre as metodologias *in silico*, aplicada aos desfechos relacionados no curso (toxicidade aguda oral e fototoxicidade). Desta forma os participantes terão base teórica e mínima experiência prática para multiplicar conhecimento e permitir a implantação destes ensaios no seu núcleo de origem.

Segue um breve resumo das metodologias de ensaio que serão alvo do treinamento.

#### ***Ensaio de citotoxicidade conforme GD 129 OECD:***

O ensaio da citotoxicidade utilizando vermelho neutro é baseado na habilidade de células viáveis de incorporar o vermelho neutro (NR). Este é um corante catiônico fraco que difunde prontamente através da membrana de plasmática e se concentra nos lisosomas, onde liga eletrostaticamente à matriz lisosomal aniônica. Agentes tóxicos podem alterar a superfície da célula ou a membrana lisosomal, causando fragilidade lisosomal e/ou outras mudanças adversas que se tornam gradualmente irreversíveis. Assim, a morte e/ou a inibição de crescimento da célula diminuem a quantidade de vermelho neutro retido pela cultura. Um produto químico tóxico, não obstante o local ou do mecanismo da ação, interferirá com estes processos, resultando em uma redução da taxa de crescimento, refletida pelo número de célula. A citotoxicidade é expressa como uma redução dependente da concentração da incorporação de NR após a exposição química, fornecendo assim um sinal sensível, que avalia integridade celular e/ou inibição do crescimento.

Brevemente, duas placas de 96 poços serão utilizadas para esta avaliação inicial. Uma das placas

dará origem à curva controle de SDS (*sodium duodecyl sulfate*) e a outra será utilizada para uma substância teste. Para construir esta curva controle utilizaremos a solução estoque de SDS que será diluída 10x em meio de cultivo (DMEM 5% SFB) e será posteriormente diluída, no mesmo meio, utilizando o fator de diluição 1.4.

Será preparado um estoque fresco da substância teste no dia do ensaio para que os cálculos de concentração da solução estoque e do fator de diluição necessário sejam encontrados. Os meios com as diluições apropriadas serão feitos em cabine de fluxo laminar e adicionado às placas teste. Após 48 horas de cultivo, a viabilidade celular será avaliada através da captação por células viáveis do corante vermelho neutro. As densidades óticas obtidas serão convertidas em viabilidade relativa (considerando o controle como 100% de viabilidade). O IC50 da substância (concentração que leva à morte de 50% do sistema teste) será calculado utilizando a função Hill, através do *software* Sigma Plot.

Utilizando o modelo de predição estabelecido no ensaio, regressão linear entre os dados *in vivo* e *in vitro* será possível estimar as doses iniciais para o ensaio com roedores, sendo o resultado expresso como LD50 estimado (mg/kg de peso corporal ou mmol/Kg de peso corporal). Como base no LD50 estimado é possível discutir a categoria de classificação conforme o sistema globalmente harmonizado de classificação e rotulagem de químicos ou GHS (Acrônimo para *The Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals*). Este é um método de redução para substâncias classificáveis e de substituição para substâncias, não-classificáveis.

#### ***Ensaio de fototoxicidade conforme TG 432 OECD:***

O princípio do teste TG 432 OECD baseia-se na comparação da citotoxicidade da substância teste quando testada na presença ou na ausência de exposição a uma dose não citotóxica de luz solar simulada (comprimento de onda >290nm). A citotoxicidade é evidenciada através da redução da absorção do corante vital vermelho neutro (OECD, 2004) e expressa através do IC50 da substância.

O teste 3T3 NRU-PT possui dois modelos de predição para avaliação da fototoxicidade *in vitro* e posterior classificação *in vivo*: o *Photo-Irritation-Factor* (PIF) e o *Mean Photo Effect* (MPE). Para o cálculo dos referidos será utilizado o *software Phototox 2.0* disponibilizado pela OECD. Para exemplificar, caso o IC50 de uma substância diminua após a irradiação solar, esta é considerada fototóxica. Outro exemplo ilustrativo é quando não existe IC50 determinável nas concentrações utilizadas sem irradiação, mas após a irradiação é possível estabelecer o IC50 da substância.

Para este ensaio, a correta simulação da irradiação solar é fundamental. Para tal será utilizado o equipamento Q-SUN XE-1 *Xenon Test Chamber* da Q-Lab Corporation equipado com lâmpadas de Xenônio e com filtro óptico que simula a irradiação solar, mas evita a passagem de comprimentos de onda sabidamente tóxicos (> 290nm). A dose a ser utilizada é de 5J/cm<sup>2</sup>, através de uma irradiância de 1.7mW/cm<sup>2</sup> por 40-50 minutos. A escolha, com base técnica, do equipamento adequado a ser utilizado/adquirido impacta diretamente na confiança do resultado obtido.

De forma similar ao ensaio de citotoxicidade, o sistema teste (Balb 3T3) é desafiado com 8 concentrações da substância (teste ou controle). Para este ensaio duas placas de 96 poços são utilizadas por substância: uma que será irradiada e outra que não sofrerá a irradiação. A substância controle deste ensaio é a Clorpromazina ou outra de proficiência disponível (com PIF e MPE)

conhecidos). Com base nos resultados de PIF ou MPE a classificação da substância como *fototóxica*, *não fototóxica* ou *possível fototóxica* é feita.

**5. CARGA HORÁRIA:** 40 horas/curso

**Nº DE VAGAS:** 10 vagas, sendo seis para brasileiros

**DATA DE REALIZAÇÃO DO CURSO:** 2º Trimestre de 2016.

## **6. REQUISITOS BÁSICOS PARA PARTICIPAR DO CURSO**

Graduados em Ciências Biológicas ou em Ciências da Saúde com experiência em cultivo de células de mamíferos. Preferencialmente ter concluído ou estar cursando uma pós-graduação *strictu sensu* e/ou com atuação profissional relacionada aos métodos alternativos ao uso de animais.

## **7. CORPO DOCENTE**

*Luciene Bottentuit López Balottin* - Bióloga, Mestre e Doutora em Ciências pela UFRJ, ampla experiência em cultura de células de mamíferos, tecidos equivalentes de pele *in vitro* e outros tecidos biengenheirados utilizados em terapia celular. Foi gerente de pele da empresa Excellion S.A. de terapia celular e Diretora Técnica da empresa de biotecnologia Cellqualis S.A. Desde 2010 é pesquisadora-tecnologista do Inmetro e atualmente é responsável pela implementação dos ensaios da RENAMA (e seu monitoramento) e do projeto Econormas-Mercosul para implementação do GHS no Brasil. Representa o Inmetro no Conselho Diretor da RENAMA; representa o Brasil na OECD.

