

Ensaio Pré-clínicos Toxicológicos: Uma Revisão sobre Métodos alternativos para substituição do uso de cobaias

CRISTINA COMAPA RABELO

Discente de Farmácia do Centro Universitário do Norte – UNINORTE
Manaus, AM, Brasil

JOICIANE PAES DE CARVALHO

Discente de Farmácia do Centro Universitário do Norte – UNINORTE
Manaus, AM, Brasil

VANESSA DE OLIVEIRA CAMPOS

Discente de Farmácia do Centro Universitário do Norte – UNINORTE
Manaus, AM, Brasil

CLAUDIA DANTAS COMANDOLLI-WYREPkowski

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal do Amazonas – UFAM
Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas – INPA

BRUNO BEZERRA JENSEN¹

Doutor em Inovação Farmacêutica pela
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas – INPA
Professor do Centro Universitário do Norte – UNINORTE
Manaus, AM, Brasil

Abstract

There is a record of the use of guinea pigs since antiquity, with the aim of studying reactions caused by different substances in a living organism. Through the field of innovation of science, today we have alternative means that replace the use of these guinea pigs. This substitution is being made gradually and it is always necessary to validate the tests performed, so that in the future the guinea pigs are no longer used in these studies. This article is an integrative literature review, which aims to discuss methods that are an alternative to the use of guinea pigs in toxicological experiments and to evaluate their advantages and disadvantages. The methodology used was to perform

¹ Corresponding author: brunobjensenfarma@gmail.com

a database search for scientific articles published in indexed journals, selected through database searches: Scientific Eletronic Library Online (SciELO), PubMed and ScienceDirect. 394 scientific articles were found and based on the inclusion and exclusion criteria, only 06 were used for this study. Through the evaluated works, we concluded that the alternative methods that substitute the use of guinea pigs, have several advantages in their handling. However, these methods cannot replace all the tests, and the use of animals is still necessary.

Keywords: Scientific experiments, Guinea pigs, Alternative methods.

Resumo

Existe o registro do uso de cobaias desde a antiguidade, com o objetivo de estudar reações causadas por diversas substâncias num organismo vivo. Por meio do campo da inovação na ciência, hoje temos meios alternativos que substituem o uso dessas cobaias. Essa substituição está sendo feita de forma gradativa e se faz necessário sempre a validação dos testes realizados, para que num futuro as cobaias não sejam mais usadas nesses estudos. O presente artigo trata-se de uma revisão de literatura integrativa, que possui o objetivo de discutir os métodos que são uma alternativa ao uso de cobaias em experimentos toxicológicos e avaliar suas vantagens e desvantagens. A metodologia utilizada foi realizar uma busca em base de dados por artigos científicos publicados em periódicos indexados, selecionados através de buscas no banco de dados: Scientific Eletronic Library Online (SciELO), PubMed e ScienceDirect. Foram encontrados 394 artigos científicos e baseado nos critérios de inclusão e exclusão, apenas 06 foram utilizados para esse estudo. Através dos trabalhos avaliados, concluímos que os métodos alternativos que substituem o uso de cobaias, possuem diversas vantagens em seu manuseio. Contudo, esses métodos não podem substituir todos os ensaios, sendo ainda necessário o uso de animais.

Palavras-chaves: Experimentos científicos, Cobaias, Métodos alternativos.

INTRODUÇÃO

A utilização de animais em experimentos científicos é descrita desde o século V a.C., no entanto, sua crescente aplicação ocorreu a partir do início do século XIX. Vários avanços científicos na área da saúde são atribuídos aos modelos animais. Com a expansão da espécie humana e de suas culturas pela Terra, o conhecimento científico se ampliou, passou a ser divulgado e ‘escolas’ começaram a surgir. Tais ‘escolas’ aceitavam alunos de outras partes do mundo, que depois retornavam a seus países de origem e lá continuavam a desenvolver e a disseminar os ensinamentos recebidos. É exatamente nesse ponto que a noção de modelo animal começou a tomar forma. Para que os experimentos pudessem ser reproduzidos e o trabalho continuasse, havia a necessidade de se utilizar o mesmo animal (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002; MIZIARA et al., 2012).

