

Estudo das dificuldades encontradas por laboratórios brasileiros na implementação de métodos alternativos ao uso de animais: avaliação de irritação ocular e o teste de Permeabilidade e Opacidade da Córnea Bovina (BCOP)

Study of the difficulties encountered by Brazilian laboratories in implementing alternative methods to animal use: assessment of Ocular Irritation and the Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) test

Izabela Gimenes^{I,II,*} 

Octavio Augusto França
Presgrave^{III} 

Marcelo Salabert Gonzalez^{I,IV} 

Gutemberg Gomes Alves^{I,V} 

^I Programa de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia, Instituto de Biologia, Campus Gragoatá, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil

^{II} Laboratório de Farmacologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{III} Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{IV} Laboratório de Biologia de Insetos, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil

^V Departamento de Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil

* E-mail: izabela.gimenes@fiocruz.br

Recebido: 17 nov 2023

Aprovado: 02 set 2024

Como citar: Gimenes I, Presgrave OAF, Gonzalez MS, Alves GG. Estudo das dificuldades encontradas por laboratórios brasileiros na implementação de métodos alternativos ao uso de animais: avaliação de irritação ocular e o teste de Permeabilidade e Opacidade da Córnea Bovina (BCOP). *Vigil Sanit Debate*, Rio de Janeiro, 2024, v.12: e02283. <https://doi.org/10.22239/2317-269X.02283>

RESUMO

Introdução: Garantir a segurança dos produtos que causam irritação ocular é crucial. O Teste de Opacidade e Permeabilidade da Córnea Bovina (BCOP) é um método alternativo de irritação ocular aceito para fins regulatórios. **Objetivo:** Este estudo visou identificar os principais desafios e limitações técnicas enfrentadas por profissionais na implementação de métodos alternativos, particularmente para avaliação de irritação ocular. **Método:** Uma pesquisa qualitativa foi realizada a partir de questionários (n = 22 respondentes) e entrevistas (n = 7) seguidas por análise de discurso. **Resultados:** Os resultados revelam que 71% dos executores de métodos alternativos enfrentam dificuldades significativas, principalmente devido aos elevados custos de validação/implementação (62%) motivados por despesas com consumíveis. O acesso limitado à formação (62%) e a importação de reagentes e equipamentos (43%) também foram apontados. As principais limitações do BCOP incluem acesso limitado a globos oculares bovinos (50%), classificação de risco menos precisa (43%) e desperdício substancial de globos oculares (29%) devido a danos. As entrevistas corroboraram estas conclusões, destacando desafios como deslocamento aos matadouros, detalhes técnicos insuficientes no Guia da OCDE, a necessidade de materiais de apoio adicionais e a falta de profissionais experientes. Estes resultados ressaltam a necessidade de maior oferta de treinamentos para implementação de testes. Os altos custos de materiais importados apontam maiores gastos com validação no Brasil em comparação com outros países. **Conclusões:** Enfrentar estes desafios demanda um ambiente de inovação aberto, promovendo a colaboração entre a Tríplice Hélice (Empresas, Instituições Científicas e Tecnológicas e Governo).

PALAVRAS-CHAVE: Métodos Alternativos; Avaliação Toxicológica; Irritação Ocular; BCOP; Entrevista

ABSTRACT

Introduction: Ensuring the safety of products causing ocular irritation is crucial. The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) test is an accepted alternative method for ocular irritation assessment in regulatory contexts. **Objective:** This study aimed to identify the main challenges and technical limitations faced by professionals when implementing alternative methods, particularly for ocular irritation assessment. **Method:** A qualitative research approach was employed using questionnaires (n = 22 respondents) and interviews (n = 7), followed by discourse analysis. **Results:** Findings reveal that 71% of alternative method practitioners encounter significant difficulties, primarily due to high validation/implementation costs (62%), driven by consumable expenses. Limited access to training (62%) and importation of reagents and equipment (43%) were also noted.