*Fabiana Medeiros* - Pesquisadora na área de Farmacologia e Toxicologia Pré-Clinica, com experiência no desenvolvimento de ensaios pré-clínicos *in vivo* e *in vitro* baseados em protocolos internacionais de avaliação de eficácia e segurança de produtos médicos, farmacêuticos, agroquímicos, cosméticos e biomateriais. Doutoranda em Biotecnologia, pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN / SP, com Graduação em Ciências Biológicas Bacharelado pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (1996) e Mestrado em Farmacologia pela Universidade de São Paulo (2000). Atualmente é Sócia / Diretora técnica do Laboratório Biosíntesis P&D do Brasil Ltda, microempresa de biotecnologia pré-clínica situada no CIETEC - Centro Incubador de Empresas Tecnológicas / IPEN/ USP.

**8. PROGRAMA**

<b>CRONOGRAMA</b>		
<b>DIA 1 (8h)</b>		
8h00-8h30	Boas-vindas, apresentação do curso, apresentação dos participantes	Luciene Balottin
8h30-9h00	Métodos Alternativos-RENAMA e contexto nacional	José Mauro Granjeiro (INMETRO)
9h00-12h00	Módulo teórico-Histórico de validação e apresentação do ensaio de Citotoxicidade (GD 129 OECD) e Fototoxicidade (TG 432 OECD)	Fabiana Medeiros (cito) Luciene Balottin (foto)
	Almoço	
13h00-17h00	Módulo prático- Observação das células 3T3 ao microscópio óptico. Conhecendo o modelo, morfologia esperada, determinação da confluência celular, como identificar indícios de contaminantes	Fabiana Medeiros
<b>DIA 2 (8h)</b>		
8h00-12h00	Módulo prático- Desenho experimental da Placa para os ensaios (range finder e IC50 finder). Preparo das soluções estoque (SDS e ANTRACENO) e cálculo de diluições necessárias para o ensaio (diluição decimal geométrica). Semeadura em placas de 96 poços (CITOTOX)	Fabiana Medeiros
	Almoço	
13h00-17h00	Módulo prático- Preparo da solução de Vermelho Neutro. Critérios de qualificação, kits utilizados. Utilização do leitor de microplaca (espectrofotômetro), critérios de qualificação do equipamento	Fabiana Medeiros
<b>Dia 3 (8h)</b>		
8h30-12h00	Módulo prático-Diluição seriada da substância controle (SDS-CITOTOX), aplicação da substância teste nas placas semeadas anteriormente	Fabiana Medeiros
	Almoço	
13h00-17h00	Módulo prático- Semeadura em placas de 96 poços ( <b>Fototox</b> ). Desenho experimental da Placa para os ensaios	Luciene Balottin
<b>Dia 4(8h)</b>		
8h00-12h00	Módulo prático- Observação das placas (CITOTOX E FOTOTOX). Utilização do Simulador solar (Q-sun), critérios de qualificação do equipamento. Diluição seriada da substância controle (ANTRACENO- FOTOTOX), aplicação nas placas semeadas anteriormente. Exposição à irradiação	Luciene Balottin & Fabiana Medeiros

	Almoço	
13h00-17h00	Módulo teórico- Utilização dos softwares SigmaPlot e Fototox para análise dos dados, cálculo do IC50 , LD50 previsto, PIF e MPE	Luciene Balottin & Fabiana Medeiros
<b>Dia 5 (8h)</b>		
8h00-12h00	Módulo prático- (CITOTOX E FOTOTOX) adição da solução de vermelho neutro (2 horas) nas placas de ensaio, visualização ao microscópio óptico, incubação. Critérios de aceitação do ensaio	Luciene Balottin & Fabiana Medeiros
	Almoço	
13h00-17h00	Módulo prático- Visualização ao microscópio óptico, lavagem da placa, preparo e aplicação da solução reveladora, leitura no espectrofotômetro. Discussão dos resultados encontrados pelos grupos. Avaliação do curso e encerramento	Luciene Balottin & Fabiana Medeiros

### 9. MECANISMOS DE AVALIAÇÃO:

Participação no curso (mínimo de 75% de frequência), elaboração de relatório de ensaio e preenchimento de ficha de avaliação do curso.

### *CURSO 3*

**1. TÍTULO DO CURSO:** Curso teórico-prático para utilização de Métodos Alternativos ao uso de animais *in vitro* para avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular de substâncias químicas.

**2. COORDENADOR DO CURSO:** Luciene Bottentuit López Balottin

**LOCAL DE EXECUÇÃO:** Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – Inmetro, Av. Nossa Senhora das Graças no. 50, Xerém, Duque de Caxias, RJ, CEP 25250-025.

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde –INCQS, Av. Brasil nº 4365 - Manguinhos, Rio de Janeiro - RJ, CEP 21040-900

**3. OBJETIVOS:** Capacitar e treinar pessoal em duas metodologias (alternativas ao uso de animais) utilizadas para avaliar o potencial irritação e corrosão ocular de substâncias: método do HET-CAM (*Hens Egg Test on the Chorio-Allantoic Membrane*), em estudo de validação & O BCOP (*Bovine Corneal Opacity & Permeability test*). O curso ainda abordará as estratégias de classificação sugeridas para identificar irritantes ou corrosivos oculares. Desta forma, os participantes terão base teórica e mínima experiência prática para multiplicar conhecimento e permitir a implantação destes ensaios no seu núcleo de origem, contribuindo para o aumento da capacidade laboratorial de oferta de ensaio. Tais métodos são barreiras técnicas de exportação de produtos para a Comunidade Europeia e atualmente exigidos por regulamentação nacionais.

## 4. JUSTIFICATIVA:

### 4.1 PANORAMA REGULATÓRIO

Um marco na utilização de animais na experimentação científica foi a publicação do livro “*Principles of Human Experimental Technique*” pelos pesquisadores William Russel e Rex Burch em 1959. Com isto, teve início o movimento que preconiza o bem-estar de animais de experimentação e que discute a utilização de animais abordando questões éticas e científicas.

