



O TRABALHO DO INCQS EM ALTERNATIVAS AO USO DE ANIMAIS



Octavio A. F. Presgrave – INCQS/FIOCRUZ





O que são métodos alternativos?

- São procedimentos que podem substituir completamente o uso de animais em experimentos, reduzir o número de animais necessários ou diminuir a dor ou desconforto sofrido pelos animais.

(adaptado de FRAME)





Métodos Alternativos

(Evolução do pensamento) (1)

- 1760 - Fergusson - preocupação com métodos bárbaros em testes com animais
- Séc. XIX - Bentham - preocupação com o bem estar dos animais (“a questão não é ‘Eles podem raciocinar?’ nem ‘Eles podem falar?’ , mas, ‘Eles sofrem?’”)
- Séc. XIX - Marshal Hall - proposta de código na prática de pesquisa => diminuição da dor, substituição de grandes animais por organismos inferiores e prevenção de repetições desnecessárias





Métodos Alternativos

(Evolução do pensamento) (2)

- 1842 - fundação da British Society for the Prevention of Cruelty to Animals (mais tarde RSPCA) - **primeira sociedade protetora dos animais**, no mundo
- 1959 - Russel & Burch - publicação do livro “Principles of Humane Experimental Technique” - surgimento do conceito dos **3R's** (Replacement, Reduction and Refinement)
- 1978 - campanha para a retirada do método de Draize dos testes em cosméticos, por defensores dos direitos animais





Vigilância Sanitária

Definição:

“conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde”

Art. 6º, § 1º, Lei nº 8.080/90





INCQS

- **unidade da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) atuando como órgão de referência nacional para as questões tecnológicas e normativas, relativas ao controle da qualidade de insumos, produtos, ambientes e serviços vinculados à Vigilância Sanitária.**





Missão do INCQS

- Contribuir para a promoção e recuperação da saúde e prevenção de doenças, atuando como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à Vigilância Sanitária.





Decreto nº 4.725, de 09/06/2003

- Aprova o Estatuto e o Quadro Demonstrativo dos Cargos em Comissão e das Funções Gratificadas da Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, e dá outras providências.





Decreto nº 4.725, de 09/06/2003

Art. 28. Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde compete planejar, coordenar, supervisionar e executar atividades de:

I - controle da qualidade de produtos para consumo humano, compreendendo alimentos, medicamentos, sangue e hemoderivados, imunobiológicos, cosméticos, domissanitários, reativos para diagnóstico, equipamentos e artigos de saúde em geral;

II - estabelecimento de normas e metodologias de controle da qualidade para a rede de laboratórios do Sistema Único de Saúde;

III - capacitação de profissionais em sua área de competência para o sistema de saúde e de ciência e tecnologia do País;

IV - promoção de ações regulatórias em parceria com o órgão de vigilância sanitária; e

V - assessoria técnica, como unidade de referência, à rede nacional de laboratórios de controle de qualidade em saúde.





Estudos de Alternativas pelo INCQS

- **Toxicidade Aguda**

Dose Letal Aproximada (ALD) - para classificação toxicológica

- **Pirogênio**

LAL

Liberação de citocinas (Sangue Total Humano e MonoMac-6)

- **Potência de soros anti-peçonhentos**

Citotoxicidade

- **Irritação Ocular**

Citotoxicidade (difusão em agar)

Membrana cório-alantóide (HET-CAM)

RBC (Red Blood Cell Assay)

Captação de Vermelho Neutro (SIRC e 3T3)

MTT (SIRC e 3T3)





Estudos de Alternativas pelo INCQS

(continuação)

- **Sensibilização**

LLNA (Local Lymph Node Assay) – BrDU / FACS

- **Necessidade de implantação**

Fotossensibilização (NRU-UV-3T3)

Pele reconstituída

TER

LLNA (³H-Timidina)