Key BCOP limitations include restricted access to bovine eyeballs (50%), less precise risk classification (43%), and substantial eyeball waste (29%) due to damage. Interviews supported these conclusions, highlighting challenges such as travel to slaughterhouses, insufficient technical details in the OECD Guide, the need for additional support materials, and a lack of experienced professionals. These results underscore the need for expanded training opportunities for test implementation. The high cost of imported materials indicates greater validation expenses in Brazil than in other countries. **Conclusions:** Addressing these challenges requires an open innovation environment, fostering collaboration among the Triple Helix (Companies, Scientific and Technological Institutions, and Government).

KEYWORDS: Alternative Methods; Toxicological Tests; Eye Irritation; BCOP; Interview

INTRODUÇÃO

O Brasil é o país que ocupa o quarto lugar no *ranking* de consumo de produtos de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos, movimentando aproximadamente US\$ 22,9 bilhões por ano na economia mundial¹. Destes, 15% são destinados à pesquisa, ao desenvolvimento, à comunicação e ao lançamento de novos produtos². A fácil disponibilidade desses itens em diversos canais de venda tem contribuído para o crescimento do mercado, cada vez mais impactado por consumidores do sexo masculino, além das gerações Z e *millennials*³.

Considerando que estes produtos serão utilizados diariamente por milhões de consumidores, como indicado pelos índices econômicos apresentados, garantir seu uso seguro antes de sua comercialização torna-se uma importante questão de saúde pública e de atenção da vigilância sanitária. Esses produtos podem causar reações adversas dependendo de sua composição, quantidade, do tempo de exposição e sensibilidade individual do usuário⁴. Recentemente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) notificou a interdição cautelar de pomada para cabelos pela presença de efeitos indesejáveis no consumidor como: cegueira temporária (perda temporária da visão), forte ardência nos olhos, lacrimejamento intenso, coceira, vermelhidão, inchaço ocular e dor de cabeça⁵. Incidentes como esse reforçam a necessidade de os órgãos reguladores estarem adequados às metodologias nacionais e internacionais que avaliam a segurança de produtos com potencial de irritação e corrosão ocular. Durante muitos anos, a metodologia empregada para avaliação desses produtos foi realizada pelo teste de Draize, ao expor o olho dos coelhos aos possíveis agentes tóxicos, gerando preocupações éticas devido o sofrimento causado aos animais⁶. Dessa maneira, questões cientificamente válidas que substituam, reduzam ou refinem o uso animal têm gerado uma busca por métodos alternativos para disponibilizar ingredientes e produtos seguros através da execução de ensaios toxicológicos, mandatórios para o desenvolvimento científico e tecnológico do país^{6,7}.

Nas últimas décadas, o Brasil dedicou muitos esforços na área e assumiu o compromisso de: i) formular normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica, através da criação do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (Concea)^{8,9}; e ii) promover o desenvolvimento, a validação de novas técnicas no Brasil e a certificação de métodos alternativos ao uso de animais, com a instituição da Rede Nacional de Métodos Alternativos (Renama)¹⁰, bem como a criação de uma Plataforma Regional de Métodos Alternativos ao Uso de Animais de Experimentação (PReMASUL), para promover a criação de uma infraestrutura laboratorial e de recursos

humanos especializados capazes de implantar métodos alternativos no âmbito do Mercado Comum do Sul (Mercosul).

O Concea reconhece que um método alternativo validado é aquele com aceitação regulatória internacional e estabelece um prazo limite de cinco anos para que entrem em vigor como substituição obrigatória do método original a partir da data de publicação de cada Resolução Normativa (RN) correspondente¹¹. A Anvisa, por meio da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 35, de 11 de agosto de 2015, aceita o uso dos métodos alternativos de experimentação animal reconhecidos no Brasil pelo Concea¹². Este ato conferiu peso regulatório aos métodos aprovados pelo Concea, impactando todo o setor produtivo regulado pela Anvisa. Um aspecto crucial da questão regulatória é a participação da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE, *Organization for Economic Co-operation and Development*), uma organização intergovernamental que representa mais de 30 países. Suas prerrogativas incluem a coordenação e harmonização políticas, discussão de questões de preocupação mútua e cooperação para enfrentar problemas internacionais. As diretrizes para realização de ensaios de segurança estão disponíveis no website da organização¹³.