A partir deste marco, o princípio dos 3R’s (*Reduction, Refinement e Replacement*) para o uso de animais é estabelecido: a *redução* reflete a obtenção de nível equiparável de informação com o uso de menos animais; o *refinamento* promove o alívio ou a minimização da dor, sofrimento ou estresse do animal; a *substituição* estabelece que um determinado objetivo seja alcançado sem o uso de animais vertebrados vivos.

Métodos Alternativos ao Uso de Animais podem ser definidos como qualquer método que possa ser usado para substituir, reduzir ou refinar o uso de animais de experimentação na pesquisa biomédica, ensaios ou ensino.

Internacionalmente, o princípio dos 3R’s entrou vigor através da regulamentação de cosméticos e químicos (Diretiva CE Nº 76/768/EEC, de 27 Julho de 1976 e o regulamento REACH<sup>5</sup> para registro e comercialização de químicos) na Comunidade Europeia.

Como o setor cosmético foi o mais pressionado para a não utilização de animais (Sétima emenda à Diretiva EC 76/768/EEC de cosméticos de 27 Julho de 1976, que proíbe a comercialização de produtos cosméticos que tenham sido testados em animais desde março de 2013), os desfechos tópicos relacionados à avaliação toxicológica destes produtos foram os que tiveram mais avanços nos últimos anos. Como exemplo, podemos citar o desenvolvimento de equivalentes de epiderme *in vitro* para abordar a irritação/corrosão cutânea e recentes ensaios que substituem o uso de animais para identificação e classificação de sensibilizadores cutâneos.

De forma similar, a regulamentação de químicos (REACH) da Comunidade Europeia, em vigor desde 2007, evita os testes em animais e prefere os testes alternativos *in vitro*. O propósito do REACH é registro, avaliação e autorização de químicos para sistematicamente avaliar os riscos para a saúde humana e meio-ambiente de mais de 30.000 substâncias químicas que são produzidas ou importadas para Comunidade Europeia num volume de mais de uma tonelada por ano.

Com base na atual regulamentação de cosméticos [*Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products*] e a regulamentação REACH, os ensaios alternativos ao uso de animais representam uma barreira técnica à exportação, na medida em que setores impactados por estas regulamentações dependem da realização destes ensaios para a avaliação dos seus produtos.

No Brasil foi construído nos últimos cinco anos um arcabouço legal para que iniciativas que visam à disseminação, desenvolvimento e validação de Métodos Alternativos no país, permitindo que a

<sup>5</sup> REACH é o programa regulatório de químicos e seu uso seguro na [\(EC 1907/2006\)](#). O programa envolve *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical substances*. A lei entrou em vigor em 1<sup>o</sup> de junho de 2007.

superação de barreiras técnicas, inserção do Brasil no processo internacional de validação de métodos, entre outras, sejam possíveis.

Destaca-se a lei Arouca (nº 11.794, de 08 de outubro de 2008) que versa sobre o uso de animais na experimentação e no ensino, regulamentada através do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, que estabelece o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) — que entre outras atribuições tem a responsabilidade de monitorar e avaliar a introdução de métodos alternativos.

O CONCEA, através das Resoluções Normativas nº. 17 e nº.18 (2014) reconheceu 17 métodos alternativos ao uso de animais como validados e aceitos em território nacional, que passam a ser obrigatórios a partir de 2020. Além disto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) acompanhou a decisão do CONCEA, exigindo a utilização de métodos alternativos para pedidos de registro de medicamentos, cosméticos, produtos para saúde, produtos de limpeza, entre outros produtos.

Para disponibilizar no país as condições necessárias para a disseminação, desenvolvimento e validação de métodos alternativos ao uso de animais, a Rede Nacional de Métodos Alternativos foi criada pelo MCTI (portaria nº 491) em 3 de julho de 2012. Soma-se a esta iniciativa a criação do Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (Bracvam) pelo Instituto Nacional de Controle de qualidade em saúde (INCQS-Fiocruz).

O Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro) foi designado como um dos três Laboratórios Centrais da RENAMA – conjuntamente ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) e ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio).

A RENAMA tem por objetivo:

- I - estimular a implantação de ensaios alternativos ao uso de animais através do auxílio e do treinamento técnico nas metodologias necessárias;*
- II - monitorar periodicamente o desempenho dos laboratórios associados através de comparações interlaboratoriais;*
- III - promover a qualidade dos ensaios através do desenvolvimento de materiais de referência químicos e biológicos certificados, quando aplicável;*
- IV - incentivar a implementação do sistema de qualidade laboratorial e dos princípios das boas práticas de laboratório (BPL); e*
- V - promover o desenvolvimento, a validação e a certificação de novos métodos alternativos ao uso de animais.*

Desta forma, a presente proposta, capitaneada por um dos laboratórios Centrais da RENAMA (Inmetro), que conta com a participação de especialistas da RENAMA, contribuirá para a disseminação dos métodos alternativos relevantes para o cenário internacional e nacional.

#### **4.2 METODOLOGIAS DE ENSAIO PROPOSTAS**

Conforme mencionado anteriormente, o CONCEA estabeleceu através da Resolução Normativa nº. 18 de 24 de setembro de 2014, por desfecho toxicológico, os métodos alternativos ao uso de animais que devem ser implementados no Brasil até 2020.

A validação científica de um método com alternativo ao uso de animais tem seu início com a criação do primeiro Centro de Validação de Métodos Alternativos (ECVAM) na Comunidade Europeia em 1981, o atual EURL-ECVAM<sup>6</sup>. A validação consiste em demonstrar a reprodutibilidade e relevância de um dado método (científica e capacidade preditiva da resposta *in vivo*) para uma determinada aplicação. Estes métodos, validados conforme o documento guia nº. 34 (2015) da OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*) são em sua maioria desenvolvidos para avaliação de perigo de substâncias e podem ser agrupados de acordo com o desfecho toxicológico para o qual contribuem com informação (irritação cutânea, irritação ocular, etc.).

De interesse do presente curso, destacamos os seguintes desfecho e métodos reconhecidos:

- Para avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular o CONCEA reconhece o método OECD TG 437 – Teste de Permeabilidade e Opacidade de Córnea Bovina; o método OECD TG 438 – Teste do Olho Isolado de Galinha; o método OECD TG 460 – Teste de Permeação de Fluoresceína.

