

MÉTODOS ALTERNATIVOS À EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL PARA AVALIAÇÃO DE INGREDIENTES E PRODUTOS COSMÉTICOS

Simone Fanan Hengeltraub
Diretora Executiva – SBMAIt
sbmalt@hotmail.com



COMISSÃO
EUROPEIA

Bruxelas, 5.12.2013
COM(2013) 859 final

RELATÓRIO DA COMISSÃO AO CONSELHO E AO PARLAMENTO EUROPEU

Sétimo relatório de dados estatísticos sobre o número de animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos nos Estados-Membros da União Europeia

{SWD(2013) 497 final}

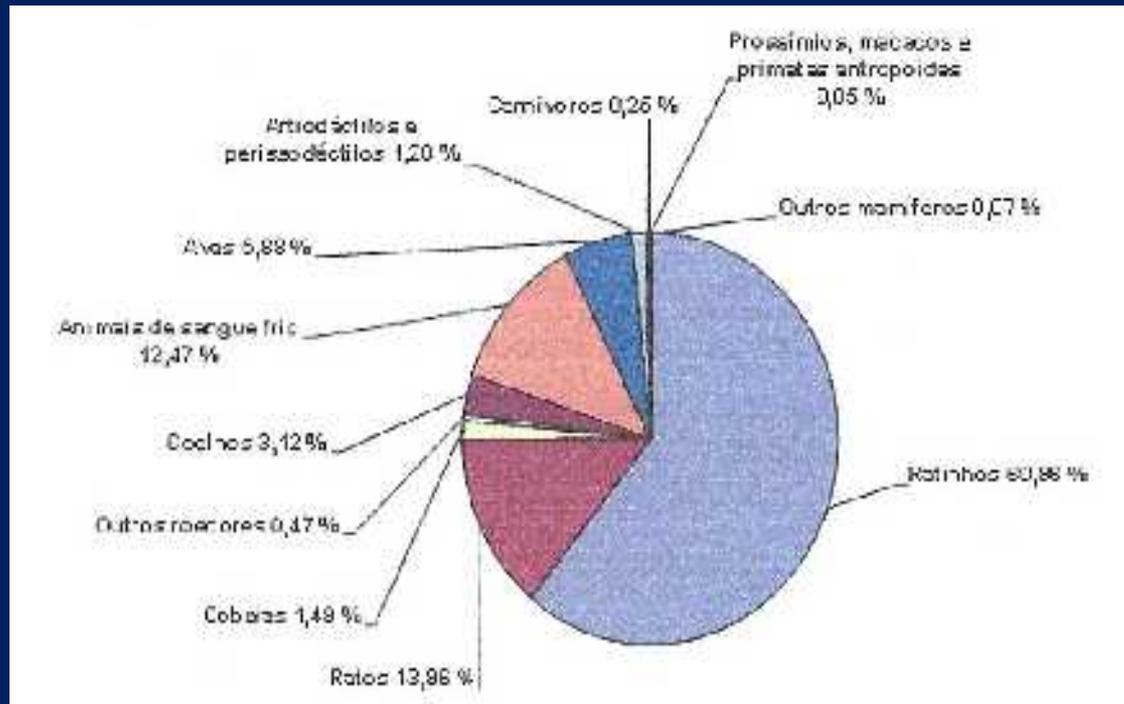
7º Relatório de Dados Estatísticos sobre o nº de animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos nos Estados-Membros da União Europeia

em como objetivo “...apresentar dados estatísticos sobre o número de animais utilizados para fins científicos nos Estados-Membros da União Europeia em 2011, nos termos do artigo 26º da Diretiva 86/609/CEE...”

Table 1.0: Changes in species number and proportion between 2008 and 2011

Species	Number of animals in EU 27	Number of animals in EU 27	Change since 2008	% change by species	
	2008	2011			
1.a	Mice (<i>Mus musculus</i>)	7122188	6999312	-122876	-1,73
1.b	Rats (<i>Rattus norvegicus</i>)	2121727	1602969	-518758	-24,45
1.c	Guinea-Pigs (<i>Cavia porcellus</i>)	220985	171584	-49401	-22,35
1.d	Hamsters (<i>Mesocricetus</i>)	32739	25251	-7488	-22,87
1.e	Other Rodents (other Rodentia)	39506	28465	-11041	-27,95
1.f	Rabbits (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	333213	358213	25000	7,50
1.g	Cats (<i>Felis catus</i>)	4088	3713	-375	-9,17
1.h	Dogs (<i>Canis familiaris</i>)	21315	17896	-3419	-16,04
1.i	Ferrets (<i>Mustela putorius furo</i>)	3208	2540	-668	-20,82
1.j	Other Carnivores	2853	4982	2129	74,62
1.k	Horses, donkeys and cross-breeds (<i>Equidae</i>)	5976	6686	710	11,88
1.l	Pigs (<i>Sus</i>)	92813	77280	-15533	-16,74
1.m	Goats (<i>Capra</i>)	3840	2907	-933	-24,30
1.n	Sheep (<i>Ovis</i>)	30190	26892	-1298	-4,30
1.o	Cattle (<i>Bos</i>)	33952	30914	-3038	-8,95
1.p	Prosimians (<i>Prosimia</i>)	1261	83	-1178	-93,42
1.q	New World Monkeys (<i>Ceboloidea</i>)	904	700	-204	-22,57
1.r	Old World Monkeys (<i>Cercopithecoidea</i>)	7404	5312	-2092	-28,25
1.s	Apes (<i>Hominoidea</i>)	0	0	0	0,00
1.t	Other Mammals (other Mammalia)	5704	7888	2184	38,29
1.u	Quail (<i>Coturnix coturnix</i>)	9626	5614	-4012	-41,68
1.v	Other birds (other Aves)	754485	669451	-85034	-11,27
1.w	Reptiles (<i>Reptilia</i>)	4101	3824	-277	-6,75
1.x	Amphibians (<i>Amphibia</i>)	61788	29583	-32206	-52,12
1.y	Fish (<i>Pisces</i>)	1007133	1397462	310307	28,54
1.z	TOTAL	12001022	11481521	-519501	-4,33

Categorias de animais utilizadas pelos Estados-Membros (%)