Modelo animal é o nome que se dá às cobaias, e por modelo entendese algo que possa ser reproduzido, entretanto, o modelo animal para experiências e pesquisas na tentativa de beneficiar a nossa espécie não é totalmente eficaz pela falta de aproximação da realidade com o ser humano. Com os avanços da tecnologia, a humanidade tem como recorrer a outros meios de testes, programas de computadores, pele sintética, entre outros. A indústria ainda utiliza os ensaios tradicionais com os animais, que recorre a meios mais triviais e a utilização dos biotérios para esses testes e com isso as cobaias são utilizadas, já que é um dos meios de cuidados e criações de fácil acesso (CRUZ, 2014; STEFANELLI, 2011).

A primeira manifestação social que tentou doutrinar as pesquisas que provocam dor em animais vertebrados denominou-se *Cruelty to Animals Act* e foi redigida em 1876. Há uma mudança significativa em curso na forma de se fazer pesquisa experimental com animais, no Brasil e no mundo. E certamente um dos marcos conceituais mais relevantes desta mudança foi a formulação do Princípio dos 3Rs (Replacement, Reduction and Refinement) (PETROIANU, 2009; TRÉZ, 2018).

Durante muito tempo, o Brasil não teve uma legislação específica sobre o uso de animais. Os cuidados ficavam dispersos em diversos diplomas legais, até que, em 2008, foi publicada a Lei

nº 11.794, que regulamenta o uso de animais na experimentação e na educação. Com ela foi criado o Conselho para o Controle da Experimentação Animal, que possui, entre outras, a competência de introduzir os métodos alternativos no Brasil (PRESGRAVE, 2014).

Dessa forma, esta revisão tem como objetivo discutir alguns métodos que são uma alternativa ao uso de cobaias em experimentos toxicológicos, como o uso de *Artemia salina*, *Danio rerio* e cultura de células.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental

O trabalho trata-se de um estudo do tipo revisão de literatura integrativa, norteadas para responder à pergunta “Quais metodologias alternativas para ensaios pré-clínicos toxicológicos são relatadas e utilizadas para substituição do uso de cobaias?”. Foi realizada uma busca em base de dados por artigos científicos publicados em periódicos indexados, selecionados através de buscas no banco de dados: Scientific Electronic Library Online (SciELO), Medical Literature Analysis and Retrieval System (PubMed) e ScienceDirect.

Para a pesquisa foram utilizadas os descritores em português: “pré-clínicos”, “toxicológicos”, “métodos alternativos” e em inglês: “pre-clinics”, “toxicological”, “alternative methods”, inseridos nos campos do título, resumo, palavras-chave ou texto, e associados com inserção de “ensaaios” em português e “essay” em inglês no título da busca.

Crítérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão foram artigos publicados entre os anos de 2010 a 2020 em português e inglês, sem restrição à determinada região ou país. Que abordassem técnicas ou metodologias de ensaios pré-clínicos de estudos toxicológicos *in vitro* de medicamentos, substâncias de origem sintética, natural, amostras ambientais e de alimentos, sem o uso de animais experimentais.

Os trabalhos foram analisados e contabilizados quanto à sua natureza (artigo original), ano de publicação, tipo de ensaio (*Artemia salina*, *Danio rerio* e cultura de células). Os artigos foram

sistematicamente classificados quanto ao seu potencial de uso, vantagens e desvantagens e limitações dos métodos.

O período da busca foi de março a setembro de 2020. Foram excluídos artigos que não atenderam os critérios acima especificados e artigos que abordavam metodologia *in silico*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontrados durante a busca 394 artigos na base de dados do Scielo, Pubmed e ScienceDirect, sendo 80 no SciELO, 24 no PubMed e 290 no ScienceDirect. Desses 394 artigos, foram excluídos 388, sendo 149 por estarem fora do tema relacionado ao título deste trabalho, 84 eram apenas artigos de revisão, 5 estavam em duplicata e 150 não atendiam os pré-requisitos do trabalho.

Sendo assim, foram incluídos nesta revisão 06 artigos científicos (Figura 1). Dos 06 artigos incluídos neste estudo (Tabela 1), 02 artigos abordavam ensaios em cultura de células, 01 artigo abordava estudos em *Danio rerio* (zebrafish) e 03 artigos abordavam ensaios toxicológicos frente à *Artemia Salina*.