Em 2023, a proibição do uso de animais vertebrados em pesquisa científica, desenvolvimento e controle de produtos de higiene pessoal, perfumes e cosméticos que contenham em suas formulações ingredientes ou compostos com segurança e eficácia já comprovadas cientificamente no Brasil, representou um marco no avanço em termos éticos e padrões científicos da área. Essa medida desencadeou a exigência obrigatória do uso de métodos alternativos nesta questão, convergindo com os padrões internacionais no setor¹⁴.

Atualmente, o Concea reconhece 41 métodos alternativos, agrupados em 15 desfechos para substituição obrigatória, dentre o qual, sete métodos estão para avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular (Quadro 1).

Cada um destes métodos possui características próprias. O Teste de Permeabilidade e Opacidade de Córnea Bovina (BCOP) e o Teste de Olho Isolado de Galinha (ICE) utilizam olhos de animais recém-abatidos preservados *in vitro*, com a vantagem de utilizarem histologia para aumentar sua sensibilidade²⁴. O BCOP aplica substâncias teste na córnea bovina montada em um suporte (*holder*), avaliando opacidade e permeabilidade através de fluoresceína. A opacidade é medida pela transmissão de luz através da córnea, enquanto a permeabilidade é medida pela quantidade de fluoresceína que atravessa a córnea, detectada na câmara posterior do



Quadro 1. Métodos reconhecidos pelo Concea para a avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular.

Resolução Normativa n° 18/2014 ¹⁵	OECD 437 - Teste de Permeabilidade e Opacidade de Córnea Bovina (BCOP) ¹⁶
	OECD 438 - Teste de Olho Isolado de Galinha (ICE) ¹⁷
	OECD TG 460 - Teste de Permeação de Fluoresceína ¹⁸
Resolução Normativa n° 31/2016 ¹⁹	OECD 491 - Teste <i>in vitro</i> de Curta Duração para Danos Oculares (STE) ²⁰
	OECD 492 - Epitélio Corneal Humano Reconstruído (RhCE) ²¹
Resolução Normativa n° 56/2022 ¹⁴	OECD TG 494 - Teste de irritação ocular com Vitrigel ²²
	OECD TG 496 - Teste macromolecular <i>in vitro</i> ²³

Fonte: Elaborado pelos autores, 2023.

holder com a ajuda de um espectrofotômetro de luz visível¹⁶. Essas medições calculam o escore de irritação *in vitro* (IVIS - *in vitro irritancy score*) o qual é empregado para atribuir uma classificação quanto ao grau de irritação ocular *in vitro* do produto químico testado. O método possui protocolos distintos para líquidos/surfactantes (10 min) e sólidos não surfactantes (4 h). É adequado para detectar irritantes moderados a graves, mas não leves^{16,24}. Já no teste ICE observa o dano ao aplicar a substância teste no olho de galinha, avaliando opacidade, espessura e retenção de fluoresceína, com olhos de fácil disponibilidade²⁵. Contudo, surfactantes e álcoois podem causar falsos negativos e positivos¹⁷.