BCOP

ICE





COMPARISON OF FIVE METHODS FOR THE DETERMINATION OF LETHAL DOSE IN ACUTE TOXICITY STUDIES

F.J.R. PAUMGARTTEN, O.A.F. PRESGRAVE, M.A.C. MENEZES,
F.F. FINGOLA, J.C.B.R. FREITAS, R.R. CARVALHO and F.Q. CUNHA

*Setor de Farmacologia e Toxicologia, Instituto Nacional de
Controle de Qualidade em Saúde, FIOCRUZ, 21040 Rio de Janeiro, RJ, Brasil*

The aim of the present study was to compare the reliability of LD₅₀ determination using the traditional Litchfield and Wilcoxon method with that obtained by four alternative tests requiring smaller numbers of animals, for the purpose of classifying chemicals according to their acute toxicity. Acute lethal dose determinations were carried out in mice for oral and intraperitoneal administration of hexachlorophene, lidocaine, methanol, phenobarbital and physostigmine. The Molinengo method proved not to be as reliable as suggested by its author. Determination of LD₅₀ using the Thompson and Weil method or, alternatively, the maximal non-lethal dose and the approximate lethal dose permitted the classification of the chemicals in essentially the same order. The approximate lethal dose method, in particular, seems to be a very suitable alternative method to the classical LD₅₀ test since it requires only about 6 animals, provides enough information to order chemicals according to their toxicities, and provides useful information for planning subsequent repeated-dose studies.



Table 2 - Acute toxicity classification of chemicals using different lethality indices.

The lethality indices presented include: LD₅₀s determined by the methods of Litchfield and Wilcoxon (L & W), Thompson and Weil (T & W) and Molinengo; the maximal non-lethal dose method (MNLD) and the approximate lethal dose method (ALD). Chemicals were classified according to a toxicity rating chart adapted from Klaassen (13). Practically nontoxic (No) > 15 g/kg, slightly toxic (Sl) 5-15 g/kg, moderately toxic (Mo) 0.5-5 g/kg, very toxic (Ve) 50-500 mg/kg, extremely toxic (Ex) 5-50 mg/kg and supertoxic (Su) < 5 mg/kg. The numbers in parentheses indicate the number of animals used for each determination. *Different from L & W-derived toxicity rating.

Chemical	Route of administration	LD ₅₀			MNLD	ALD
		L & W	T & W	Molinengo		
Physostigmine	<i>ip</i>	Su (85)	Su (20)	Su (8)	Su (58)	Su (6)
	<i>po</i>	Su (67)	Su (20)	Su (7)	Su (52)	Su (6)
Phenobarbital	<i>ip</i>	Ve (65)	Ve (20)	Ve (8)	Ve (52)	Ve (6)
	<i>po</i>	Ve (65)	Ve (20)	Ve (9)	Ve (46)	Ve (6)
Methanol	<i>ip</i>	Mo (126)	Mo (20)	Sl* (10)	Mo (48)	Mo (5)
	<i>po</i>	Sl (90)	Sl (40)	No* (7)	Sl (23)	Sl (7)
Lidocaine	<i>ip</i>	Ve (72)	Ve (20)	Ve (9)	Ve (50)	Ve (7)
	<i>po</i>	Ve (90)	Ve (40)	Ve (8)	Ve (38)	Ve (6)
Hexachlorophene	<i>ip</i>	Ex (40)	Ex (20)	Ve*(10)	Ex (48)	Ex (6)
Average No. of mice used, Mean ± SD		77.7 ± 23.9	24.4 ± 8.8	8.4 ± 1.1	46.4 ± 8.8	6.1 ± 0.6



The use of Mono Mac 6 cells as indicators of endotoxin contamination in the quality control of injectable products

*Cristiane Caldeira, Izabela da Costa Gimenes, João C. B. Rolim de Freitas and Octavio A. F. Presgrave**

National Institute of Quality Control in Health, Department of Pharmacology and Toxicology, Rio de Janeiro, Brazil

ALTEX 22(Special Issue):213 (2005)