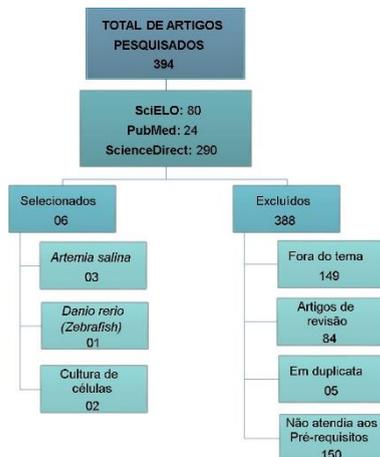


Figura 1. Fluxograma da seleção de estudos para a revisão de literatura integrativa.

Tabela 1. Artigos encontrados nas bases de dados e incluídos para esta revisão de literatura integrativa.

AUTOR	TÍTULO DO ARTIGO	OBJETIVOS
AMARANTE, C. B. do et al. 2011	Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à <i>Artemia salina</i> e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (<i>Montrichardia linifera</i>).	Pesquisar a espécie <i>M. linifera</i> utilizando extratos e frações obtidos do caule para a realização de prospecção fitoquímica preliminar, guiada pelos ensaios biológicos de toxicidade frente à <i>Artemia salina</i> e atividade antiplasmódica.
BITTENCOURT, T.Q.M. et al. 2018	Efeitos tóxicos de compostos de vanádio sobre os parâmetros biológicos de embriões e adultos de zebrafish (<i>Danio rerio</i>).	Avaliar os efeitos tóxicos de três compostos de vanádio, potenciais fármacos antidiabéticos, para a determinação da CL50 96h, mortalidade e estudo dos efeitos teratogênicos e cardiovasculares em embriões, bem como para alterações comportamentais em adultos de <i>D. rerio</i> .
DA SILVA, W. A. et al. 2020	Perfil fitoquímico e avaliação toxicológica <i>Croton heliotropiifolius</i> frente à <i>Artemia Salina</i> Leach.	Avaliar o perfil fitoquímico do extrato etanólico da casca do caule de <i>Croton heliotropiifolius</i> e o potencial toxicológico frente à <i>Artemia salina</i> .
FONTOURA, L.; ROOS, D. H.; PINTON, S. 2017	Teste toxicológico de diferentes sais de urânio em <i>Artemia salina</i> .	Avaliar a toxicidade dos diferentes sais de Urânio, Acetato de urânio (AU) e Nitrato de urânio (NU), bem como avaliar a atividade da enzima Catalase (CAT), a produção de espécies reativas ao ácido Tiobarbitúrico (TBARS) e ainda verificar a geração de espécies reativas intracelulares (RS) através do método de quantificação da oxidação 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA).
SHOKRZADEH, M. et al. 2019	Cytotoxic effects of aripiprazole on MKN45 and NIH3T3 cell lines and genotoxic effects on human peripheral blood lymphocytes.	Avaliar a eficácia e segurança do aripiprazol no câncer gástrico e linhagens celulares normais.
SPERANDIO, J. et al. 2019	Atividade antimicrobiana e citotoxicidade <i>in vitro</i> do óleo essencial de <i>Tagetes minuta</i> L. visando à aplicação no controle da mastite bovina.	Avaliar, <i>in vitro</i> , a atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>Tagetes minuta</i> L. em relação a duas principais bactérias causadoras de mastite bovina, <i>i.e.</i> , <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> , assim como a citotoxicidade sobre células epiteliais da glândula mamária bovina da linhagem MAC-T.

Artemia salina

Ensaaios de toxicidade preliminar funcionam como uma ótima ferramenta nos estudos com plantas medicinais e devem ser implementados, pois auxiliam na diminuição do uso de animais na experimentação, o que vem sendo uma preocupação dos Comitês de ética em experimentação animal (BEDNARCZUK et al., 2010).

A *Artemia salina* trata-se de um microcrustáceo, da família Artemiidae, com origem de 100 milhões de anos. Apesar de serem distribuídos majoritariamente no mediterrâneo, pode ser encontrada em todos os continentes. Sua alimentação baseia-se em algas, protozoários e detritos. Descrito como um crustáceo filtrador de ecossistemas talássicos, que se alimenta principalmente de bactérias, algas unicelulares, pequenos protozoários e detritos que são dissolvidos no meio. O macho adulto atinge de 8 a 10 mm de comprimento, e a fêmea de 10 a 12 mm (DUMITRASCU, 2011; NETO, 2013).

O bioensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* possui o intuito de monitorar extratos vegetais em diversos laboratórios de produtos naturais. Porém diversos ensaios biológicos simples têm sido desenvolvidos para a mesma função, mas a *A. salina* tem sido inclusa na rotina laboratorial para monitorar o estudo de extratos e frações de plantas, além disso para auxiliar no isolamento, purificação e elucidação estrutural de componentes isolados dessas amostras. O ensaio permite a avaliação da toxicidade geral e é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de amostras com potencial atividade biológica (ARAÚJO; CUNHA; VENEZIANI, 2010).

Um estudo que visou avaliar o perfil fitoquímico do extrato etanólico da casca do caule de *Croton heliotropiifolius* e o potencial toxicológico frente à *Artemia salina*, onde as cascas foram submetidas à extração com etanol a temperatura ambiente, subsequentemente foi realizado um estudo fitoquímico preliminar. O extrato etanólico da casca do caule de *Croton heliotropiifolius* nas concentrações de 50, 100, 250, 500, 750 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram submetidas ao teste de *A. salina*. O extrato etanólico da casca do caule de *Croton heliotropiifolius* apresentou um rendimento de 8%. A análise fitoquímica mostrou a presença dos seguintes metabólitos secundários: cumarinas, flavonoides e terpenos. O extrato etanólico mostrou uma CL_{50} de 396,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ classificada como toxicidade moderada (SILVA, 2020).

Um outro artigo, apresentou um estudo com o extrato hexânico e etanólico obtidos de caules de *M. linifera*, tais extratos foram submetidos aos bioensaios de toxicidade frente à

Artemia salina e atividade antiplasmódica para seleção do material a ser estudado. O extrato etanólico apresentou alta toxicidade para *Artemia salina* e moderada atividade antiplasmódica, sendo selecionado para o fracionamento (AMARANTE, et al., 2011).

Um estudo que avaliou a toxicidade de dois diferentes sais de urânio: Acetato de Urânio (AU) e Nitrato de Urânio (NU), e ainda, avaliou a atividade da enzima catalase, da produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e determinar a formação de espécies reativas através do método de microscopia de fluorescência. Os cistos de *Artemia salina* foram mantidas em água do mar artificial (0,24 M) em aquários cônicos com luz artificial para manutenção da temperatura e forte aeração. Os resultados mostraram que a *Artemia salina* é mais sensível ao tratamento com o NU quando comparado a AU, assim, assim como o aumento de espécies reativas no qual o NU demonstrou resultados significativos, indicando uma maior toxicidade deste sal de Urânio (FONTOURA; ROOS; PINTON, 2017).

Zebrafish (*Danio rerio*)

O zebrafish conhecido como paulistinha foi estabelecido, em 2013, pela OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico), como modelo para avaliação de testes de toxicidade agudos e crônicos causados por produtos químicos. Pertence à família Cyprinidae e é um pequeno peixe teleosteo (3 – 4 cm) de água doce, que vem sendo utilizado como animal de experimentação para o estudo de numerosas doenças humanas. O seu manejo, a facilidade de reprodução e de manutenção, e os métodos laboratoriais para sua criação já estão bem estabelecidos (OECD, 2013; WESTERFIELD, 1994).

Os experimentos com o zebrafish podem ser utilizados em teste a campo ou em laboratórios, em potencial para testes teratogênicos e carcinogênicos, pois respondem similarmente ao mamífero, que avaliam as substâncias que são tóxicas para os humanos (PARLAK, 2018).

A presença no peixe de elementos da imunidade inata e da adaptativa possibilita pesquisas nos processos infecciosos. Zebrafish

são suscetíveis a infecções por bactérias gram-negativas e gram-positivas, protozoários, vírus, fungos e micobactérias. Recentemente, o zebrafish é valorizado nas pesquisas de doenças do fígado e das vias biliares (MATTHEWS et al., 2011).

Com sua alta fecundidade, manutenção, genoma homóloga com outros tipos de vertebrados, o rápido desenvolvimento, são algumas das vantagens de realizar testes em zebrafish, é confiável a biossegurança aos estudos testes com esse animal (HOWE et al., 2013).