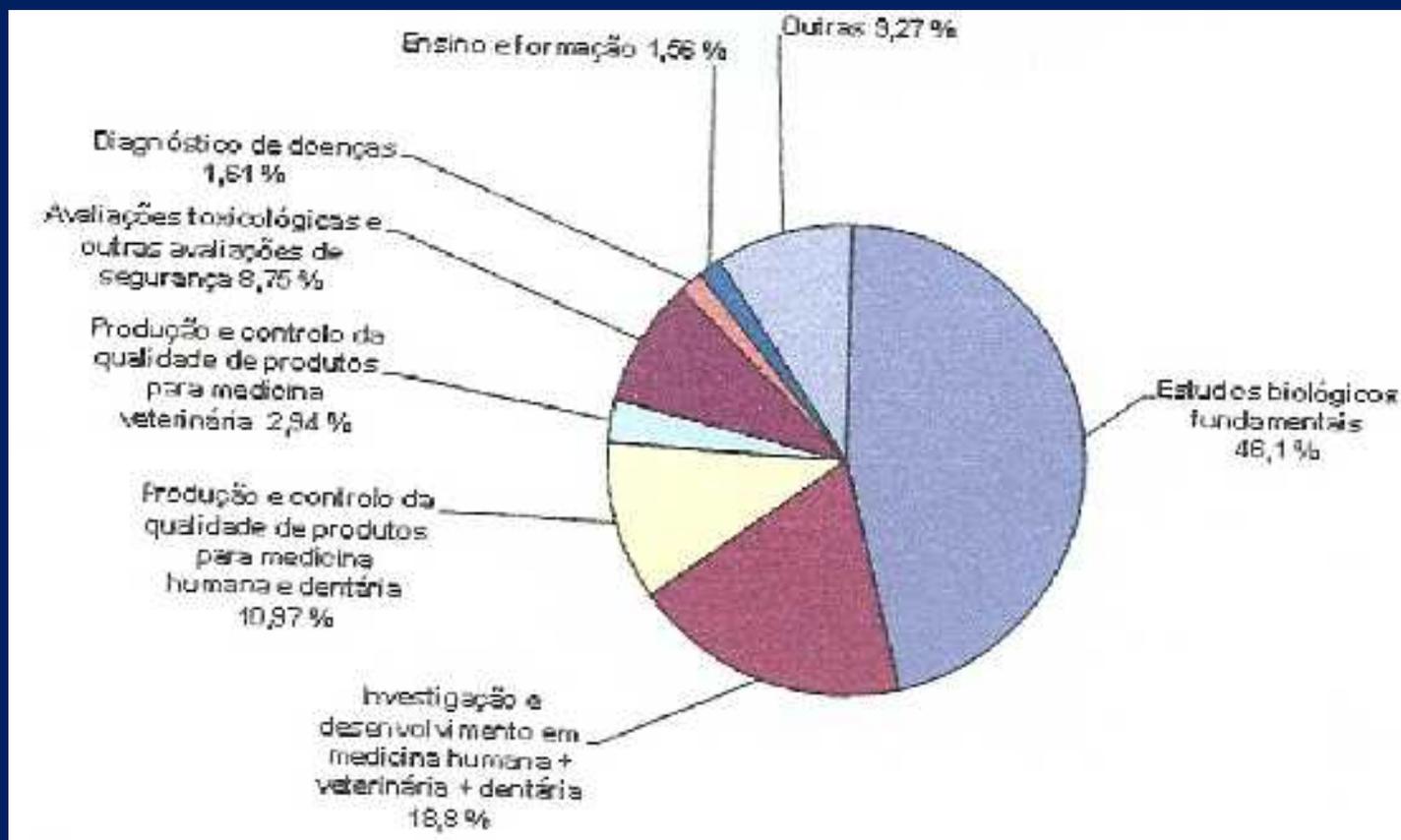


roedores (incluindo coelhos): 80%

animais de sangue frio: 12,4%

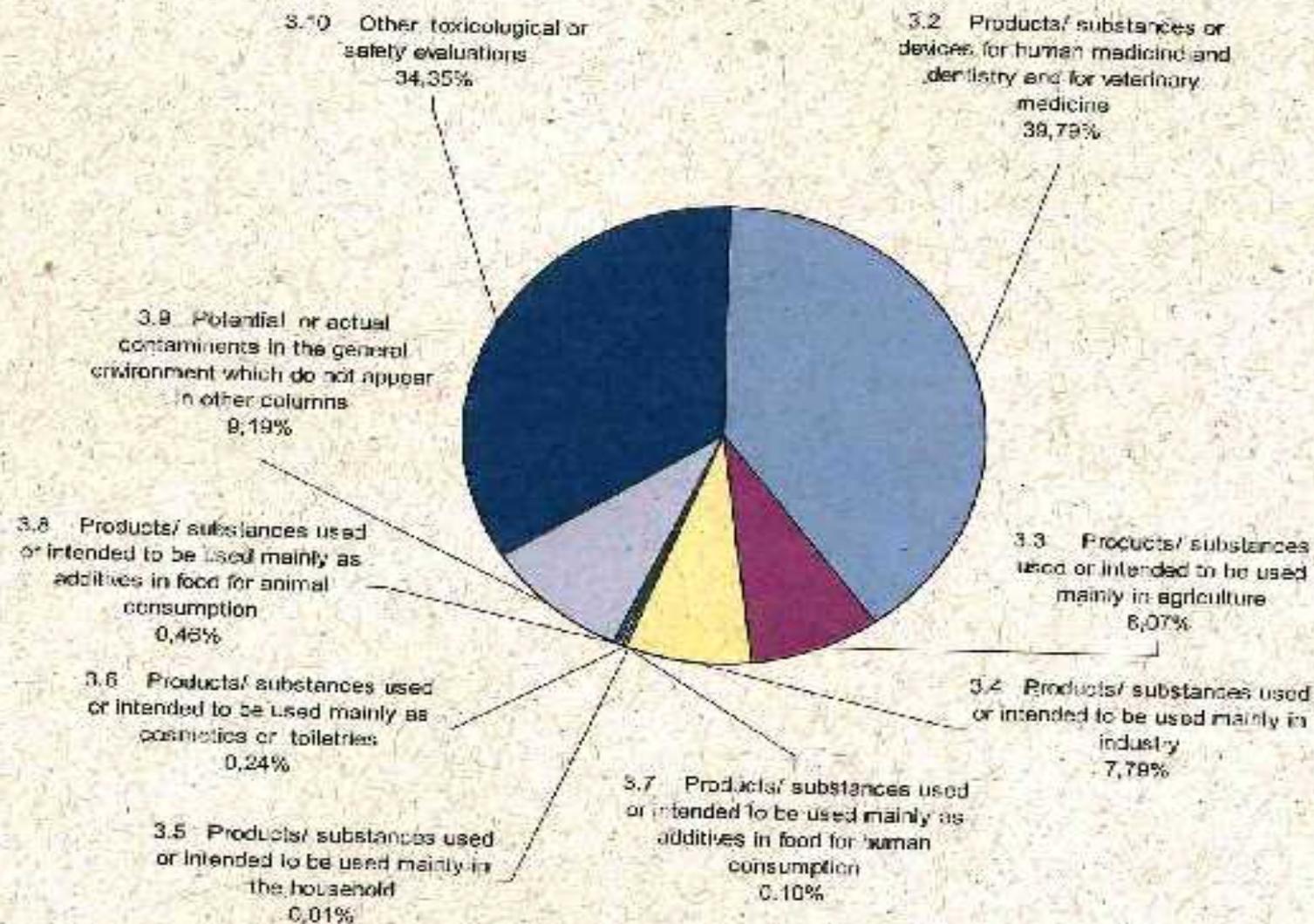
aves: 5,9%

Finalidade das Experiências



Investigação e desenvolvimento nos domínios da medicina humana, veterinária e dentária, bem como em estudos biológicos de carácter fundamental: 60%

Figure 3
Number of animals used in toxicological and other safety evaluation



Por que Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos é tão Importante?

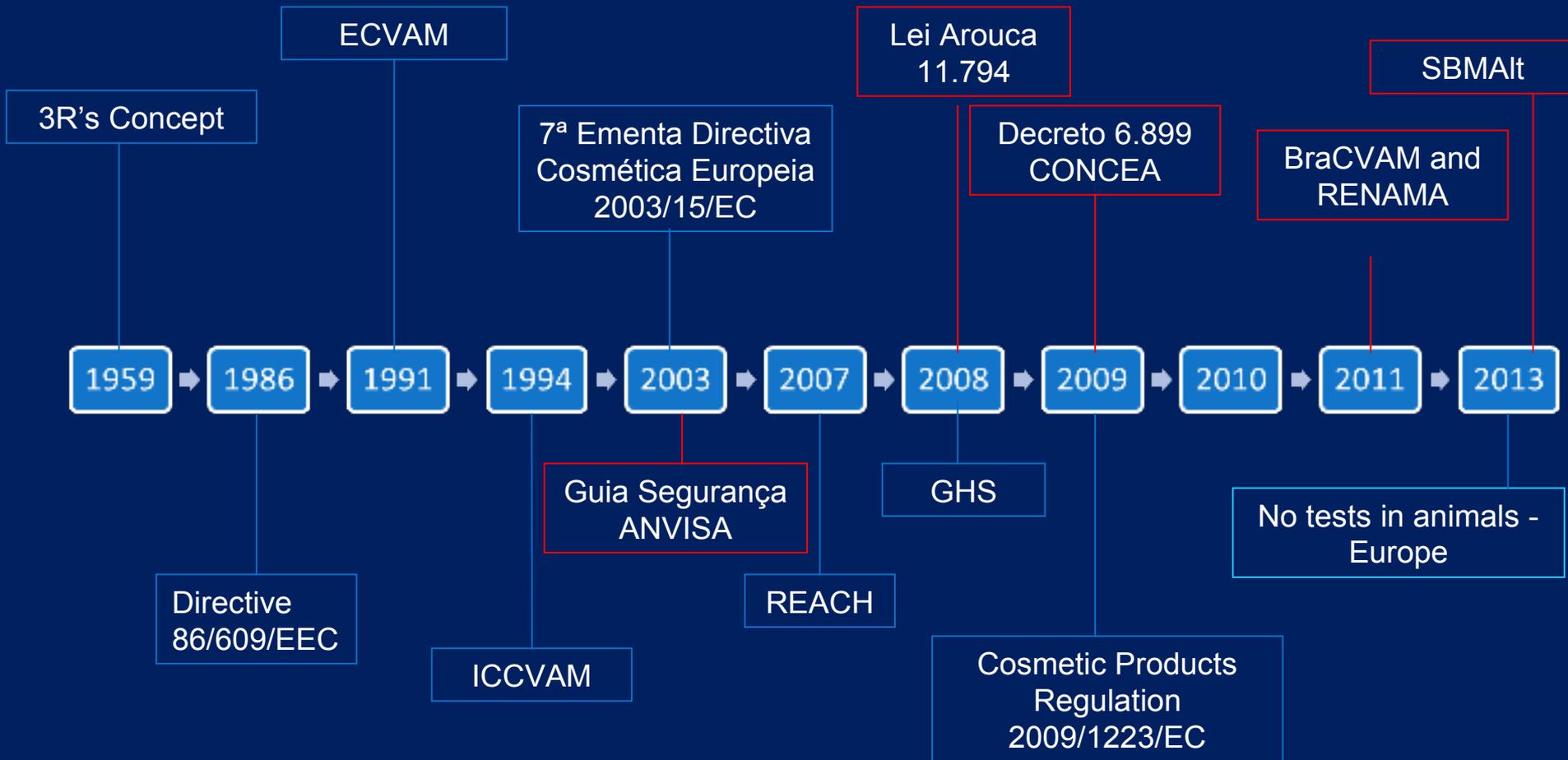
- Livre acesso a produtos cosméticos
- Acesso público cada vez mais cedo
- Maior número de diferentes tipos de produtos cada vez mais cedo



Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos (2012)

“A avaliação da segurança deve preceder a colocação do produto cosmético no mercado. A empresa é responsável pela segurança do produto cosmético, conforme assegurado pelo Termo de Responsabilidade apresentado no ato da regularização do produto, onde a mesma declara possuir dados comprobatórios que atestam a sua eficácia e segurança.”

Evolução dos MA na Legislação Brasileira e Européia



C.P. Métodos Alternativos CONCEA

Câmara Permanente de Métodos Alternativos parte da premissa de que o uso de animais em ensino e pesquisa científica deve ser considerado somente quando não há **método alternativo disponível**. Além disso, deve haver evidências justificáveis para o uso de animais, entre as quais a efetiva contribuição para a melhor compreensão de fenômenos biológicos fundamentais ou para o aprimoramento do conhecimento ou de tecnologias capazes de gerar benefícios para os humanos ou animais.



BraCVAM

Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos

9 de Agosto de 2011: ANVISA aprovou parceria com INCQS/Fio Cruz para diminuir/substituir o uso de animais em pesquisa.

prof. Dr. Octávio Presgrave – Fio Cruz

parceria com RENAMA e InMetro



RENAMA

Rede Nacional de Laboratórios especializados em Métodos Alternativos

Portaria nº 491 do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), 03 de Julho de 2012.



rg.br



O Brasil, comprometido com as questões éticas e o conceito dos 3Rs (do Inglês: *Refinement, Reduction and Replacement*), instituiu por meio da Portaria nº 491, de 3 de Julho de 2012, do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), a Rede Nacional de Métodos Alternativos (Renama). Considerando a estratégia nacional de ciência, tecnologia e inovação; e a estratégia nacional de articulação dos laboratórios de pesquisa, a Renama tem como foco a eficiência econômica, a otimização da infraestrutura, a complementaridade de atribuições e a capacidade de inovação nacional. A Renama tem como objetivos estimular a implantação de ensaios alternativos ao uso de animais através do auxílio do treinamento técnico; monitorar periodicamente o desempenho dos laboratórios; promover a qualidade dos ensaios através do desenvolvimento de materiais de referência químicos e biológicos certificados; incentivar a implementação do sistema de qualidade laboratorial e dos princípios das boas práticas

de laboratórios (BPL); promover o desenvolvimento, a validação e a certificação de novos métodos alternativos ao uso de animais.

Laboratórios do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro), do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) e o Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) constituem os Laboratórios Centrais da Rede, os quais tem a missão de desenvolver e disseminar os métodos alternativos, bem como coordenar as comparações inter-laboratoriais. Em parceria com o Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos apoiar a validação de métodos alternativos segundo a guia 34 da OECD.

Os laboratórios que realizam ou pretendem realizar métodos alternativos e apresentem bom desempenho nas comparações interlaboratoriais constituirão os Laboratórios Associados da Rede.

Para se cadastrar como interessado em participar deste processo acesse o site da Renama (www.renama.org.br) e cadastre seu laboratório.