The use of cytokine release (whole blood assay) for detecting pyrogens in anti-venom sera

Octavio A. F. Presgrave¹, Fernanda Peres Sabagh¹, Luana Fortes Faria¹, Cristiane Caldeira¹, João C. B. Rolim de Freitas¹, Izabela da Costa Gimenes¹, Hugo C. de Castro Faria Neto², Patrícia Torres Bozza², Isabel Dieterich³, Illona Kindinger³ and Thomas Hartung³

¹National Institute of Quality Control in Health (INCQS)/Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Department of Pharmacology and Toxicology, Rio de Janeiro, Brazil; ²Oswaldo Cruz Institute (IOC)/Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Department of Physiology and Pharmacodynamics, Rio de Janeiro, Brazil; ³University of Konstanz, Department of Biochemical Pharmacology, Konstanz, Germany

ALTEX 22(Special Issue):221 (2005)





A proposal for classifying shampoos as irritant or non irritant using the Neutral Red Uptake assay

*Rosaura de Farias Presgrave, Daniel O. dos Santos Machado, Fernanda Peres Sabagh, Eloisa Nunes Alves and Octavio A. França Presgrave**

National Institute of Quality Control in Health (INCQS)/Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Department of Pharmacology and Toxicology, Rio de Janeiro, Brazil

ALTEX 22(Special Issue):172 (2005)

Evaluation of two alternative methods for assessing the ocular irritancy of hair-care products

*Eloisa Nunes Alves¹, Rosaura de Farias Presgrave¹, Octavio A. França Presgrave*¹, Fernanda Peres Sabagh¹, João C. Borges Rolim de Freitas¹, Isabella Fernandes Delgado¹ and Alexandre Pinto Corrado²*

¹National Institute of Quality Control in Health (INCQS)/Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Department of Pharmacology and Toxicology, Rio de Janeiro, Brazil; ²University of São Paulo, Department of Pharmacology, Ribeirão Preto, Brazil

ALTEX 22(Special Issue):176 (2005)





A Reassessment of the *In Vitro* RBC Haemolysis Assay with Defibrinated Sheep Blood for the Determination of the Ocular Irritation Potential of Cosmetic Products: Comparison with the *In Vivo* Draize Rabbit Test

Eloísa Nunes Alves,¹ Rosaura de Farias Presgrave,¹ Octávio Augusto França Presgrave,¹ Fernanda Peres Sabagh,¹ João Carlos Borges Rolim de Freitas¹ and Alexandre Pinto Corrado^{1,2}

¹Department of Pharmacology and Toxicology, National Institute of Health Quality Control, Oswaldo Cruz Foundation (INCQS/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil; ²Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (FMRP/USP), Ribeirão Preto, Brazil





Encontro sobre Métodos Alternativos ao Uso de Animais para Fins Regulatórios – Outubro de 2005

EMALT: A Brazilian Meeting on Alternative Methods to Animal Use for Regulatory Purposes

The Brazilian authorities require animal testing prior to the registration of products such as cosmetics, cleaning products, biologicals and medical devices. However, Brazil does not have an established process for the validation of alternative methods, and companies are trying to encourage the Brazilian authorities to accept data from alternative tests that may not be valid. Several industries question the rationale behind the

acceptance of information from alternative tests by the Brazilian Sanitary Surveillance Agency (ANVISA). To address these issues and to promote discussions between European and Brazilian stakeholders about how alternative methods can be validated for regulatory use within Brazil, the National Institute of Quality Control in Health (INCQS) held a meeting entitled *Meeting on Alternative Methods on Animal Use for Regulatory*



ATLA 33:670-672 (2005)



Grupo Alternativas - INCQS

- 4 Doutores
- 6 Mestres (2 doutorandos)
- 2 Técnicos
- 2 Bolsistas de Mestrado
- 1 Bolsista FAPERJ
- 1 Bolsista PIBIT
- 1 Bolsista PIBIC





VALIDAÇÃO

Processo de validação da EU

(ext. da apresentação de Michael Balls e Andrew Worth)





O que é validar um método?