Um estudo onde foram avaliados os efeitos tóxicos do metavanadato de sódio (MV), pentóxido de vanádio (PV) e sulfato de oxovanádio (SV), potenciais fármacos antidiabéticos, em embriões e adultos de zebrafish (*Danio rerio*), neste estudo os embriões foram expostos a concentrações de 10 à 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para avaliação da CL_{50} 96h e seus efeitos teratogênicos. Os adultos foram expostos a 10 e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos mesmos compostos para se avaliarem alterações comportamentais relacionadas à exposição química e à mortalidade. Houve 100% de mortalidade nas concentrações de 400 à 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos três compostos. Pode-se concluir que a exposição química aos compostos de vanádio causou efeitos tóxicos em embriões e adultos de *zebrafish* com alta mortalidade. Diante disso, o seu uso como potencial fármaco antidiabético deve ser mais bem estudado em razão do efeito tóxico dessas substâncias (BITTENCOURT et al., 2018).

Cultura de Células

A cultura de células é um dos métodos permitidos no Brasil. São células que são mantidas vivas e sob controle para o crescimento em meio de cultura. Esta técnica permite que o pesquisador cultive as células, que realiza a separação do tecido de origem com processo enzimático ou mecânico (FRESHNEY, 2010).

Em 1907, no século XX Harrison desenvolveu essa técnica para estudar o cultivo dos tecidos, que coletava dos animais que ficavam isolados, evitando estressar a cobaia para o uso de experimentos, e observar o crescimento dessas células fora do organismo. No ano de 1912, Alex Carrel, usou células cardíacas de embriões de galinhas, um dos primeiros modelos, pelo qual descobriu a necessidade de nutrientes para manter o cultivo por um período maior (HAYCOCK, 2011; UJAVARI; ADONI, 2014).

Há muitas vantagens no uso de cultura de células, destacando-se o controle do ambiente, a homogeneidade da amostra, quando comparada ao uso de animais em experimentos, e a economia de recursos financeiros (FIOCRUZ, 2010). Atualmente são utilizadas em meios de cultivo de células para pesquisa de terapia gênica, clonagem, coeficientes de coagulação, tecido tumoral humano, terapia celular, fatores de crescimento, vacinas, e entre outros (REBELLO, 2014).

Um estudo que teve como objetivo avaliar a eficácia e segurança do aripiprazol no câncer gástrico e linhagens celulares normais. Mostrou que o IC₅₀ do aripiprazol na linhagem de células cancerosas (21,36 µg mL⁻¹) foi menor do que na linha celular normal (54,17 µg mL⁻¹). Além disso, o ensaio do micronúcleo mostrou que a frequência dos micronúcleos do aripiprazol nas concentrações abaixo de 200 µm era muito menos do que a cisplatina. Concluindo assim que o aripiprazol pode ser um bom composto citotóxico e bom candidato para estudos de terapia de câncer (SHOKRZADEH et al., 2019).

Outro estudo teve o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial de *Tagetes minuta* L. contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e a citotoxicidade sobre células epiteliais da glândula mamária bovina (MAC-T), visando o seu uso no tratamento da mastite bovina. Foi constatado elevado efeito citotóxico do óleo sobre as células da linhagem MAC-T. Concentrações superiores a 10 µg mL⁻¹ do óleo resultaram em mais de 90% de morte celular. Sugerindo que, apesar da atividade antimicrobiana contra agentes causadores da mastite bovina, a utilização intramamária do óleo de *T. minuta* não seria recomendada (SPERANDIO et al., 2019).

CONCLUSÃO

Os métodos alternativos para o uso de cobaias nos indicam várias opções em experimentação de ensaios de toxicidade no desenvolvimento de cosméticos e fármacos. Diante disso, o número reduzido de animais nas pesquisas científicas vem sendo muito utilizado, a substituição das cobaias por métodos alternativos são de grande relevância na ciência, pois, são capazes de demonstrar a eficácia e segurança de medicamentos e vacinas, nos permitindo a descoberta de novos fármacos, de novos princípios ativos, sem precisar causar dor e

sofrimento nas cobaias e isso graças às inovações da ciência. Logo, os métodos avaliados nessa pesquisa, como, *Artemia salina*, Zebrafish e cultura de células mostram-se promissores na temática discutida. Contudo, esses métodos não conseguem substituir todos os ensaios, necessitando assim para alguns experimentos o uso de animais.