SBMAIt

Sociedade Brasileira de Métodos Alternativos à Experimentação
Animal

COLAMA (Novembro de 2012)

reunião em Março de 2013

objetivo em aglutinar competências, difundir informação
científica e promover o desenvolvimento e pesquisa em



SBMAIt



Brazilian Centre for the
Validation of Alternative Methods



Rede Nacional de Métodos
Alternativos



Conselho Nacional sobre
Experimentação Animal



Agência Nacional de Vigilância
Sanitária

Slide cedido por Octavio Presgrave (BraCVAM)

Evolução dos MA na Legislação Brasileira e Europeia - Continuação

013

Guia para a Condução de Estudos Não-Clínicos de Segurança Necessário ao Desenvolvimento de Medicamentos (Brasília, 31 de Janeiro de 2013)

Evolução dos MA na Legislação Brasileira e Europeia - Continuação

014

CATM Alternative Test Method Validation and Regulatory Acceptance (January 2014, Status Report for ICCR)

rojeto de Lei 6602-A/2013 em aprovação no Senado Federal

uia de Orientação para Registro de Medicamento Fitoterápico e Registro e Notificação de Produto Tradicional Fitoterápico (Instrução Normativa nº 4, 18 de Junho de 2014)

Evolução dos MA na Legislação Brasileira e Europeia - Continuação

014

ONCEA reconhece 17 MA no âmbito da Resolução Normativa nº 17 de 30 de Junho de 2014.

NVISA deliberou pela aceitação de 17 Métodos Alternativos Validados (21 de Agosto de 2014)

[+-+noticias+anos/2014+noticias/anvisa+aceita+17+metodos+em+substituica](#)

Lista dos MA *In Vitro* Aceitos pela ANVISA

<http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/310553.html>

Estudo	Método	OECD
Corrosividade	Teste de Resistência Elétrica Transcutânea (TER) Epiderme Humana Reconstituída	TG 430 TG 431
Fototoxicidade	3T3 NRU Fototoxicidade	TG 432
Penetração cutânea	Barreira de Membrana	TG 435
Irritação cutânea	Modelo de Pele e Epiderme Reconstituído	TG 439
Irritação Ocular	BCOP ICE Permeação de Fluoresceína	TG 437 TG 438 TG 460
Absorção cutânea	Absorção cutânea	TG 428
Toxicidade Oral Aguda	Estimativa da Dose Inicial 3T3 NRU citotoxicidade	TG 129
Genotoxicidade	Teste do Micronúcleo em Células de Mamíferos	TG 487

Lista dos MA *In Vivo* Aceitos pela ANVISA

<http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/310553.html>

arecer nº 195/2014/CONCEA

Estudo	Método	OECD
Sensibilização Cutânea	Ensaio do Linfonodo Local (LLNA) Versões não Radioativas do Ensaio do Linfonodo Local (rLLNA)	TG 429 TG 442A TG 442B
Toxicidade Oral Aguda	Procedimento de Doses Fixas Classe Tóxica Aguda Procedimento “Up and Down”	TG 420 TG 423 TG 425

ICATM Alternative Test Method Validation and Regulatory Acceptance

January 2014, Status Report for ICCR

<http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/icatm/icatm-reportforiccr-jan2014-508.pdf>

CATM International Cooperation on Alternative Test Methods

5 centros de validação: ECVAM, ICCVAM, Canadá, JaCVAM, KoCVAM

CCR International Cooperation on Cosmetics Regulation:

embros: Canada, União Européia, Estados Unidos e Japão



Testes	Desenvolvimento	Pre- validação	Validação	Aceitação Regulatória
Corrosividade	✓	✓	✓	✓
Fototoxicidade	✓	✓	✓	✓ ICH S10
Absorção/Penetração cutânea	✓	✓	✓	✓
Irritação cutânea	✓	✓	✓	✓
Irritação Ocular	✓	✓	✓ *	✓ *
Toxicidade Aguda	✓	✓	✓ *	✓ *
Mutagenicidade	✓	✓	✓	✓
Genotoxicidade	✓	✓	Em avaliação	
Sensibilização cutânea	✓	✓	✓ *	✓ *
Reprodutiva	✓	✓	✓ *	Em avaliação
Toxicocinética	✓	✓	✓ *	Em avaliação
Carcinogenicidade	✓	✓ *	Em avaliação	
Toxicidade Sub-aguda & Sub-crônica	✓			

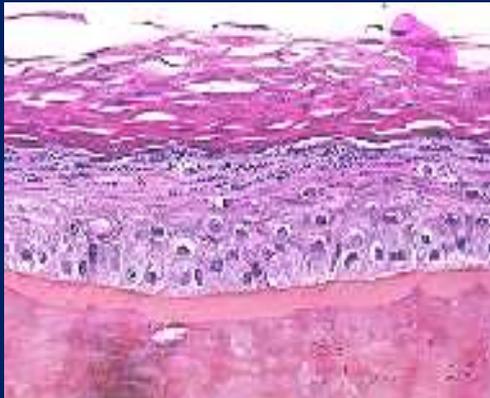
Corrosão Cutânea

➤ Métodos Alternativos Validados (substituição):

- TER (Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance; EC B.40, OECD 430 atualizado Julho 2013)
- EPISKIN™, EpiDerm™, SkinEthic™ e EST-1000: modelos 3D de epiderme e pele equivalentes (EC B.40bis, OECD 431 atualizados 2013).
- Corrositex™ (OECD 435, 2006): passou pelo ECVAM e ESAC. É usado somente para substâncias químicas ácidas ou básicas [ESC 2000].

Irritação Cutânea

- Método Alternativo Validado (substituição):
 - EPISKIN™, EpiDerm™, SkinEthic™, LabCyte EPI-Model24 SIT: modelos 3D de epiderme e pele equivalente (EC B.46, OECD TG439 atualizado 2013).



Corrosão/Irritação Ocular

Métodos Alternativos Validados:

- 1) BCOP: Bovine Cornea Opacity Permeability (EU B.47, OECD 437)
- 2) ICE: Isolated Chicken Eye (EU B.48, OECD 438 adopted at WNT 2013)
- 3) Cytosensor Microphysiometer (OECD draft)
- 4) Fluorescein Leakage (OECD 460 2012)
- 5) Cytotoxicity test (STE) Short Time Exposure (Draft OECD by WNT 26 expected in 2014)

In Vitro Screening:

- 3) IRE: Isolated Rabbit Eye (*screening* tests, somente para suportar evidências).
- 4) HET-CAM: Hen's Egg Test-Chorio Allantoic Membrane (*screening* tests, somente para suportar evidências).

Corrosão/Irritação Ocular

There are presently no fully validated in Europe alternative methods replacing the classical Draize *in vivo* eye irritation test,

FOR COSMETICS LEGISLATION

The available alternative methods for eye irritation / corrosion currently consist of a screening battery of **two assays**, namely the **BCOP (Bovine Cornea Opacity Permeability) [OECD 437, EC B.47]** and the **ICE (Isolated Chicken Eye) [OECD 438, EC B.48]**. They can be used in the process of **hazard identification (not risk assessment)** and allow the elimination of severe eye irritants, but **fail to detect mild irritants**. Two other screening tests, namely the IRE (Isolated Rabbit Eye) and HET-CAM (Hen's Egg Test-Chorio Allantoic Membrane), also provide supportive evidence for cosmetic ingredient safety assessment [SCCS/1294/10]. Several tests, including human reconstructed tissue models, are presently under

Estratégias para Avaliar Irritação Ocular

“Bottom-Up/Top-Down”

(Chantra Eskes, 2010; Scott et.al., 2010 and SCCS 2012)

A hazard identification testing scheme was proposed using a bottom-up (starting with test methods able to accurately identify non-irritants) or top-down (starting with test methods able to accurately identify severe irritants) progression of *in vitro* tests. As such the approach intends to identify non-irritants and severe irritants, leaving all others to the (mild/moderate) irritant categories.

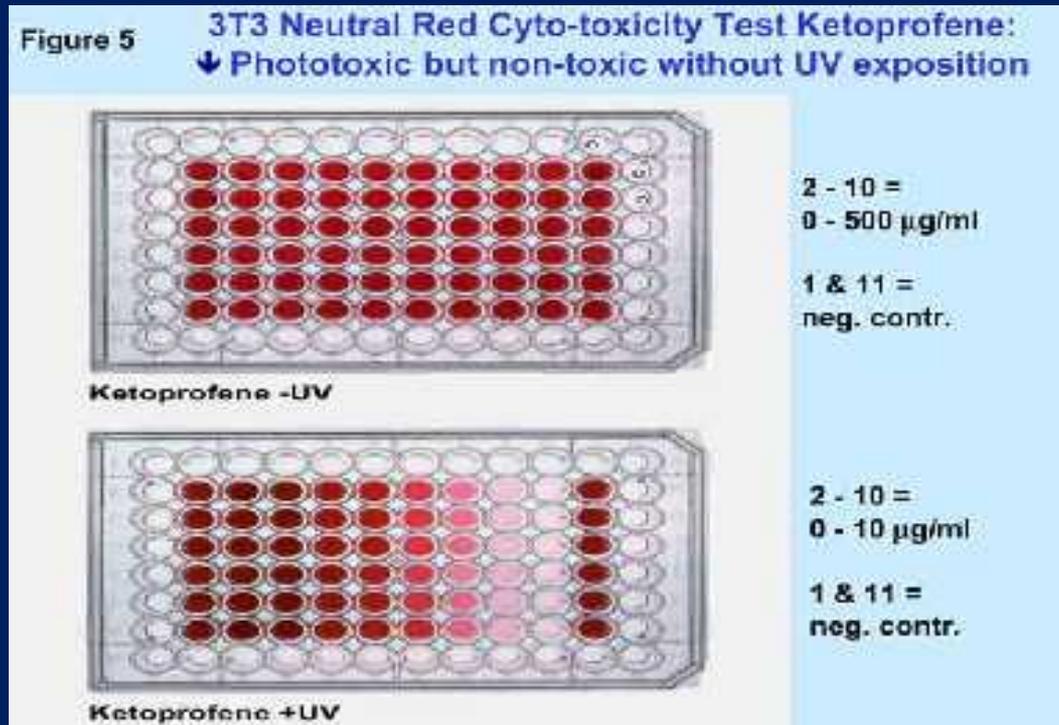
Corrosão/Irritação Ocular

Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos (2012)

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

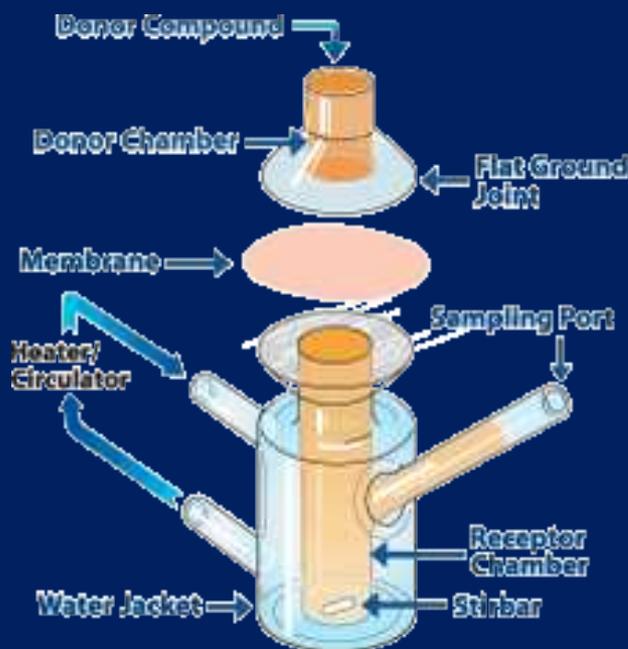
Fototoxicidade

- Método Alternativo Validado (substituição):
 - 3T3 Neutral Red Uptake Phototoxicity Test (EC B.41, OECD 432).
 - Sin equivalent in study
 - Teste *In vitro* baseado na detecção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e fotoestabilidade foi finalizado em 2013 (ICH S10)



Absorção Cutânea

- Método Alternativo Validado (substituição):
 - Pele de porco e humana (OECD 428 e SCCP/0970/06)
 - Pele equivalente em estudo



Sensibilização Cutânea

Mecanismo e Estratégia Européia para a Avaliação *In Vitro* da Sensibilização Cutânea.