Dentre os possíveis métodos alternativos, o desfecho toxicológico de corrosão/irritação ocular sempre foi emblemático na área, pois o teste de Draize *in vivo* de irritação ocular (TG 405 OECD) causa desconforto e sofrimento aos animais. Por esta razão, foi um dos primeiros testes usados para fins regulatórios pelo qual se procurou abordagens alternativas.

Dada a complexidade do desfecho toxicológico (irritação/corrosão ocular), é pouco provável que em um futuro próximo um único teste *in vitro* seja capaz de substituir o teste *in vivo* de Draize para prever toda a gama de irritação ocular para diferentes classes químicas. No entanto, a combinação de vários métodos alternativos *in vitro* dentro de uma estratégia de abordagem pode ser capaz de substituir o teste de irritação ocular *in vivo*.

Atualmente os seguintes ensaios estão sendo utilizados observando seu domínio de aplicação e *status* de validação:

1. Ensaios organotípicos *in vitro*: Ensaio de permeabilidade e opacidade da córnea bovina (*BCOP- Bovine Corneal Opacity & Permeability test*), Ensaio com olho isolado de galinha (*ICE- Isolated Chicken Eye test*), Ensaio com olho isolado de coelho (*IRE- Isolated Rabbit Eye test*) e ensaio de HET-CAM (*HET-CAM- Hens Egg Test on the Chorio-Allantoic Membrane*).

2. Ensaios baseados na citotoxicidade e na função celular: Cytosensor Microphysiometer (CM), permeabilidade de fluereceína (*FL- Fluorescein Leakage*), Liberação de vermelho neutro (*NR- Neutral Red Release*) e teste de glóbulos vermelhos (*RBC- Red Blood Cell test*).

Desta forma, a presente proposta focará na execução prática de dois métodos alternativos envolvidos na avaliação do desfecho:

---

<sup>6</sup> European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing  
<https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/>

- I. O BCOP (*Bovine Corneal Opacity & Permeability test*) representante dos ensaios organotípicos que possui um test guideline específico (TG 437). Esta é uma metodologia validada pelo Centro de Validação de Métodos da Comunidade Européia e possui ampla aceitação regulatória. Corneas bovinas são expostas às substâncias de interesse e a opacidade e a permeabilidade a fluoresceína é quantificada. Com base nestes parâmetros, a substância recebe um score de irritação/corrosão ocular.
- II. O HET-CAM (*Hens Egg Test on the Chorio-Allantoic Membrane*). Este ensaio permite a identificação de etapas do processo de irritação que ocorre *in vivo* (Draize test). No sistema Het-CAM três reações são observadas na membrana corioalantóica (CAM), altamente vascularizada. Depois de colocar a amostra diretamente na CAM, uma avaliação dos parâmetros mencionados anteriormente, em intervalos de tempo definidos, é feita.

Desta forma, os participantes terão base teórica e mínima experiência prática para multiplicar conhecimento e permitir a implantação destes ensaios no seu núcleo de origem.

**5. CARGA HORÁRIA:** 40 horas/curso

**Nº DE VAGAS:** 10 vagas, sendo seis para brasileiros

**DATA DE REALIZAÇÃO DO CURSO:** 3º Semestre de 2016.

## **6. REQUISITOS BÁSICOS PARA PARTICIPAR DO CURSO**

Graduados em Ciências Biológicas ou em Ciências da Saúde. Preferencialmente ter concluído ou estar cursando uma pós-graduação *strictu sensu* e/ou com atuação profissional relacionada aos métodos alternativos ao uso de animais.

## **7. CORPO DOCENTE**

*Luciene Bottentuit López Balottin* - Bióloga, Mestre e Doutora em Ciências pela UFRJ, ampla experiência em cultura de células de mamíferos, tecidos equivalentes de pele *in vitro* e outros tecidos biengenheirados utilizados em terapia celular. Foi gerente de pele da empresa Excellion S.A. de terapia celular e Diretora Técnica da empresa de biotecnologia Cellqualis S.A. Desde 2010 é pesquisadora-tecnologista do Inmetro e atualmente é responsável pela implementação dos ensaios da RENAMA (e seu monitoramento) e do projeto Econormas-Mercosul para implementação do GHS no Brasil. Representa o Brasil no WNT da OECD.

*Octavio Presgrave* – Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Gama Filho (1986) e mestrado em Biologia Celular e Molecular pela Fundação Oswaldo Cruz (2003). Defendeu seu Doutorado em Vigilância Sanitária (INCQS), aguardando a publicação do artigo para obtenção do título. Atualmente é tecnologista sênior da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ) e colaborador da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, onde é membro da Câmara Técnica de Cosméticos (CATEC). Tem experiência na área de Farmacologia e Toxicologia, com ênfase em Métodos Alternativos, atuando principalmente nos seguintes temas: métodos alternativos, toxicologia, cosméticos, controle da qualidade, pirogênio, irritação ocular e cutânea. Membro da

Comissão de Ética no Uso de Animais da FIOCRUZ desde 1999, foi coordenador da mesma de 2006 a 2008, retornando a coordená-la desde 2010. Coordena o BraCVAM - Centro Brasileiro para a Validação de Métodos Alternativos.

*Carlos Tagliati* - Farmacêutico e Bioquímico (habilitação Análises Clínicas) pela Universidade Federal de Juiz de Fora (1986). Possui mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas (1992), doutorado em Fármacos e Medicamentos (1997), ambos pela Universidade de São Paulo, e pós-doutorado em Toxicologia *In vitro* (2006) pela Universidad de Murcia (Espanha). Membro do INCT-INOFAR. Sócio fundador da empresa de biotecnologia IN VITRO CELLS - PESQUISA TOXICOLÓGICA S.A. Participou da criação da Sociedade Brasileira de Métodos Alternativos à experimentação animal, sendo membro do Conselho Fiscal. Coordenador do Laboratório de Toxicologia Experimental (*in vitro* e *in vivo*) credenciado à RENAMA (Rede Nacional de Métodos Alternativos). Coordenador da licença do programa SIMCYP SIMULATOR (Simcyp Limited, UK). Atua no setor de empreendedorismo. Possui duas transferências tecnológicas para o setor privado. Professor e orientador (mestrado e doutorado) dos seguintes programas de pós-graduação: Análises Clínicas e Toxicológicas e Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual. Atualmente, é professor associado IV de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Tem experiência na área de Farmácia atuando, principalmente, nos seguintes temas: toxicidade pré-clínica (*in vitro* e *in vivo*), nefrotoxicidade, gastrotoxicidade e toxicocinética.