Ensaio de células cultivadas em monocamada são simples e curtos, mas não refletem o microambiente tridimensional dos tecidos reais²⁴. O Teste *in vitro* de Curta Duração para Danos Oculares (STE) avalia a citotoxicidade em células SIRC usando MTT, útil para identificar irritantes graves e não irritantes, mas não recomendado para Categoria 2²⁰. O Teste de Permeação de Fluoresceína (FL) avalia a função celular em células epiteliais de rim canino (MDCK), com limitações para substâncias coloridas, viscosas e certas linhagens celulares¹⁸. Modelos tridimensionais como o Epitélio de Córnea Humana Reconstruído (RhCE) mimetizam o tecido funcional, avaliando a irritação primária e citotoxicidade. Contudo, são frágeis e limitados a reproduzir apenas a camada epitelial, não abordando efeitos sistêmicos ou penetração no estroma/endotélio²⁴. Apesar do RhCE ter sido adotado como um método *in vitro* independente para discriminar as três categorias definidas pelo Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS) das Nações Unidas (ONU): Categoria 1 (Cat. 1) para “danos graves aos olhos”; Categoria 2 (Cat. 2) para “irritação ocular” e Sem Categoria (No Cat.) para substâncias químicas “que não requerem classificação e rotulagem” para irritação ocular ou danos graves aos olhos²⁶, os dados gerados foram propostos para serem utilizados em conjunto, como as abordagens “Top-Down” ou “Bottom-Up”, que combinam diferentes métodos *in vitro* para cobrir o potencial de irritação necessário^{27,28}.

O Teste de Irritação Ocular com Vitrigel® utiliza modelos epiteliais de córnea humana em membrana de colágeno, medindo a função de barreira epitelial pela resistência elétrica transepitelial (TEER). Não é validado para substâncias de composição desconhecida ou complexas, materiais biológicos, misturas, gases e aerossóis²². Finalmente, o teste macromolecular *in vitro* identifica produtos químicos que causam danos oculares graves

ou não requerem classificação de irritação ocular, através de um sistema bioquímico acelular, medindo a turbidez causada pela desagregação da matriz macromolecular²³.

Apesar da aceitação regulatória dos sete métodos para prever as respostas de Irritação Ocular no Teste de Draize, reconhecemos a necessidade de uma abordagem fundamentada na biologia humana que ofereça subsídios para garantir a segurança do produto. Dado que existem múltiplos mecanismos de irritação envolvidos, é crucial obtermos dados relacionados à vascularização, opacidade/permeabilidade e citotoxicidade²⁹. Um único teste *in vitro* não é suficiente para uma avaliação abrangente de diferentes classes químicas⁶, o que impulsiona os esforços em direção às Novas Abordagens Metodológicas (NAMs - *New Approach Methodologies*)^{27,30,31,32}.

Nesse contexto, as diretivas internacionais da OCDE orientam as tomadas de decisões para a classificação e a rotulagem dos produtos em testes e avaliação de lesões oculares graves/irritação ocular utilizando dados baseados em conjunto, assim como fontes de informação, propriedades físico-químicas, predições *in silico* e *read-across* de análogos químicos, dentro de Abordagens Integradas de Testes e Avaliação (IATA) (IATA n° 263²⁷) ou abordagens definidas (*Defined Approaches* - DAs) (OECD TG 467³⁴). Sendo o BCOP utilizado como teste inicial dentro de uma estratégia de avaliação *top-down* para identificar produtos químicos que causam lesões oculares graves^{26,27,28}, bem como para os produtos químicos não classificados para irritação ocular ou lesões oculares graves (UN GHS *No Category* - NC, não categorizado) e foi, portanto, endossado como cientificamente válido para ambos os propósitos²⁷.

Quando observamos o volume significativo de mais de 80 bilhões de animais abatidos internacionalmente por ano para consumo de carne, dentre eles, 302 milhões de bovinos²⁵ podemos observar uma oportunidade valiosa para o teste de BCOP, onde os olhos são frequentemente descartados após o abate por não serem normalmente comercializáveis no Brasil^{36,37}. Considerando o exemplo do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), laboratório oficial que compõe a Rede Nacional de Laboratórios de Vigilância Sanitária (RNLVISA) da Anvisa, sendo o de referência nacional da rede³⁸, a distância do abatedouro oficial para coleta dos olhos até a chegada ao Instituto torna-se uma grande limitação na aplicação do BCOP, pois estão distantes entre si em média 140 km (132 a 150 km), uma vez que o trajeto ocupa quase todo o limite de tempo para o início da utilização das córneas. Portanto, torna-se patente a necessidade de verificar qual o impacto da distância dos abatedouros oficiais dos centros de realização de testes, pois o intervalo entre a coleta e o início do ensaio deve ser minimizado e demonstrado para não comprometer os resultados¹⁶. Outro fator limitante a ser levado em consideração é a dificuldade em encontrar um abatedouro que queira fazer a cooperação técnica doando ou vendendo esses globos-oculares. Ainda, dificuldades técnicas relativas à longa execução do método podem levar de 8 até 12 h de duração.