- OECD 2012a: 12 Maio 2012

“The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins”; Part 1: Scientific Evidence Series on Testing and Assessment No.168.

- “EURL ECVAM Strategy for Replacement of Animal Testing for Skin Sensitisation Hazard Identification and Classification”; January 2013

OECD – “Adverse Outcome Pathway AOP”

Descreve em detalhe a chave dos eventos biológicos e mecanísticos desde os eventos iniciais moleculares (ligações covalentes) até os efeitos adversos observados em humanos.

Métodos *in vitro*, *in químico* e *in silico* devem ser combinados para substituir completamente os testes *in vivo* para identificação de químicos perigosos e avaliação de risco.

ITS: “Integrated Testing Strategies”

Short Term Goals (2013 – 2014)

Finalizar a validação dos métodos que já estão no ECVAM:

- DPRA (Direc Peptide Reactivity Assay): EURL ECVAM Recommendation (December 2012, draft OECD).
- h-CLAT (Human Cell Line Activation Test)
- Keratinosenses: EURL ECVAM Recommendation (Fevereiro 2014, draft OECD).

Mutagenicidade

➤ Métodos Alternativos Validados (substituição):

Adendum ao SCCS 2012 8th Revision (2014): mutagenicidade a nível genético, quebra ou rearranjo de cromossomos (clastogenicidade), número de aberrações cromossômicas (aneugenicidade)

- Bacterial Reverse Mutation (teste AMES): EC B.13/14, OECD 471 1997
- *In Vitro* Micronucleous test: EC B.10, OECD 487 (2012), ICH 2011 (S2(R1)).



Genotoxicidade

EURL ECVAM estratégia para reduzir o uso de animais nos estudos de genotoxicidade – 16 May 2013 (Ver documento)

- *In Vitro* Micronucleous test using 3D skin equivalent model
- Comet assay using 3D skin equivalent model
- HEN-MN: hen's egg test for micronucleus induction

- *In Vitro* Micronucleous test: EC B.10, OECD 487 (2012), ICH 2011 (S2(R1)).

Carcinogenicidade

<http://alttox.org/mapp/table-of-validated-and-accepted-alternative-methods>

➤ Métodos Alternativos Validados (refinamento e redução):

3 Ensaio de transformação celular (recomendação ECVAM 2012, Draft OECD 2012) e no Adendum ao SCCS 2012 8th Revision (2014):

- Syrian Hamster Embryo (SHE) Cell Transformation Assay CTA realizado a pH 6,7
- SHE CTA realizado a pH 7,0
- Balb/C 3T3 CTA

1 Ensaio de transformação celular (recomendação ECVAM 2013):

- Bhas42

ICH Regulatory Notice Document 08/08/2013 (refinamento e redução) **IN VIVO**

Toxicocinética

A Toxicocinética descreve como o corpo manipula um químico, em função da dose e do tempo de exposição, em termos de ADME (absorção, distribuição, metabolização e excreção).

Estudos Não-Clínicos *IN VIVO* somente.

Validação de 2 estudos *in vitro* de biotransformação hepática baseados na indução de CYP contínua. SPSF para PBTG foi aprovado por WNT25 em Abril 2013.

-ICH Harmonised Tripartite Guideline, 27 October 1994:
Exposição Sistêmica e Doses Repetidas

Toxicidade Sistêmica Aguda

➤ Métodos Alternativos Validados (refinamento e redução):

Toxicidade Oral Aguda:

- Fixed dose method (EC B.1, OECD TG 420)
- Acute Toxic class method (EC B.1 tris/ OECD TG 423)
- Up-and-Down procedure (OECD TG 425)

Cosmetic products containing substances that have been subject to acute toxicity testing after 11 March 2013 to meet the requirements of the Cosmetic Products Directive, **are not allowed on the EU market.**

➤ **Replacement strategy???** (reduction)

- In particular for REACH
- Balb/C 3T3 Citotoxicidade (OECD 129)
- For chemicals not requiring classification as toxicants (“negative” substances)

Novos e Futuros Ensaios Toxicológico

F.-X. Reichl, M. Schwenk; *Regulatory Toxicology* (2014)

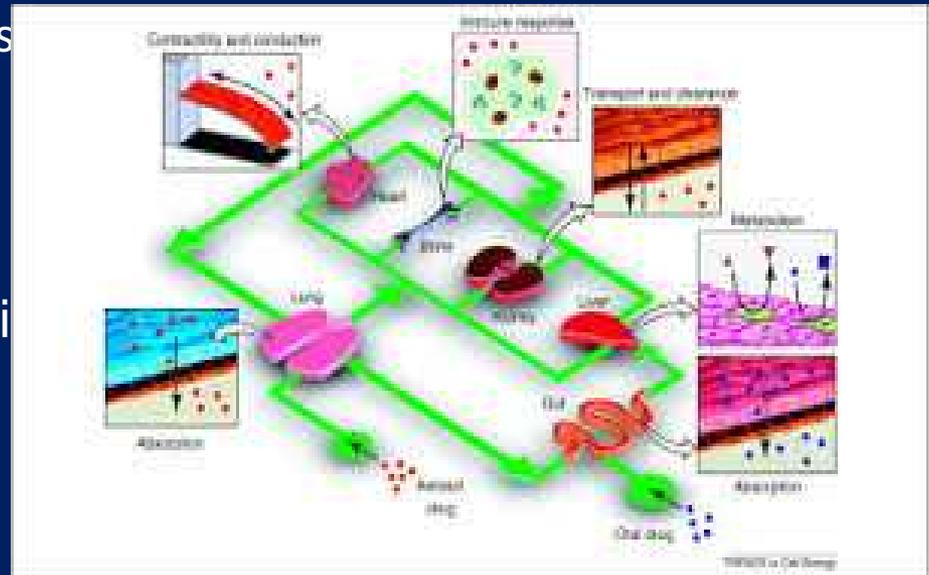
desafios para os testes regulatórios no século XXI

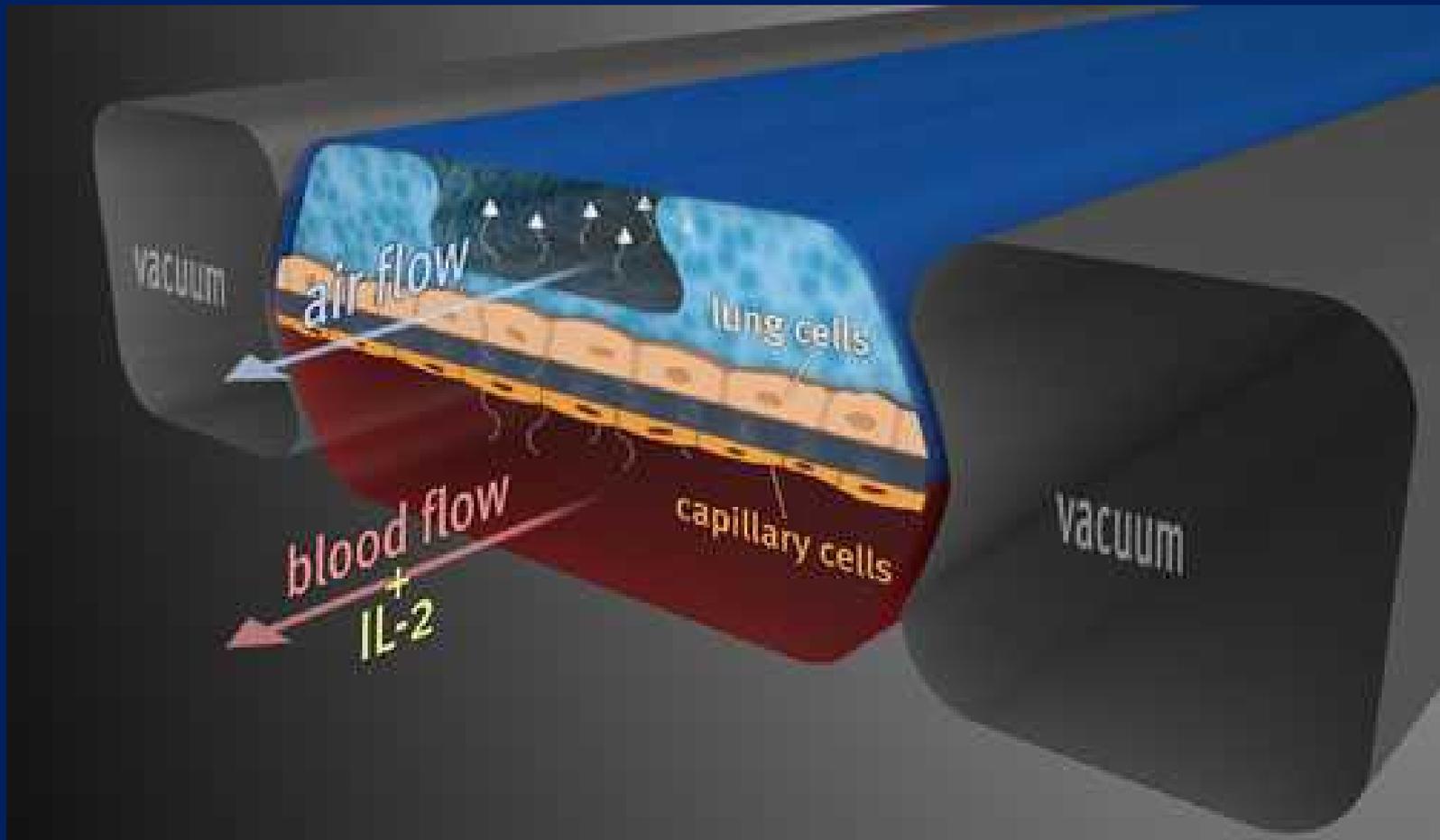
Como novas tecnologias podem transformar abordagens existentes?