## 8. PROGRAMA

DIA 1 (8h)		PALESTRANTE/ INSTRUTOR
8h00-8h30	Boas-vindas, apresentação do curso, apresentação dos participantes	Luciene Balottin
8h30-9h00	Métodos Alternativos-RENAMA e contexto Nacional	
9h00-12h00	<i>Módulo teórico</i> - Métodos Alternativos Existentes para avaliar irritação/corrosão ocular. Histórico de validação e apresentação do ensaio de BCOP (TG 437) e apresentação do ensaio de HET-CAM	Octavio Presgrave (HET-CAM) & Carlos Tagliati (BCOP)
<i>Almoço</i>		
13-17h00	<i>Módulo teórico</i> - Como calcular o índice de Irritação <i>in vitro</i> e como aplicar os resultados obtidos. Estratégias para classificação de substâncias (botton-up/ top-down)	Carlos Tagliati / Luciene Balottin
DIA 2 (8h)		
8h00-12h00	<i>Módulo prático</i> -Critérios de aceitação do ensaio e Dissecção da córnea bovina- qualificação e montagem das córneas no Holder do equipamento, calibração do opacitômetro, leitura da opacidade inicial; aplicação da substância teste & incubação (substância teste líquida)	Carlos Tagliati
<i>almoço</i>		
13h00-18h00	<i>Módulo prático</i> - Leitura pós-incubação da substância teste líquidas e sólida. Determinação da permeabilidade utilizando fluoresceína sódica	Carlos Tagliati
Dia 4 (8h)		

8h00 -12h00	<i>Módulo prático</i> -Dissecção da córnea bovina- qualificação e montagem das córneas no <i>Holder</i> do equipamento, calibração do opacitômetro, leitura da opacidade inicial, aplicação da substância teste e incubação (substância teste sólida).	Carlos Tagliati
	<i>Almoço</i>	
13h00-19h00	<i>Módulo prático</i> - Discussão dos resultados obtidos para substância teste líquida e sólida.	Carlos Tagliati
<b>Dia 5 (8h)</b>		
8h00-12h00	<i>Módulo prático</i> : realização do ensaio de HET-CAM para duas substâncias controle	Octavio Presgrave/INCQS
	<i>Almoço</i>	
13h00-16h30	<i>Módulo prático</i> : realização do ensaio de HET-CAM para duas substâncias controle- discussão de resultados.	Octavio Presgrave/INCQS
16h30-17h00	Avaliação do Curso	Luciene Balottin

### 9. MECANISMOS DE AVALIAÇÃO:

Participação no curso (mínimo de 75% de frequência), elaboração de relatório de ensaio e preenchimento de ficha de avaliação do curso.

### **CURSO 4**

**1. TÍTULO DO CURSO:** Curso teórico–prático de Métodos Alternativos que utilizam a Pele Humana como sistema teste: método OECD TG 431 – Corrosão dérmica *in vitro*: Teste da Epiderme Humana Reconstituída, método OECD TG 439 – Teste de Irritação Cutânea *in vitro* e método OECD TG 428 – Absorção Cutânea método *in vitro*.

**2. COORDENADOR DO CURSO:** Eduardo Pagani

**INSTITUIÇÃO DO COORDENADOR:** Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Rua Giuseppe Máximo Scolfaro, 10.000- Polo II de Alta Tecnologia de Campinas - Campinas/SP. Brasil.

**LOCAL DE EXECUÇÃO:** Av. Rui Barbosa, 4.110, Parque da Fonte, São José dos Pinhais (PR) - CEP 83050-010 - Grupo Boticário

**3. OBJETIVOS:** Treinar pessoal nas metodologias necessárias para a execução do ensaio de irritação e corrosão cutânea que utiliza equivalentes de pele como insumo e naquelas necessárias para a execução do ensaio de absorção/permeação cutânea. O curso terá um módulo específico que aborda a tecnologia capaz de integrar as respostas de organoides *in vitro*: *Human-on-a-chip*. Os ensaios que dependem da reconstrução *in vitro* da epiderme humana serão conduzidos por especialistas que produzem tal tecnologia, permitindo que o treinamento tenha nível de excelência. Desta forma, os participantes terão base teórica e mínima experiência prática para multiplicar conhecimento e permitir a implantação destes ensaios no seu núcleo de origem. Vale lembrar que os referidos métodos são barreiras técnicas de exportação de produtos para a Comunidade Europeia e

são atualmente exigidos por regulamentação nacional.

#### 4. JUSTIFICATIVA:

##### 4.1 PANORAMA REGULATÓRIO

Um marco na utilização de animais na experimentação científica foi a publicação do livro “*Principles of Human Experimental Technique*” pelos pesquisadores William Russel e Rex Burch em 1959. Com isto, teve início o movimento que preconiza o bem-estar de animais de experimentação e que discute a utilização de animais abordando questões éticas e científicas.

A partir deste marco, o princípio dos 3R’s (*Reduction, Refinement e Replacement*) para o uso de animais é estabelecido: a *redução* reflete a obtenção de nível equiparável de informação com o uso de menos animais; o *refinamento* promove o alívio ou a minimização da dor, sofrimento ou estresse do animal; a *substituição* estabelece que um determinado objetivo seja alcançado sem o uso de animais vertebrados vivos.

E Métodos Alternativos ao Uso de Animais podem ser definidos como qualquer método que possa ser usado para substituir, reduzir ou refinar o uso de animais de experimentação na pesquisa biomédica, ensaios ou ensino.

Internacionalmente, o princípio dos 3R’s entrou vigor através da regulamentação de cosméticos e químicos (Diretiva CE Nº 76/768/EEC, de 27 Julho de 1976 e o regulamento REACH<sup>7</sup> para registro e comercialização de químicos) na Comunidade Europeia.

Como o setor cosmético foi o mais pressionado para a não utilização de animais (Sétima emenda à Diretiva EC 76/768/EEC de cosméticos de 27 Julho de 1976, que proíbe a comercialização de produtos cosméticos que tenham sido testados em animais desde março de 2013), os desfechos tópicos relacionados à avaliação toxicológica destes produtos foram os que tiveram mais avanços nos últimos anos. Como exemplo, podemos citar o desenvolvimento de equivalentes de epiderme *in vitro* para abordar a irritação/corrosão cutânea e recentes ensaios que substituem o uso de animais para identificação e classificação de sensibilizadores cutâneos.