- Estabelecer a confiabilidade e relevância do método para um propósito particular.

confiabilidade = reprodutibilidade de resultados, intra- e inter-laboratorial, bem como ao longo do tempo

relevância = valor científico e utilidade prática

propósito = aplicação pretendida do procedimento

Esta definição se aplica tanto aos métodos animais como alternativos.





- Validação é um processo no qual a base científica, a reprodutibilidade de um sistema de teste e a capacidade preditiva de um modelo são submetidos a uma avaliação independente.





Princípios Gerais da Validação

- 1) um método alternativo somente pode ser tido como válido se cumpre dois critérios: confiabilidade e relevância
- 2) o modelo de predição deve ser definido previamente pelo criador do teste
- 3) os critérios de execução devem ser previamente fixados pelo grupo gerente
- 4) a execução é avaliada pelo uso de amostras codificadas
- 5) deve haver independência:
 - a) do gerente do estudo
 - b) da seleção, codificação e distribuição das amostras
 - c) da coleta de dados e análise estatística
- 6) os procedimentos laboratoriais devem cumprir com BPL





Processo de validação

- Pré-validação – estudo inter-laboratorial em pequena escala, realizado para assegurar que o protocolo está suficientemente padronizado para inclusão em um estudo de validação formal

Fase I	Refinamento	Lab. 1	“laboratório líder”
Fase II	Transferência	Lab. 1 → Lab. 2 → Lab. 3	
Fase III	Execução	Labs 1, 2 e 3	





Processo de validação

- Validação – estudo inter-laboratorial em larga escala, desenhado para garantir a confiabilidade e relevância de um método otimizado para um propósito particular
- Validação “por captura” (Catch up Validation) – é um estudo de pré-validação no qual os critérios estruturais e de execução são comparados com aqueles de um método similar, o qual já passou por validação formal e foi aceito como cientificamente válido.





COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES

Brussels, 20.1.2005
SEC(2005) 45

COMMISSION STAFF WORKING DOCUMENT

Annex to the :

**Report on the Statistics on the
Number of Animals used for Experimental and other Scientific Purposes
in the Member States of the European Union
in the year 2002**



Table 1.3: Comparison between the numbers and proportions of classes of animals used in 1996, 1999 and 2002

	1996	1999	2002
Total number of animals used	11,646,130 *	9,814,171	10,731,020 **
% Rodents-rabbits	81.3	86.9	78.04
% Cold-blooded animals	12.9	6.6	15.4

* 14 Member States reporting for 1996, one for 1997

** 14 Member States reporting for 2002, one for 2001





COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES

Brussels, 5.11.2007
COM(2007) 675 final

**REPORT FROM THE COMMISSION TO THE COUNCIL AND THE EUROPEAN
PARLIAMENT**

**Fifth Report on the Statistics on the Number of Animals used for Experimental and
other Scientific Purposes in the Member States of the European Union**

{SEC(2007)1455}

The total number of animals used for experimental and other scientific purposes in 2005 in the 25 Member States (EU 25) amounts to 12,1 million (with data from France of 2004). The number of animals used in the EU 10 represents 8,6% of the total number of animals used in the EU 25.