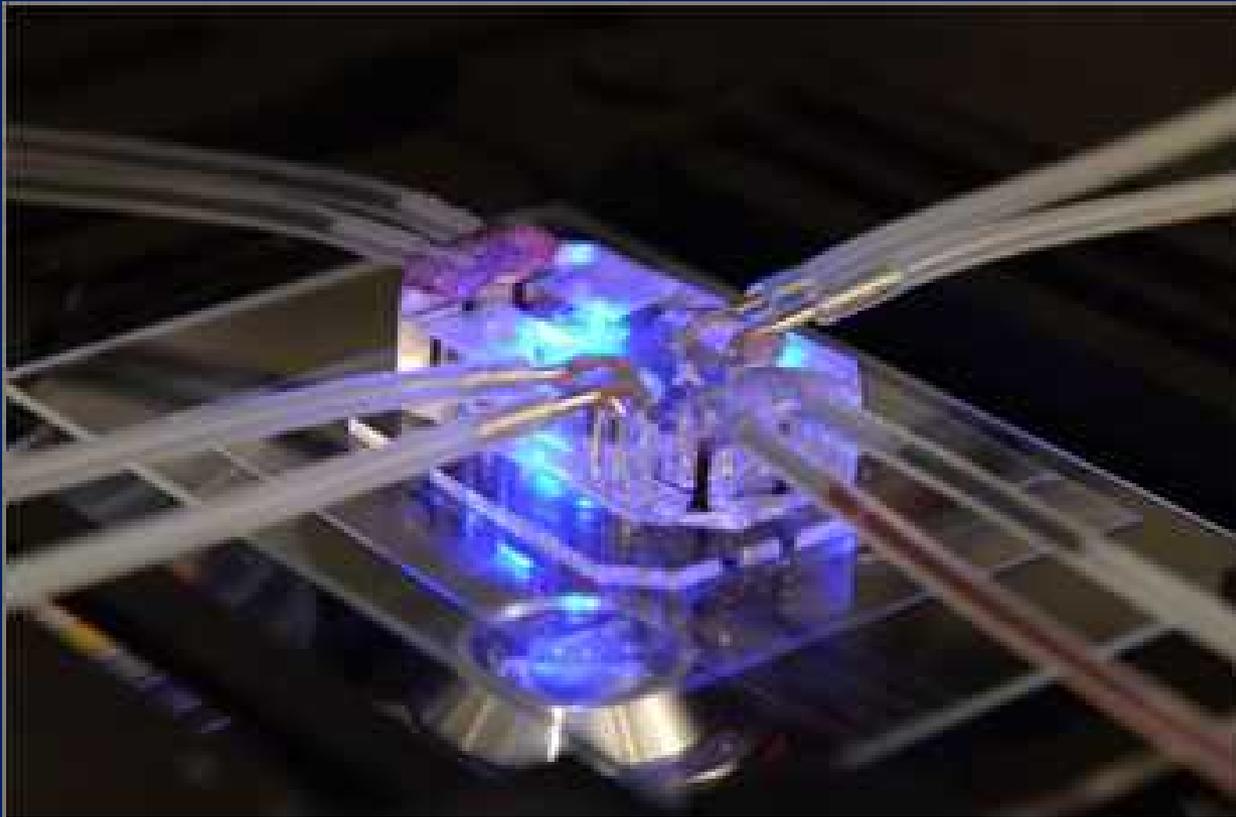
delos

a-chi



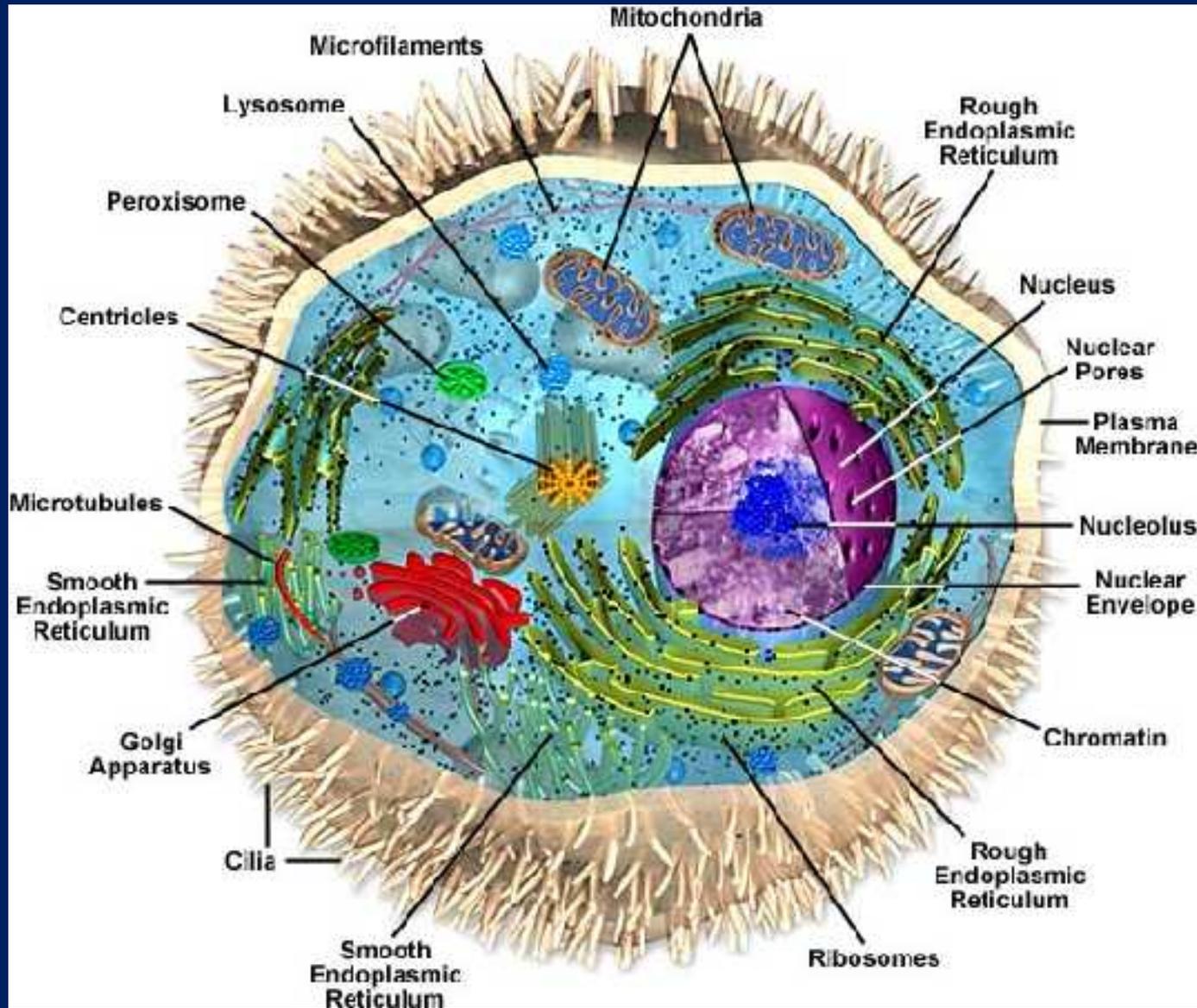


the Wiss Institute's human breathing lung-on-a-chip

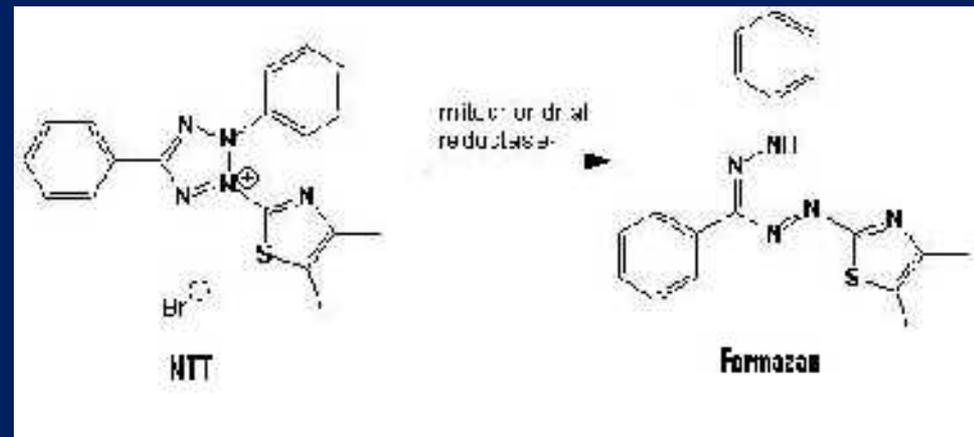
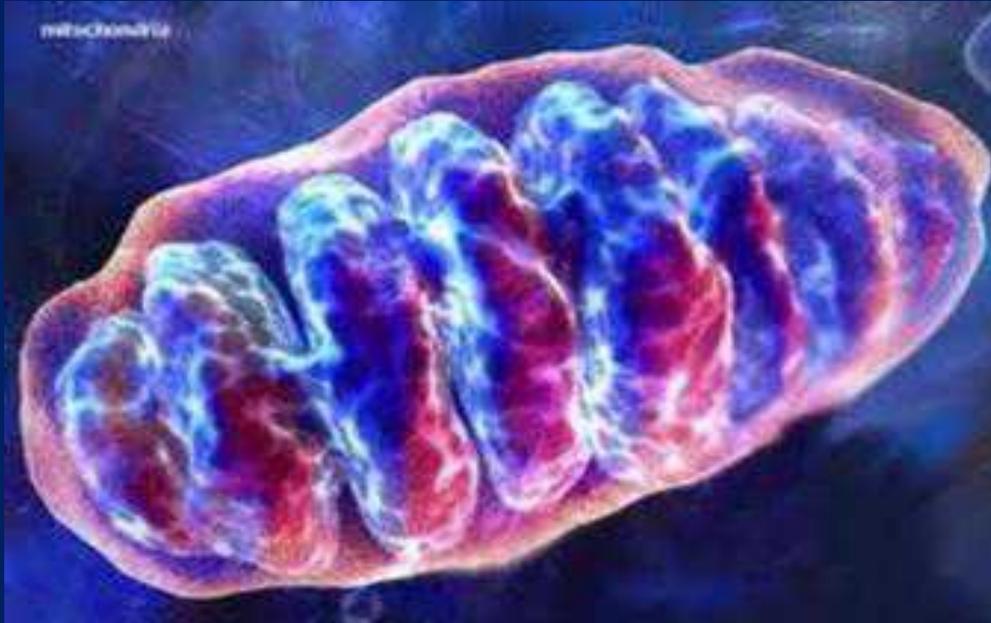