REFERÊNCIAS

- AMARANTE, C. B. et al. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salinae* de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). Acta Amazonica, v. 41, n. 3, p. 431-434, 2011. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0044-59672011000300015&script=sci_arttext&tlng=pt. Acesso em: 02 set. 2020.
- ANDRADE, A.; PINTO, SC.; OLIVEIRA, RS.; orgs. Animais de Laboratório: criação e experimentação [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6. Disponível em: [https://static.scielo.org/scielobooks/sfwjtj/pdf/andra de-9788575413869.pdf](https://static.scielo.org/scielobooks/sfwjtj/pdf/andra%20de%209788575413869.pdf). Acesso em: 20 ago. 2020.
- ARAÚJO, M.G.F.; CUNHA, W.R.; VENEZIANI, RCS. Estudo fitoquímico preliminar e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de extrato obtido de frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill (Solanaceae). Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v.31, n.2, p.205-209, 2010. Acesso em: 31 ago. 2020.
- BEDNARCZUK, V.O. et al. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. Revista Visão Acadêmica, v. 11, n.2, p. 43, 2010. Disponível em: [https://revistas.ufpr.br/academica/article/v iew/21366](https://revistas.ufpr.br/academica/article/view/21366). Acesso em: 22 ago. 2020.
- BITTENCOURT, T.Q.M. et al. Efeitos tóxicos de compostos de vanádio sobre os parâmetros biológicos de embriões e adultos de zebrafish (*Danio rerio*). Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., Belo Horizonte, v. 70, n. 6, p. 1877-1886, dez. 2018.
- CRUZ, J. S. Direito e experimentação animal: uma análise à luz da legislação ambiental. 2014. Disponível em: <http://repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/16590>. Acesso em: 29 ago. 2020.
- DA SILVA, W. A. et al. Perfil fitoquímico e avaliação toxicológica *Croton heliotropiifolius* frente à *Artemia Salina* Leach. Brazilian Journal of Health Review, v. 3, n. 4, p. 10580-10590, 2020. Disponível em: [https://www.brazilianjournals.com/index.p hp/BJHR/article/view/15139](https://www.brazilianjournals.com/index.php/BJHR/article/view/15139). Acesso em: 31 ago. 2020.
- DUMITRASCU, M. *Artemia salina*. Balneo Research Journal, v. 2, n. 4, p. 119–122, 2011. Disponível em: [http://45.4.96.19/bitstream/ae/1963/1/009-BRUNO%20LACERDA.p df](http://45.4.96.19/bitstream/ae/1963/1/009-BRUNO%20LACERDA.pdf). Acesso em: 22 ago. 2020.
- FONTOURA, L.; ROOS, D. H.; PINTON, S. Teste Toxicológico de diferentes sais de urânio em *Artemia salina*. Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, v. 8, n. 2, 2017. Disponível em: [http://200.132.146.161/index.php/siepe/ar ticle/view/17875](http://200.132.146.161/index.php/siepe/article/view/17875). Acesso em: 02 set. 2020.
- FRESHNEY, R. I. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. 6a ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2010. Disponível em:

Cristina Comapa Rabelo, Joiciane Paes de Carvalho, Vanessa de Oliveira Campos, Claudia Dantas Comandoli-Wyrepkowski, Bruno Bezerra Jensen- **Ensaios Pré-clínicos Toxicológicos: Uma Revisão sobre Métodos alternativos para substituição do uso de cobaias**

<https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/iciict/6034/2/rodrigo-bretas.pdf>. Acesso em: 26 set. 2020.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). Conceitos e Métodos para a Formação de Técnicos em Laboratórios de Saúde. EPSJV; IOC, 2010.

HAYCOCK, J. W. 3D cell culture: a review of current approaches and techniques. *Methods Mol Biol.* 2011; 695:1-15. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21042962/>. Acesso em: 26 set. 2020

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, v. 496, n. 7446, p. 498-503, 2013. Disponível em: http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/335793/1/Vallim_JoseHenrique_D.pdf. Acesso em: 22 set. 2020.

MATTHEWS, R. P. et al. DNA hypomethylation causes bile duct defects in zebrafish and is a distinguishing feature of infantile biliary atresia. *Hepatology*, v. 53, n. 3, p. 905-914, 2011. Disponível em: <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/hep.24106>. Acesso em: 22 set. 2020.