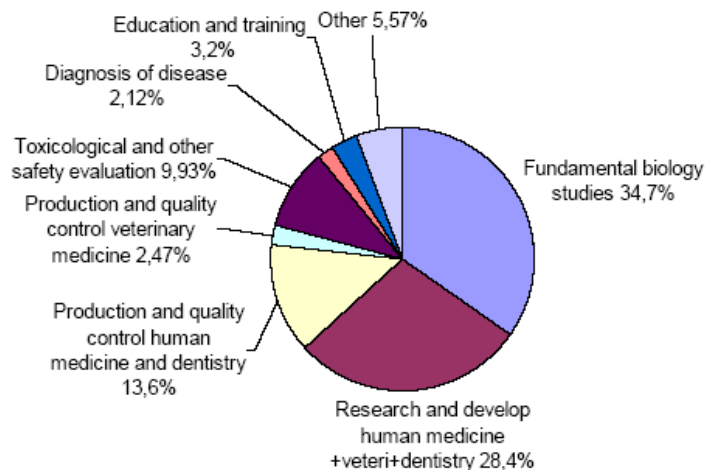




Comparando relatórios

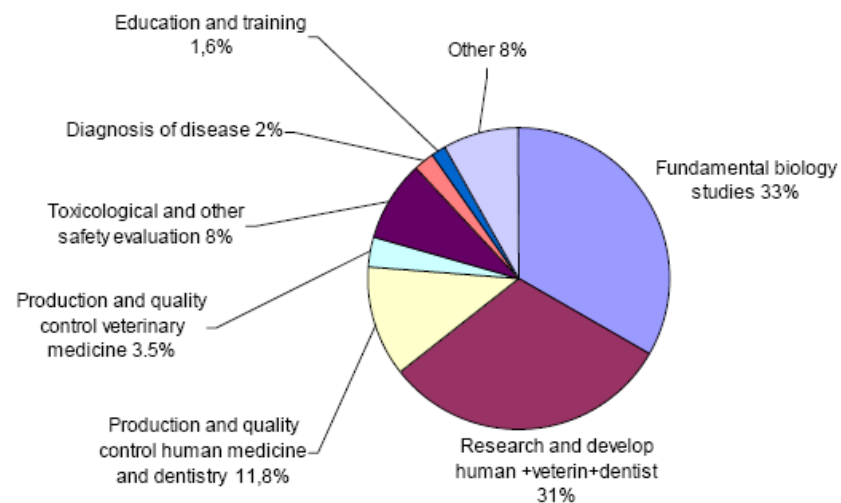
2005

Figure 2.1
Purposes of experiments



2007

Purposes of experiments





COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES

Brussels, 1.10.2004
SEC(2004) 1210

COMMISSION STAFF WORKING DOCUMENT

**Timetables for the phasing-out of animal testing in the framework of the 7th
Amendment to the Cosmetics Directive (Council Directive 76/768/EEC)**

3. TOXICOLOGICAL ENDPOINTS FOR WHICH ALTERNATIVE METHODS ARE FORESEEN BEFORE THE CUT-OFF-DATES PROVIDED BY ARTICLE 4A OF THE COSMETICS DIRECTIVE

Toxicological endpoints ³	Cut-off-dates provided by article 4a of the Cosmetics Directive for the <i>testing</i> ban	Cut-off-dates provided by article 4a of the Cosmetics Directive for the <i>marketing</i> ban	Estimated time to complete ECVAM validation including peer-review, of methods for replacement of animal tests, assuming that optimal conditions are met ⁴ .	Estimated time to achieve full replacement of animal tests with methods <i>adopted</i> at EU level ⁵ , assuming that optimal conditions are met.
Skin corrosion	11 March 2009	11 March 2009	Already validated	Reference number : - B.40 in Annex V of Council Directive 67/548/EEC - TG 430 and TG 431 in OECD Guidelines.
UV -induced toxic effects: acute phototoxicity	11 March 2009	11 March 2009	Already validated	Reference number: - B.41 in Annex V of Council Directive, 67/548/EEC - TG 432 in OECD Guidelines
Skin irritation - for hazard identification - for risk assessment	11 March 2009	11 March 2009	2006 to 2007 >2008	2007 to 2008 >2009
Eye irritation	11 March 2009	11 March 2009	2008	2009
Skin absorption/ penetration	11 March 2009	11 March 2009	2005 ⁶	2006 TG 428 in OECD Guidelines
UV-induced toxic effects - Photogenotoxicity	11 March 2009	11 March 2009	2007	2008