De forma similar, a regulamentação de químicos (REACH) da Comunidade Europeia, em vigor desde 2007, evita os testes em animais e prefere os testes alternativos *in vitro*. O propósito do REACH é registro, avaliação e autorização de químicos para sistematicamente avaliar os riscos para a saúde humana e meio-ambiente de mais de 30.000 substâncias químicas que são produzidas ou importadas para Comunidade Europeia num volume de mais de uma tonelada por ano.

Com base na atual regulamentação de cosméticos [*Regulation (EC) No [1223/2009](#) of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products*] e a regulamentação REACH, os ensaios alternativos ao uso de animais representam uma barreira técnica à exportação, na medida em que setores impactados por estas regulamentações dependem da realização destes ensaios para a avaliação dos seus produtos.

<sup>7</sup> REACH é o programa regulatório de químicos e seu uso seguro na ([EC 1907/2006](#)). O programa envolve *Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemical substances*. A lei entrou em vigor em 1<sup>o</sup> de junho de 2007.

No Brasil foi construído nos últimos cinco anos um arcabouço legal para que iniciativas que visam à disseminação, desenvolvimento e validação de Métodos Alternativos no país, permitindo que a superação de barreiras técnicas, inserção do Brasil no processo internacional de validação de métodos, entre outras, sejam possíveis.

Destacamos a lei Arouca (nº 11.794, de 08 de outubro de 2008) que versa sobre o uso de animais na experimentação e no ensino, regulamentada através do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, que estabelece o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) — que entre outras atribuições tem a responsabilidade de monitorar e avaliar a introdução de métodos alternativos.

O CONCEA, através das Resoluções Normativas nº. 17 e nº. 18 (2014) reconheceu 17 métodos alternativos ao uso de animais como validados e aceitos em território nacional, que passam a ser obrigatórios a partir de 2020. Além disto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) acompanhou a decisão do CONCEA, exigindo a utilização de métodos alternativos para pedidos de registro de medicamentos, cosméticos, produtos para saúde, produtos de limpeza, entre outros produtos.

Para disponibilizar no país as condições necessárias para a disseminação, desenvolvimento e validação de métodos alternativos ao uso de animais, a Rede Nacional de Métodos Alternativos foi criada pelo MCTI (portaria nº 491) em 3 de julho de 2012. Soma-se a esta iniciativa a criação do Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (Bracvam) pelo Instituto Nacional de Controle de qualidade em saúde (INCQS-Fiocruz).

O Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro) é um dos três Laboratórios Centrais da RENAMA – conjuntamente ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) e ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio).

A RENAMA tem por objetivo:

- I - estimular a implantação de ensaios alternativos ao uso de animais através do auxílio e do treinamento técnico nas metodologias necessárias;*
- II - monitorar periodicamente o desempenho dos laboratórios associados através de comparações interlaboratoriais;*
- III - promover a qualidade dos ensaios através do desenvolvimento de materiais de referência químicos e biológicos certificados, quando aplicável;*
- IV - incentivar a implementação do sistema de qualidade laboratorial e dos princípios das boas práticas de laboratório (BPL); e*
- V - promover o desenvolvimento, a validação e a certificação de novos métodos alternativos ao uso de animais.*

Desta forma, a presente proposta, capitaneada por um dos laboratórios Centrais da RENAMA (Inmetro), que conta com a participação de especialistas da RENAMA, contribuirá para a disseminação dos métodos alternativos relevantes para o cenário internacional e nacional.

#### **4.2 METODOLOGIAS DE ENSAIO PROPOSTAS**

Conforme mencionado anteriormente, o CONCEA estabeleceu através da Resolução Normativa nº. 18 de 24 de setembro de 2014, por desfecho toxicológico, os métodos alternativos ao uso de animais que devem ser implementados no Brasil até 2020.

A validação científica de um método com alternativo ao uso de animais tem seu início com a criação do primeiro Centro de Validação de Métodos Alternativos (ECVAM) na Comunidade Europeia em 1981, o atual EURL-ECVAM<sup>8</sup>. A validação consiste em demonstrar a reprodutibilidade e relevância de um dado método (científica e capacidade preditiva da resposta *in vivo*) para uma determinada aplicação. Estes métodos, validados conforme o documento guia nº. 34 (2015) da OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*) são em sua maioria desenvolvidos para avaliação de perigo de substâncias e podem ser agrupados de acordo com o desfecho toxicológico para o qual contribuem com informação (irritação cutânea, irritação ocular, etc.).

De interesse do presente curso, destacamos os seguintes desfechos e métodos reconhecidos:

- Para avaliação do potencial de irritação e corrosão da pele o CONCEA reconhece o método OECD TG 430 – Corrosão dérmica *in vitro*: Teste de Resistência Elétrica Transcutânea; método OECD TG 431 – Corrosão dérmica *in vitro*: Teste da Epiderme Humana Reconstituída; o método OECD TG 435 – Teste de Barreira de Membrana *in vitro*; o método OECD TG 439 – Teste de Irritação Cutânea *in vitro*.
- Para avaliação da absorção cutânea o CONCEA reconhece o método OECD TG 428 – Absorção Cutânea método *in vitro*.

Ambos os desfechos utilizam a pele como sistema teste de ensaio. No caso da absorção/permeação cutânea, a pele é colocada em um aparato especial (células de Franz) que permite a simulação da exposição tópica à substâncias e a análise da possível absorção/permeação cutânea. Neste caso, dependendo do analito em questão, uma técnica de química analítica é escolhida para a detecção e quantificação do analito no sistema. Esta é uma técnica que depende de equipamento específico tanto para simular as condições de ensaio quanto para detecção do analito.

No caso do desfecho de irritação/corrosão cutânea, o principal gargalo técnico neste ensaio é o desenvolvimento e a aquisição de equivalentes de epiderme humana reconstituídos. No Brasil, ainda não há um caminho claro de importação, mas existe um grupo no Brasil que domina a técnica de produção destes equivalentes e possui ampla experiência na execução destes ensaios: o Grupo Boticário.