Atualmente, existem duas abordagens definidas (DAs) adotadas pela OECD para a identificação de riscos oculares de líquidos (OECD TG 467³³). Ambas utilizam o método de Opacidade e Permeabilidade da Córnea Bovina (BCOP) com opacímetro a laser (LLBO), de acordo com a OECD TG 437¹⁶, em uma combinação de



estratégias. A DAL-1 utiliza o método de Epitélio Humano Reconstituído Semelhante à Córnea (RhCE), que pode ser o Teste de Irritação EpiOcular™ ou o Teste de Irritação do Epitélio Corneal Humano (HCE) (SkinEthic™), conforme a OECD TG 492²¹, e é voltada para líquidos não surfatantes puros³³. Por outro lado, a DL-2 combina o BCOP LLBO com o Teste de Exposição de Curto Prazo *in vitro* (STE), de acordo com a OECD TG 491²⁰, e é aplicável a líquidos não surfatantes puros, líquidos e sólidos dissolvidos em água³³.

Um estudo recente teve como objetivo desenvolver uma abordagem definida para a identificação de riscos oculares de produtos químicos sólidos, de acordo com as três categorias do UN GHS (Cat. 1, Cat. 2, Sem Categoria): a DAS. Foi demonstrado, no contexto do conceito de IATA, que a DAS é uma abordagem definida confiável para a avaliação de riscos oculares de sólidos, de acordo com o UN GHS. No passo 1, utiliza-se o método de teste SkinEthic™ HCE EIT para identificar “Sem Categoria” (No Cat.); no passo 2, o BCOP LLBO é utilizado para identificar “Categoria 1” (Cat. 1). Essa abordagem pode ser considerada um substituto completo não animal (NAM) para o teste Draize *in vivo*³⁴.

O BCOP oferece uma abordagem *in vitro* para avaliar a irritação e corrosão ocular potencial de substâncias químicas e produtos, alinhada com os princípios de substituição, redução e refinamento no uso de animais em pesquisas, conhecidos como os 3Rs. No entanto, a literatura carece de estudos exploratórios que identifiquem problemas e alternativas técnicas sustentáveis para superar essas dificuldades, permitindo, assim, a ampla adoção desse método como inovação de processo para obtenção de material biológico. Isso é de especial relevância para a saúde pública, na qual os testes toxicológicos devem ser realizados de forma mandatória para garantir a segurança do consumidor e a eficácia dos produtos.

Nesse contexto, o presente trabalho tem por objetivo mapear as dificuldades encontradas por laboratórios brasileiros na implementação de métodos alternativos ao uso de animais, com especial foco no desfecho de irritação ocular através do BCOP, por de uma análise qualitativa entre executores de métodos alternativos, capaz de identificar lacunas do conhecimento e obter *insights* para embasar futuras pesquisa e tomada de decisões.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo se trata de uma pesquisa de campo com objetivo exploratório e descritivo de abordagem quali-quantitativa. Esta pesquisa é parte do projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal Fluminense (UFF), parecer n° 3.753.708. A abordagem incluiu a análise de dados coletados entre profissionais da área de métodos alternativos, a partir de questionários e entrevistas, levantando inicialmente um quadro geral de dificuldades para a implementação dos mesmos e, em seguida, provocando a discussão focada na implementação do método do BCOP.

O estudo foi relatado segundo os critérios consolidados para pesquisas qualitativas (COREQ - *Consolidated criteria for reporting qualitative research*), que consiste em uma lista de verificação de 32 itens para entrevistas e grupos focais, abrangendo metodologia para coleta de dados em pesquisa qualitativa em saúde^{39,40}.