STATEMENT ON THE VALIDITY OF *IN-VITRO* TESTS FOR SKIN IRRITATION

At its 26th meeting, held on 26-27th April, 2007 at the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), Ispra, Italy, the non-Commission members of the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC)¹ unanimously endorsed the following statement:

After a review of scientific reports and peer reviewed publications on the following range of *in-vitro* tests, which had been subjected to a full validation study:

1. EpiDerm (with MTT reduction and IL-1 α release);
2. EPISKIN (with MTT reduction and IL-1 α release);

of these, the EPISKIN method showed evidence of being a reliable and relevant stand-alone test for predicting rabbit skin irritation, when the endpoint is evaluated by MTT reduction, and for being used as a replacement (**based on the performance of the assay as specified in the annex**) for the Draize Skin Irritation Test (OECD TG 404 & Method B.4 of Annex V to Directive 67/548/EEC) for the purposes of distinguishing between R38 skin irritating and no-label (non-skin irritating) test substances. At the present time, the IL-1 α endpoint should be regarded as a useful adjunct to the MTT assay, as it has the potential to increase the sensitivity of the test, without reducing its specificity. This endpoint could be used to confirm negatives obtained with the MTT



4. TOXICOLOGICAL ENDPOINTS FOR WHICH NO ALTERNATIVE METHODS ARE FORESEEN BEFORE THE CUT-OFF-DATES PROVIDED BY ARTICLE 4A OF THE COSMETICS DIRECTIVE

For the following end-points the ad hoc experts group and the Scientific Committee on Cosmetic products and Non Food Products intended for consumers did not foresee alternative methods before the cut-off dates provided by article 4a of the Cosmetics Directive⁷.

Toxicological endpoints ⁸	Cut-off-dates provided by article 4a of the Cosmetics Directive for the <i>testing</i> ban	Cut-off-dates provided by article 4a of the Cosmetics Directive for the <i>marketing</i> ban
Acute toxicity	11 March 2009	11 March 2009
Skin sensitisation	11 March 2009	11 March 2013
Subacute and subchronic toxicity	11 March 2009	11 March 2013
Genotoxicity and Mutagenicity	11 March 2009	11 March 2009
UV-induced toxic effects, photo-allergy (sensitisation)	11 March 2009	11 March 2013
Toxicokinetics and metabolism	11 March 2009	11 March 2009
Carcinogenicity	11 March 2009	11 March 2013
Reproductive and developmental toxicity	11 March 2009	11 March 2013



Uso de animais em testes de cosméticos - UE

	1998	1999	2000	2001	2002	2003
França	4150	3518	2925	2591	2053	1618
	<i>Animais utilizados:</i> ratos, coelhos, peixes, hamsters e porcos-da-índia					
Itália	19	98	129	1	60	0
	<i>Animais utilizados:</i> coelhos e ratazanas					
Dinamarca	23	14	84	0	40	0
	<i>Animais utilizados:</i> ratos e porcos-da-índia					
Espanha	Dados não disponíveis	Dados não disponíveis	Dados não disponíveis	Dados não disponíveis	0	Dados não disponíveis
Outros Estados-Membros*	0	0	0	0	0	0

*Os novos Estados-Membros apresentaram dados relativos apenas a 2003.





Próximos passos:

- Implantar os métodos já validados
- Validar os métodos ainda em estudo





Uma proposta...

Uma ousadia...

BraCVAM

Brazilian **C**enter for **V**alidation of **A**lternative **M**ethods





“Comece fazendo o necessário, depois o possível e,
de repente, você estará fazendo o impossível.”

São Francisco de Assis





Octavio Augusto França Presgrave

Dep. de Farmacologia e Toxicologia - INCQS/FIOCRUZ

Avenida Brasil, 4.365 – Manguinhos

21045-900 – Rio de Janeiro – RJ – Brasil

Tel.: (21) 3865-5140

Fax: (21) 2290-0915

E-mail: octavio.presgrave@incqs.fiocruz.br