Simone Fanan
sbmalt@hotmail.com
www.sbmalt.org

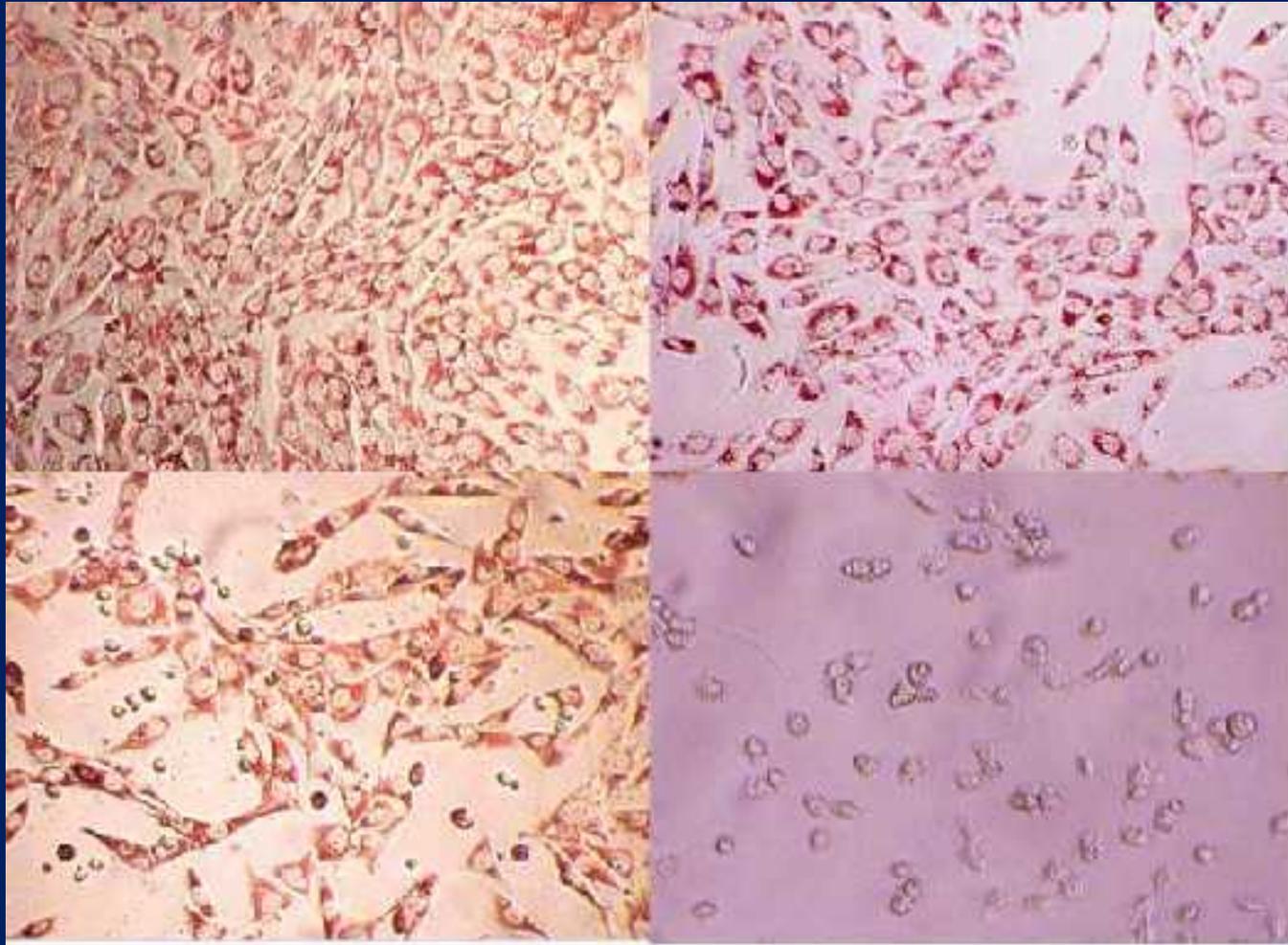
Citotoxicidade



Citotoxicidade por MTT



Citotoxicidade por Neutral Red



Acute Oral Toxicity

➤ **Alternative Method validated** (refinement e reduction):

Original test method (OECD 401, LD50-value) has been deleted and replaced by the:

- Fixed dose method (EC B.1, OECD 420)
- Acute Toxic class method (EC B.1 tris/ OECD 423)
- Up-and-Down procedure (OECD 425)

Cosmetic products containing substances that have been subject to acute toxicity testing after 11 March 2013 to meet the requirements of the Cosmetic Products Directive, **are not allowed on the EU market.**

➤ **Replacement strategy???** (reduction)

- In particular for REACH
- Balb/C 3T3 Citotoxicidade (OECD 129)
- For chemicals not requiring classification as toxicants (“negative” substances)

➤ **For GHS – LD50 and LC50**

Acute Oral Toxicity *In Vitro* (OECD GD129) *Estimativa de Dose Letal por Neutral Red Uptake*



Acute Oral Toxicity *In Vitro* (OECD GD129)

Estimativa de Dose Letal por Neutral Red Uptake

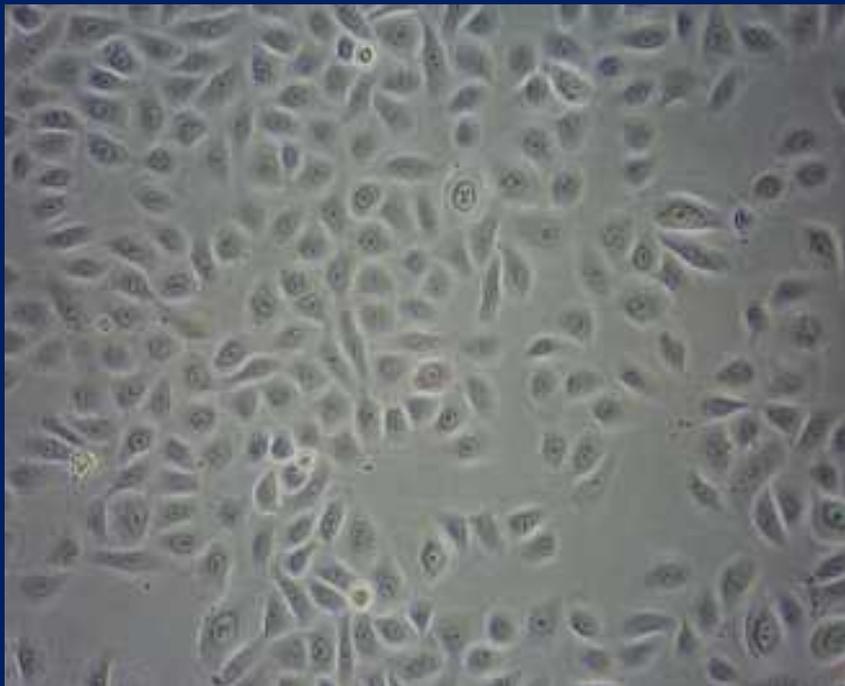
Princípio do Método

Baseado na viabilidade de células viáveis em incorporar e ligar ao corante supravital vermelho neutro (NR). NR é um corante catiônico fraco que se concentra nos lisossomas através de ligações eletrostáticas pela matrix lisossomal aniônica. A concentração do corante NR é diretamente proporcional ao número de células vivas.

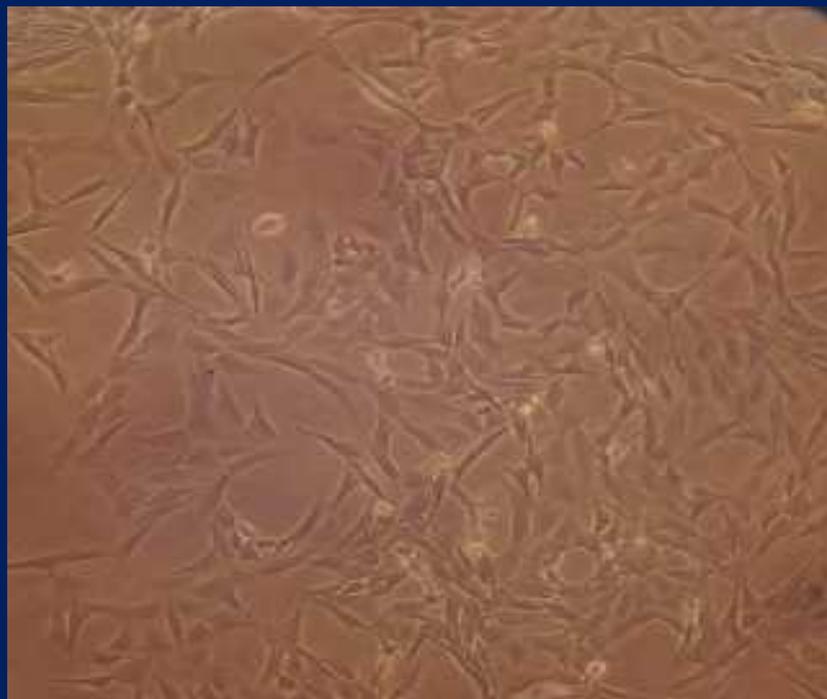
Acute Oral Toxicity *In Vitro* (OECD GD129) *Estimativa de Dose Letal por Neutral Red Uptake*

Linhagens celulares usadas

Normal Human Keratinocytes



Balb/C 3T3 fibroblasts, clone 31



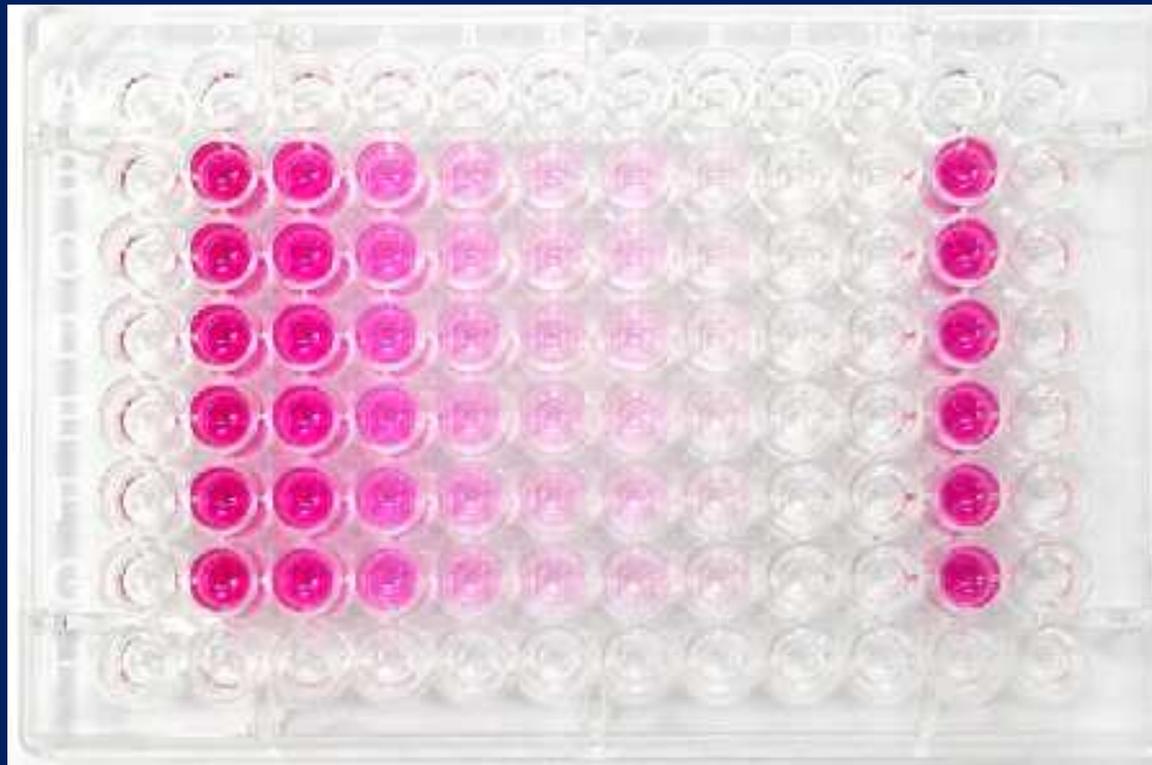
Acute Oral Toxicity *In Vitro* (OECD GD129)