Desta forma, o presente curso tem por objetivo treinar pessoal nas metodologias envolvidas no ensaio de irritação e corrosão cutânea que utilizam equivalentes de pele como sistema teste e nas metodologias envolvidas para avaliar a absorção/permeação cutânea de substâncias.

Além disto, o presente curso também oferecerá oportunidade que os alunos tenham uma aula demonstrativa do uso dos equivalentes de pele humana em simuladores de integração de órgãos

---

<sup>8</sup> European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing  
<https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/>

através de microfluídica. Esta é uma ferramenta de vanguarda para o estudo toxicológico *in vitro* a partir de tecidos e/ou órgãos humanos reconstituídos *in vitro*.

**5. CARGA HORÁRIA:** 40 horas/curso

**Nº DE VAGAS:** 10 vagas, sendo seis para brasileiros

**DATA DE REALIZAÇÃO DO CURSO:** 4º Trimestre de 2016

## **6. REQUISITOS BÁSICOS PARA PARTICIPAR DO CURSO**

Graduados em Ciências Biológicas ou em Ciências da Saúde. Preferencialmente ter concluído ou estar cursando uma pós-graduação *strictu sensu* e/ou com atuação profissional relacionada aos métodos alternativos ao uso de animais.

## **7. CORPO DOCENTE**

*Eduardo Pagani* - Médico atuante na área de pesquisa & desenvolvimento de novos medicamentos e educador na área de medicamentos fitoterápicos. Possui graduação em Medicina pela Universidade de São Paulo (1986), especialização em Medicina Farmacêutica pela Universidade Federal de São Paulo, mestrado em Biologia Molecular pela Universidade Federal de São Paulo (1995), doutorado em Ciências pela Universidade de São Paulo (1999) e formação em Pesquisa Clínica pelo *Schering Plough Research Institute de New Jersey - USA* (2002). Possui 12 anos de experiência profissional em desenvolvimento pré-clínico e clínico de medicamentos. É atualmente gestor de desenvolvimento de fármacos do LNBio - Laboratório Nacional de Biociências e responsável pela implementação de métodos *in silico* na RENAMA.

*Marcio Lorencini* - Possui graduação (bacharelado e licenciatura) em Ciências Biológicas pela UNICAMP (2003), mestrado em Genética e Biologia Molecular pela UNICAMP (2006), pós-graduação em Administração de Empresas pela FGV (2008), MBA em Gestão de Negócios pela FAE Business School (2013) e doutorado em Genética e Biologia Molecular pela UNICAMP (2014). Atua na área de Pesquisa e Desenvolvimento de empresas cosméticas desde 2005 e atualmente é gerente de Avaliação de Produtos e Assuntos Regulatórios do Grupo Boticário (empresa Cencoderma). Tem experiência nas áreas de Biologia Celular e Molecular, Métodos Alternativos, Fisiologia da Pele, Envelhecimento, Cosmetologia, Imunologia, Pesquisas Pré-Clínicas, Clínicas e com Consumidores.

*Valéria Maria Di Mambro* - Possui graduação em Ciências Farmacêuticas pela Universidade de São Paulo (1997), mestrado (2001) e doutorado (2005) em Ciências Farmacêuticas pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Trabalhou como pesquisadora da área de Tecnologia de Pele da Natura Inovação e Tecnologia de Produtos Ltda. Atualmente trabalha no O Boticário na área de Avaliação Técnica Regulatória com foco na avaliação da eficácia e segurança de cosméticos. Atua na área de eficácia e segurança *in vivo* e *in vitro* de antioxidantes, com ênfase em extratos vegetais e flavonóides, Permeação cutânea de ativos, pesquisa em fisiologia da pele, principalmente nos temas referentes à neurocosmética, celulite (lipodistrofia ginóide), hidratação cutânea e proteção contra danos UV. Foi nomeada TOP 100 Scientists pela IBC de Cambridge. É revisora de 3 periódicos internacionais. Possui 29 trabalhos apresentados em congressos nacionais e internacionais e 9 trabalhos publicados em revistas internacionais e nacionais.

*Karinna Siqueira Machado* - Graduada em Farmácia pela Universidade Positivo (2009) e especialista em Tecnologia de Cosméticos pela parceria Equilibra Instituto de Capacitação e Especialização - Faculdade Vicentina. Atualmente é Pesquisadora do Grupo Boticário. Tem experiência na área de Cosmetologia, atuando principalmente nos seguintes temas: avaliação de Eficácia; hidratação; relevo cutâneo.

*Carlos Alberto Bruel* - É mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Paraná (2012). Possui graduação em Farmácia - Habilitação em Indústria pela Universidade Federal do Paraná (2002). Atualmente é Pesquisador Sênior do Grupo Boticário atuando principalmente em Desenvolvimento Analítico para métodos de identificação e quantificação de biomoléculas por LC-MSMS que atuam como biomarcadores em processos de envelhecimento da pele. Tem experiência também, na área de Farmácia Industrial, com ênfase em Análise e Controle de Medicamentos - Pesquisa e Desenvolvimento de Métodos Analíticos, atuando principalmente nos seguintes temas: plantas medicinais, marcadores, dissolução de formas farmacêuticas.

*Carla Abdo Brohem* - Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade de São Paulo (2005) e doutorado em Farmácia (Análises Clínicas) pela Universidade de São Paulo (2010). Realizou seu pós-doutorado na Universidade de São Paulo. Possui MBA em Gestão Estratégica pela Universidade Federal do Paraná (2014). Atualmente é Coordenadora do Núcleo de Estudos Biológicos e Métodos Alternativos (NEBMA) do Grupo Boticário/Cencoderma. Tem experiência na área de Biologia Geral, com ênfase em Biologia Molecular e Celular, atuando principalmente nos seguintes temas: pele, remodelamento tecidual, matriz extracelular.

*Desiré Cigaran Shuck* - possui graduação em Ciências Biológicas( Bacharelado) pela Universidade do Vale do Rio dos Sinos (2004), mestrado em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul e doutorado pela Universidade de São Paulo onde pesquisou aspectos da biologia molecular e celular de *Plasmodium falciparum*. Atualmente é pesquisadora biomolecular sênior no Grupo Boticário onde desenvolve pesquisas relacionadas a dermatologia utilizando técnicas de microarranjo, PCR quantitativo e High Content Screening. Tem experiência na área de Biologia Molecular, Biologia Celular, Genômica Funcional e Imunologia.