MIZIARA, I. D. et al. Research ethics in animal models. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* São Paulo, v. 78, n. 2, p. 128-131, Apr. 2012. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-86942012000200020&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 15 ago. 2020.

NETO, V. O. B. Análise in vitro do grau de toxicidade do extrato etanólico de *Azadiracta indica A. juss* em *Artemia salina* e em larvas infectantes de *Haemonchus contortus*, 2013. Disponível em: <http://45.4.96.19/bitstream/aee/1963/1/009-BRUNO%20LACERDA.pdf>. Acesso em: 22 ago. 2020.

OECD - Guidelines for the testing of chemicals. Section 2: effects on biotic systems test no. 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test. Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development. 2013. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352018000601877&script=sci_arttext&tlng=pt. Acesso em: 20 set. 2020.

PARLAK, V. Evaluation of apoptosis, oxidative stress responses, AChE activity and body malformations in zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to deltamethrin. *Chemosphere*. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29803889/>. Acesso em: 20 set. 2020.

PETROIANU, A. Aspectos Éticos na Pesquisa em Animais. Belo Horizonte, 2009. Disponível em: <http://www.medicina.ufmg.br/cememor/arquivos/aspectosEticosAnimais.pdf>. Acesso em: 05 set. 2020.

PRESGRAVE, O. A. F. O uso de animais no desenvolvimento de cosméticos e as alternativas. Informativo CRQ-IV. FioCruz. 2014. Disponível em: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/iciict/11071/1/Info_CRQ_125_12-13.pdf. Acesso em: 05 set. 2020.

REBELLO, M. A. Fundamentos da Cultura de Tecidos e Células animais. Primeira edição-Rio, 2014. Disponível em: https://issuu.com/editorarubio/docs/issuu_fundamentos_da_cultura_de_tec. Acesso em: 28 set. 2020.

SHOKRZADEH, M. et al. Cytotoxic effects of aripiprazole on MKN45 and NIH3T3 cell lines and genotoxic effects on human peripheral blood lymphocytes. *Arquivos de gastroenterologia*, v. 56, n. 2, p. 155-159, 2019. Disponível em:

Cristina Comapa Rabelo, Joiciane Paes de Carvalho, Vanessa de Oliveira Campos, Claudia Dantas Comandoli-Wyrepkowski, Bruno Bezerra Jensen- **Ensaio Pré-clínicos Toxicológicos: Uma Revisão sobre Métodos alternativos para substituição do uso de cobaias**

https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S004-28032019000200155&script=sci_arttext.

Acesso em: 28 set. 2020

SPERANDIO, J. et al. Atividade antimicrobiana e citotoxicidade *in vitro* do óleo essencial de *Tagetes minuta* L. visando à aplicação no controle da mastite bovina. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 71, n. 4, p. 1251-1259, 2019. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352019000401251&script=sci_arttext&tlng=pt. Acesso em: 28 set. 2020.

STEFANELLI, L. C. J. Experimentação animal: considerações éticas, científicas e jurídicas. Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde, v. 15, n. 1, p. 187-206, 2011.

Disponível em: http://www.educadores.diaadia.pr.gov.br/arquivos/File/novembro2011/biologia_artigos/9experimentacao_animal.pdf. Acesso em: 29 ago. 2020.

TRÉZ, T. A. Considerações sobre o conceito dos 3Rs e o potencial conflito com novas compreensões do animal experimental. Revista Brasileira de Zootecias – Etologia aplicada e bemestar animal. Poços de Caldas, v. 19, n. 2, 2018. Disponível em:

<https://periodicos.ufjf.br/index.php/zoociencias/article/view/24741>. Acesso em: 05 set. 2020.

UJAVARI, S. C.; ADONI, T. A história do Século XX pelas descobertas da Medicina. Editora Contexto, 2014. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=R81SAwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=pt-BR#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 16 set. 2020.

WESTERFIELD, M. The Zebrafish Book: A guide for the laboratory use of the zebrafish (*Danio rerio*). Eugene, OR: University of Oregon, Institute of Neuroscience, 1994. Disponível em:

http://www.ceuaics.ufba.br/sites/ceuaics.ufba.br/files/implementation_of_a_new_experimental_animal.pdf. Acesso em: 26 set. 2020.