Estimativa de Dose Letal por Neutral Red Uptake

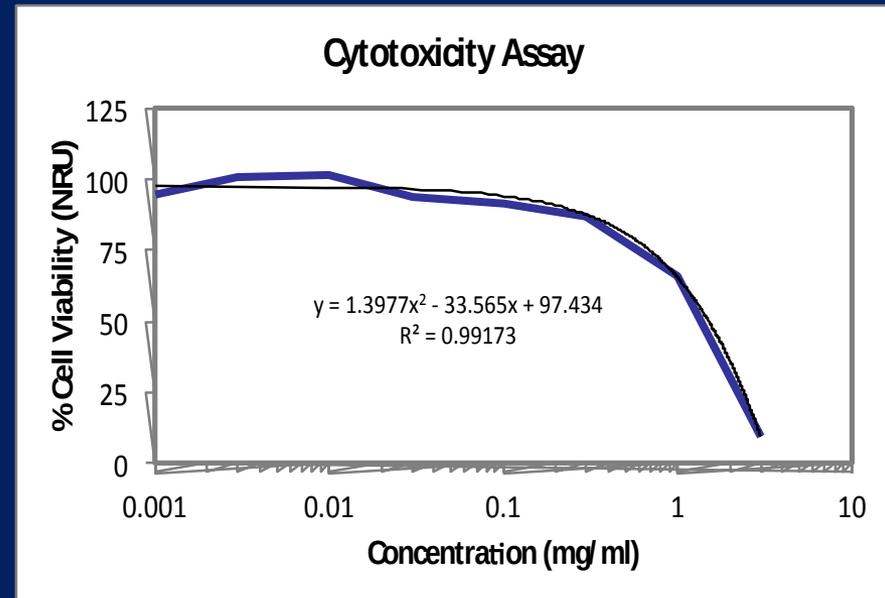
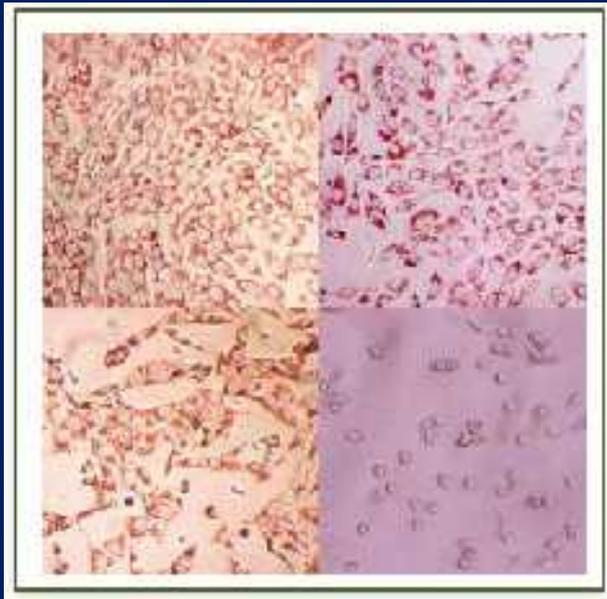
Tempo (h)	Procedimento
0h	É feito um plaqueamento de 2 placas de 96 poços (uma para a substância teste e outra para CP SLS) a uma densidade de 1×10^4 cel/poço em meio de cultura. As são Incubadas a 37°C e 5% CO ₂ , ambiente úmido por 24 horas.
24hs	Após o período de incubação, as células são lavadas e tratadas com a substância teste em 8 diferentes concentrações em sestuplicatas. As células são incubadas por mais 48 horas a 37°C e 5% CO ₂ , ambiente úmido.
48hs	Após o período de tratamento, as células são lavadas com PBS e incubadas por 3 horas (37°C, 5%CO ₂) com vermelho neutro. Depois, as células são lavadas novamente com PBS e feito a liberação do vermelho neutro utilizando uma solução de dessorção. A absorbância de cada poço contendo esta solução é lida a 540nm. É feito o cálculo do IC ₅₀ através da curva dose-resposta obtida.

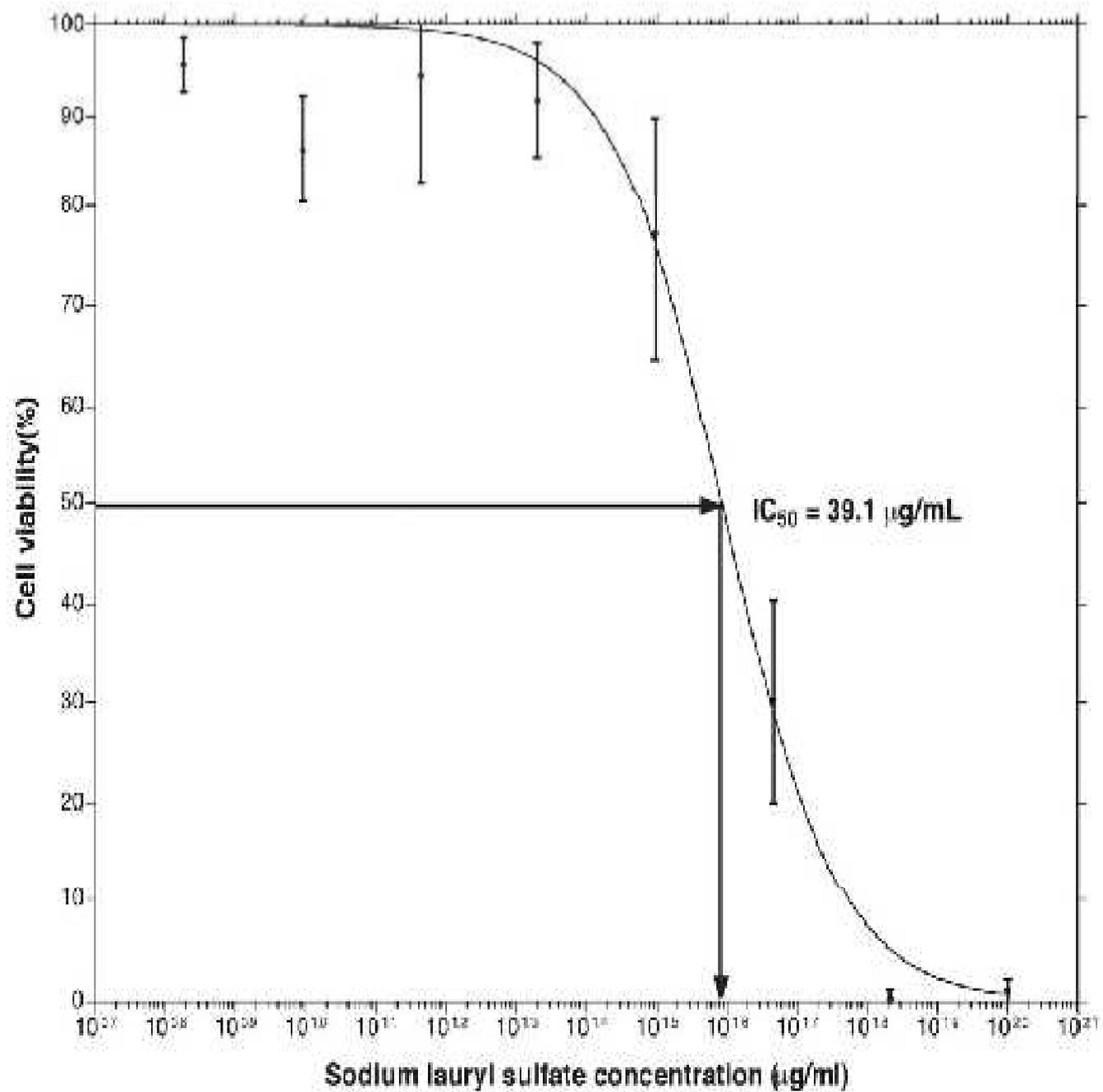
Acute Oral Toxicity *In Vitro* (OECD GD129) *Estimativa de Dose Letal por Neutral Red Uptake*

Placa de 96 poços, aonde branco, controle e tratamentos estão disponibilizados da seguinte forma:



Acute Oral Toxicity *In Vitro*





Acute Oral Toxicity *In Vitro*

➤ IC50

$$\log\text{LD50 (mg/Kg)} = 0,372 \log \text{IC50 (ug/ml)} + 2,024$$

(ICCVAM 2006)

Acute Oral Toxicity *In Vitro*

Limitações

- Solubilidade substância teste: água, etanol ou DMSO;
- Biodisponibilidade;
- Metabolização

Citotoxicidade

ISO 10.993

Biological Evaluation of Medical Device *Part 5 – Tests for In Vitro Cytotoxicity*

- Sólidos: Agar Overlay L929 (Farmacopeia USO);
- Balb/C 3T3, NHK e NHF;

BCOP

- “Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay”
- O método de BCOP é um ensaio organotípico que avalia as funções fisiológicas e bioquímicas normais da córnea de bovinos *in vitro*.
- Avalia-se:
 - Opacidade da córnea bovina
 - Permeabilidade da córnea (fluoresceína sódica).
- MP e produto final