Equipe de pesquisa

As entrevistas e os questionários foram conduzidos no período de janeiro de 2019 a dezembro de 2021 por um entrevistador codificado (IGL), de acordo com metodologia de Tong et al.⁴⁰. Este era do sexo feminino, com qualificação técnica e experiência de mais de 15 anos na execução de métodos alternativos ao uso de animais. Antes do início do estudo foi estabelecido um relacionamento prévio com os participantes da pesquisa, no qual o houve a apresentação pessoal do entrevistador, apresentação do estudo e declaração dos interesses pessoais, identificando os objetivos e razões para desenvolver a pesquisa.

Desenho do estudo

Seleção de participante e tamanho da amostra

A seleção dos participantes voluntários se deu através de recrutamento via lista recebida por contato prévio com a coordenação da Renama/Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI) e lista de contato pessoal dos pesquisadores. Os participantes foram abordados pessoalmente, em eventos científicos, por telefone, ou por meio de formulário eletrônico disponibilizado através de um *link* via correio eletrônico (e-mail).

Cada participante assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) de modo presencial ou eletrônico. Os objetivos e todas as principais informações contidas no TCLE foram mostrados, incluindo o fato de que a não participação não implica nenhum prejuízo para a atividade funcional dos membros da equipe, assim como o uso dos dados do projeto de forma anônima terá apenas objetivos acadêmicos, e não de avaliação profissional.

Foram abordados 51 voluntários, incluindo executores de métodos alternativos ao uso de animais no Brasil, gestores, profissionais, e estudantes de laboratórios acadêmicos, centros de pesquisa e outros laboratórios pertencentes à rede pública e/ou privada que constam na lista de acesso dos laboratórios membros da Renama. Foram excluídos profissionais que, apesar de trabalharem em instituições executoras, não tenham apresentado experiência direta ou indireta na execução de métodos alternativos. Ao final, 22 participantes responderam ao questionário. Para a etapa de entrevistas, potenciais participantes foram recrutados durante eventos científicos especializados da área de métodos alternativos, sendo selecionados sete participantes, entre 18 e 75 anos e de ambos os sexos, que já tinham contato prévio com a metodologia de BCOP.

Procedimento do estudo

O estudo foi realizado em duas etapas. A primeira contou com a aplicação de questionários presencialmente e *online*, via *link* disponibilizado por e-mail para os participantes que assinaram o TCLE. O questionário foi composto por perguntas fechadas, a partir das quais foram calculadas frequências de respostas, e perguntas abertas que passaram por codificação e análise de discurso. Para a coleta de dados da primeira etapa, os autores forneceram questionários-guias para a condução do estudo (material suplementar 1). Os questionários foram inicialmente testados entre 10 membros de um laboratório da área de saúde pública para verificar a acuidade das perguntas e coleta de informações.



A segunda etapa contou com uma amostragem intencional de sete participantes convidados para entrevistas individuais ou de grupo composto por quatro a seis participantes, que assinaram um segundo TCLE para a entrevista. O objetivo foi validar os novos conhecimentos adquiridos realizados na primeira etapa dos questionários. Foi utilizado um instrumento-guia para aplicação das entrevistas semiestruturadas (material suplementar 2). As entrevistas foram realizadas por meio de ferramentas de videoconferência *online* ou presencialmente, durante três eventos científicos da área de toxicologia e métodos alternativos, quando houve a participação de representantes dos laboratórios associados da Renama e outras instituições de interesse.

Para a coleta de dados da segunda etapa, as entrevistas foram conduzidas por um membro do grupo de pesquisa. Foi utilizado um caderno para notas de campo no qual as respostas das entrevistas foram transcritas por auxílio de gravação de áudio, codificação por profissão e número e análise de discurso, com autorização deles, e não foram devolvidas aos participantes para comentários adicionais. As entrevistas tiveram duração de aproximadamente 10 a 20 min. A saturação dos dados foi discutida para indicação de que o objetivo da compreensão aprofundada do fenômeno estudado foi atingido com a amostra selecionada. Todos os documentos foram arquivados em local seguro e de acesso restrito aos membros da pesquisa.