*Ana Cristina Weihermann* - Possui graduação em Farmácia pela Universidade Positivo (2012) e mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Positivo (2015). Atualmente é Pesquisadora do Núcleo de Estudos Biológicos e Métodos Alternativos (NEBMA) do Grupo Boticário. Tem experiência na área de Biologia Molecular e Celular atuando principalmente na avaliação de eficácia e segurança por métodos alternativos *in vitro*, técnicas de qPCR, microscopia de fluorescência, citometria de fluxo e modelos de pele equivalente.

*Bruna Bastos Swinka* - Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Positivo (2009). Atualmente é Pesquisadora no Núcleo de Estudos Biológicos e Métodos Alternativos do Grupo Boticário. Tem experiência nas áreas de Biologia Molecular e Celular, atuando no desenvolvimento e implementação de métodos alternativos ao uso de animais e também com temas relacionados a pele, remodelamento tecidual e matriz extracelular.

## **8. PROGRAMA**

<b>DIA 1 (8h) - AMBIENTAÇÃO NO TEMA, PELE E EXPERIMENTAL PERMEAÇÃO</b>		<b>PALESTRANTE/INSTRUTOR</b>
08h00-08h30	Boas-vindas, apresentação do curso e apresentação dos participantes.	Eduardo Pagani (LNBIO)
08h30-09h30	Métodos alternativos (definições, panorama regulatório, validação de métodos, RENAMA).	Eduardo Pagani (LNBIO)
09h30-12h00	<i>Módulo teórico:</i> Base teórica sobre estrutura da pele, principais funções, regeneração e reparo, processo de envelhecimento e mudanças estruturais e fisiológicas.	Márcio Lorencini (Grupo Boticário)
12h00-13h00	Almoço	
13h00-14h00	<i>Módulo teórico:</i> Apresentação do guia OECD para avaliar absorção cutânea (TG 428).	Valéria Maria Di Mambro (Grupo Boticário)
14h00-17h00	<i>Módulo prático:</i> Preparo das membranas para estudo de permeação cutânea, montagem do equipamento, preparo das formulações. Início do ensaio.	Karina Siqueira Machado (Grupo Boticário)
<b>DIA 2 (8h) - BASE TEÓRICA E CONTINUAÇÃO EXPERIMENTAL PERMEAÇÃO</b>		<b>PALESTRANTE/INSTRUTOR</b>
08h00-10h00	<i>Módulo teórico:</i> Base teórica sobre mecanismos de permeação cutânea, aparatos utilizados para estudos <i>in vitro</i> de liberação e permeação, tipos de células de Franz, fluxo estático ou contínuo.	Valéria Maria Di Mambro (Grupo Boticário)
10h00-12h00	<i>Módulo prático:</i> utilização do HPLC, curva analítica para as substâncias utilizadas.	Carlos Alberto Buel Gemin (Grupo Boticário)
12h00-13h00	Almoço	
13h00-15h30	<i>Módulo prático:</i> Coleta das amostras do ensaio iniciado no dia anterior e aplicação no HPLC. Coleta de dados.	Carlos Alberto Buel Gemin (Grupo Boticário)
15h30-17h00	<i>Módulo prático:</i> Análise de resultados, cálculo do coeficiente de permeação.	Karina Siqueira Machado (Grupo Boticário)
<b>Dia 3 (8h) - BASE TEÓRICA E EXPERIMENTAL IRRITAÇÃO/CORROSÃO CUTÂNEA</b>		<b>PALESTRANTE/INSTRUTOR</b>
08h00-10h00	<i>Módulo teórico:</i> Apresentação dos guias OECD para avaliar corrosão/irritação cutânea (TG 439 e TG 431).	Carla Abdo Brohem (Grupo Boticário)
10h00-12h00	<i>Módulo teórico:</i> Base teórica de cultivo, isolamento de células primárias e reconstrução de epitélio <i>in vitro</i> .	Carla Abdo Brohem (Grupo Boticário)
12h00-13h00	Almoço	
13h00-17h00	<i>Módulo prático:</i> Manuseio de culturas celulares. Análise de viabilidade celular por MTT: preparo de solução e aplicação em culturas de células.	Ana Cristina Weihermann (Grupo Boticário)
<b>Dia 4 (8h) - EXPERIMENTAL IRRITAÇÃO/CORROSÃO</b>		<b>PALESTRANTE/INSTRUTOR</b>

<b>CUTÂNEA E VISITA GRUPO BOTICÁRIO</b>		
08h00-12h00	<i>Módulo prático:</i> Realização do ensaio de irritação/corrosão cutânea (substâncias líquidas).	Desirée Cigarán Schuck D`Ávila (Grupo Boticário) / Bruna Bastos Swinka (Grupo Boticário)
12h00-13h00	Almoço	
13h00-16h00	<i>Módulo prático:</i> Realização do ensaio de irritação/corrosão cutânea (substâncias sólidas).	Desirée Cigarán Schuck D`Ávila (Grupo Boticário) / Bruna Bastos Swinka (Grupo Boticário)
16h00-17h00	Visita guiado no Grupo Boticário	Programa de visitas (Grupo Boticário)
<b>Dia 5 (8h) - EXPERIMENTAL IRRITAÇÃO/CORROSÃO CUTÂNEA, BASE TEÓRICA INTEGRAÇÃO DE TECIDOS/ÓRGÃOS E ENCERRAMENTO</b>		<b>PALESTRANTE/INSTRUTOR</b>
08h00-12h00	<i>Módulo prático:</i> Análise de resultados de irritação/corrosão com equivalentes de epiderme. Modelos de relatórios. Elaboração de relatórios de ensaio e discussão final	Desirée Cigarán Schuck D`Ávila (Grupo Boticário) / Bruna Bastos Swinka (Grupo Boticário), Márcio Lorencini (Grupo Boticário)
12h00-13h00	Almoço	
13h00-16h30	<i>Módulo teórico:</i> Microfluídica, funcionamento do chip. Como integrar sinais e predizer respostas? Estado da arte no mundo.	Eduardo Pagani (LNBIO)
16h30-17h00	Avaliação do curso e encerramento.	Márcio Lorencini (Grupo Boticário) / Eduardo Pagani (LNBIO)
<b>9. MECANISMOS DE AVALIAÇÃO:</b>		
Participação no curso (mínimo de 75% de frequência) e elaboração de relatório de ensaio e preenchimento de ficha de avaliação do curso.		