BCOP

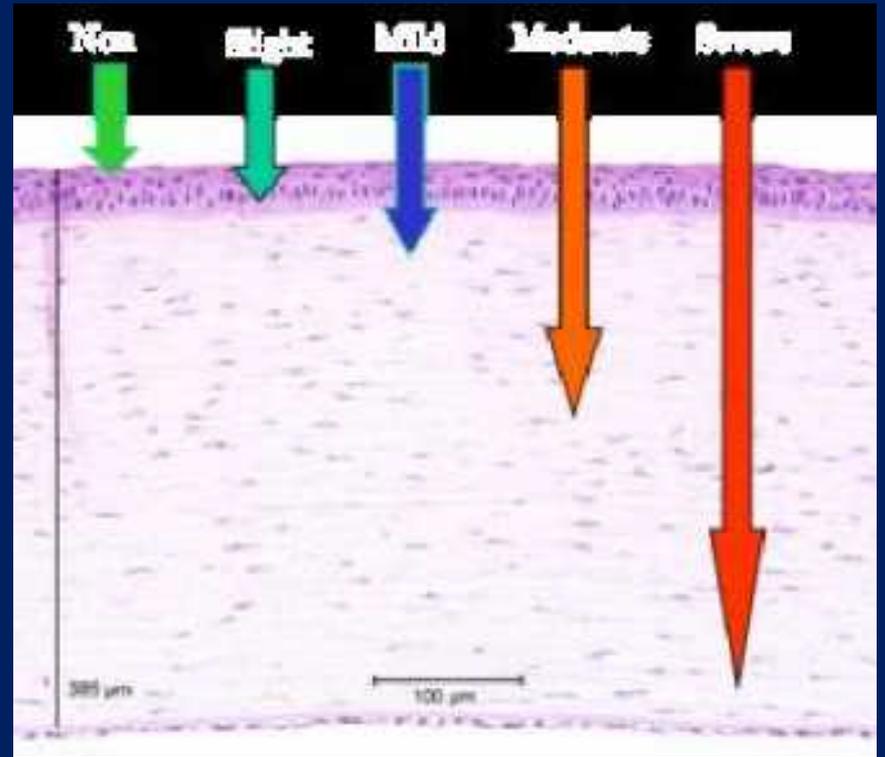
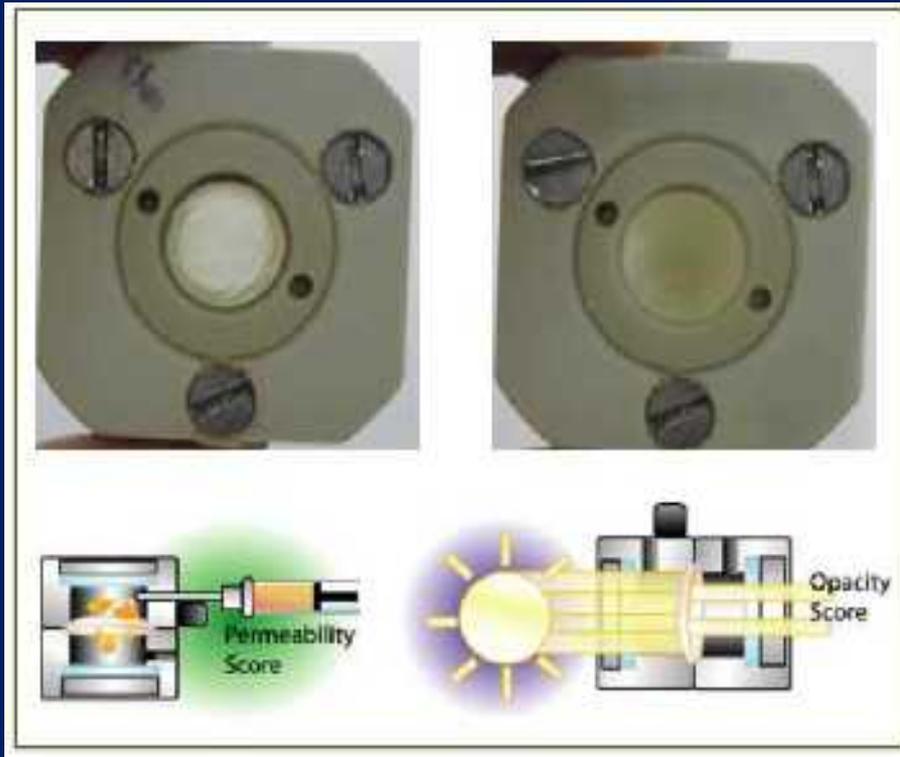


Chemically resistant, corneal holders allow the testing of aggressive substances.

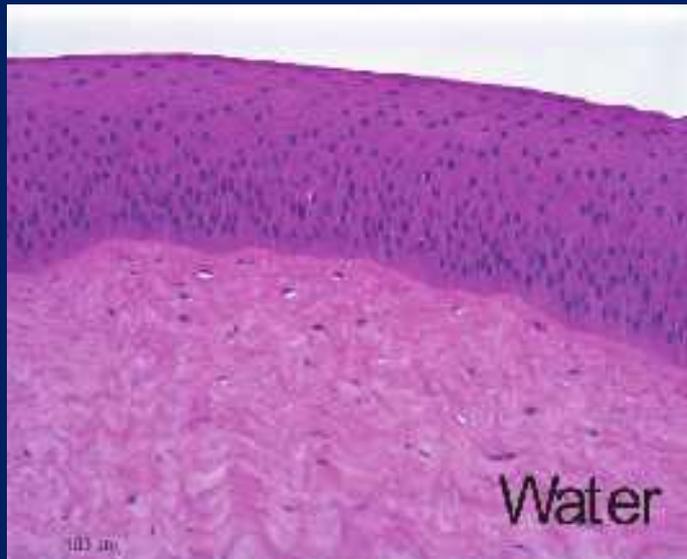
Powders and pasty products can be applied directly on corneas.



BCOP



BCOP



BCOP

- Cálculo para opacidade:

$$Mopt = Mt2 - Mt0$$

- Cálculo para permeabilidade

$$Mod = ODt - ODc$$

- Cálculo para classificação

$$IIVS = Mopt + (15 \times Mod)$$

BCOP

IIVS ("In Vitro Irritation Score")	Escala de Irritação In Vitro ("In Vitro Irritation Scale")
0 – 3	Não Irritante Ocular
3,1 – 25	Irritante Suave Ocular
25,1 – 55	Irritante Moderado Ocular
≥ 55,1	Irritante Severo ou Corrosivo Ocular

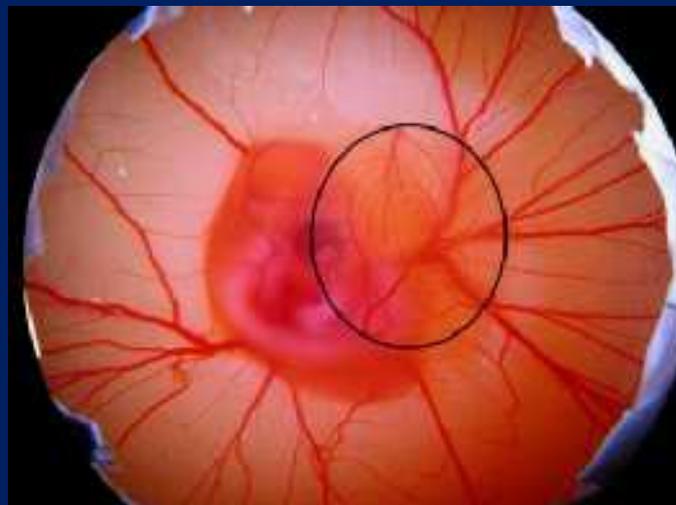
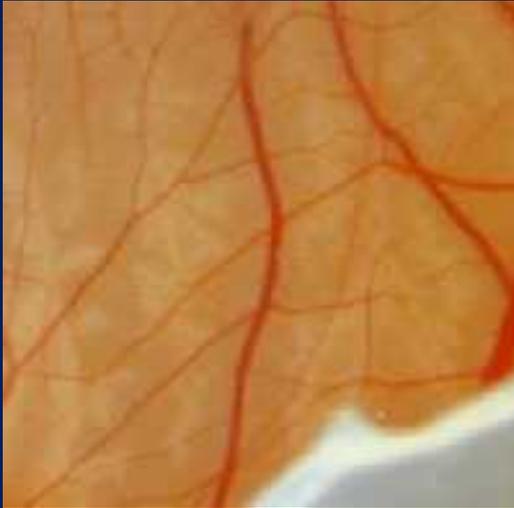
HET-CAM

Protocolo:

- Ovos embrionados no 9º dia de fertilização com peso entre 50 e 60 gramas mantidos em estufa 37°C (\pm 0,5°C)
- Lâmpada halogenada para selecionar os ovos viáveis - ovoscopia
- Retirar a casca do ovo
- Umedecer a película com solução salina ou PBS
- Retirar a película
- Aplicar 300ul de amostra



HET-CAM



Geöffnetes, bebrütetes Hühnerel (6. Bruttag). Die Lage der CAM für verschiedene Testzwecke ist schwarz umrandet. Rechts: Zeit

HET-CAM

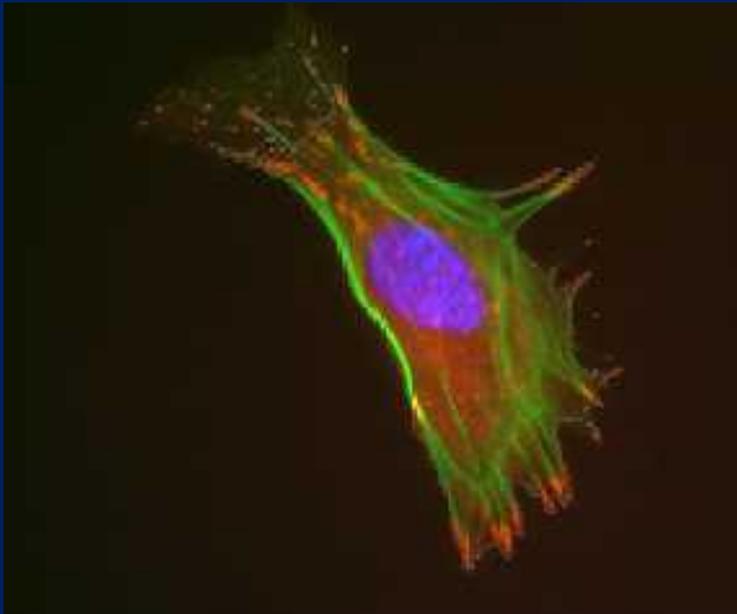
Fórmula:

$$\left[\left[\frac{(301 - \text{Tempo de hemorragia})}{300} \right] \times 5 \right] + \left[\left[\frac{(301 - \text{Tempo de lise})}{300} \right] \times 7 \right] + \left[\left[\frac{(301 - \text{T Coagulação})}{300} \right] \times 9 \right]$$

HET-CAM

HET-CAM Score Range	Irritation Category
0 to 0.9	Not Labeled
1 to 4.9	Slight Irritation
5 to 8.9	Moderate Irritation
9 to 21	Severe Irritation

Obrigada!!



sbmalt@hotmail.com
+55 11 98228-1247
www.sbmalt.org