A partir das respostas, os itens foram organizados sistematicamente para uma análise qualitativa de discurso, onde as falas que evidenciam as questões foram transcritas entre aspas. Os temas secundários foram descritos para clareza dos resultados e discussão.

Análises de dados e resultados

Os resultados dos questionários foram analisados qualitativa e quantitativamente. Os dados seguiram para tabulação em planilha eletrônica Microsoft Excel™ por categorias, e os resultados foram submetidos à verificação independente por pesquisador especialista (GAG) que não tinha conhecimento ou vínculo profissional anterior com os participantes da pesquisa. Foram calculadas apenas a frequência para as respostas numéricas, sem nenhum dado estatístico foi tratado e nenhum *software* foi utilizado para transcrição das respostas.

As transcrições de entrevistas foram realizadas pelos autores manualmente sem a utilização de *software* especializado, e passaram por duas abordagens distintas na pesquisa:

- Uma análise do discurso, que visou examinar as formas de expressão linguística utilizadas, na qual as afirmações e ideias similares foram agrupadas em categorias, para ilustrar os temas (análise temática), e os achados e as citações dos participantes foram codificadas e identificadas por código de profissão seguida de número, semelhante a trabalhos anteriores de Timoteo et. al.⁴⁰ e Orri et al.^{41,42}. Os dados estão sumarizados em um quadro sinóptico (Quadro 2).
- Uma análise de conteúdo, com o propósito de organizar sistematicamente os dados em um formato estruturado. Os resultados foram sintetizados em temas, que incluíram: pouca disponibilidade do abatedouro fornecer globo-oculares;

desperdício de globos oculares; dificuldade de classificação do método; deslocamento do laboratório até o abatedouro; problemas técnicos de execução; dificuldades de implementação da metodologia; uso do guia da OECD; custo, investimento e legislação; necessidade e acesso a mais cursos e treinamento; disseminação dos métodos alternativos nos cursos de graduação e pós-graduação. Os temas secundários foram descritos para clareza dos resultados e discussão.

RESULTADOS

Análise dos questionários

Na primeira etapa do estudo, dos 51 pesquisadores contatados na lista da Renama para aplicação dos questionários, obtivemos 22 respondentes incluídos, dos quais 20 (90,9%) executam os métodos, um participante (4,5%) já trabalhou e um não executa, mas terceiriza o serviço (4,5%) com métodos alternativos ao uso de animais. As datas da coleta ficaram registradas nos documentos. Não houve desistência dos participantes na condução dos questionários. O número de respondentes de cada pergunta está explicitado na legenda da figura.

Quando perguntados sobre o método executado dentro do desfecho de irritação e corrosão ocular, obtivemos um total de 17 respondentes, sendo que um terço, ou seja, seis participantes (35,3%) indicaram que realizam o teste de BCOP (OECD TG 437), enquanto 58,8% (10 respondentes) realizam o teste *in vitro* de curta duração (STE) (OECD TG 491) para avaliação do potencial de irritação ocular (Figura 1).

O resultado dos questionários, respondido por oito participantes, revelou que, quanto às dificuldades encontradas para a execução do teste de BCOP, a maior está relacionada à pouca disponibilidade de abatedouros fornecerem olhos bovinos para a realização do teste (quatro respondentes, ou 50%), seguida pelo grande desperdício de globos oculares devido a arranhões e outros danos (três respondentes, ou 37,5%). Além disso, foram apontadas dificuldades como o método não fornecer uma classificação tão assertiva quanto o método *in vivo* (três respondentes, ou 37,5%), o deslocamento do laboratório até o abatedouro (25%) e a necessidade de avaliação histopatológica (25%) (Figura 2).

Quando questionados quanto ao tempo que os executores levam no trajeto entre a coleta dos olhos bovinos e a chegada no laboratório, sete respondentes revelaram que a maioria (três respondentes, ou 42,9%) leva de 2 a 3 h de deslocamento.

Visando oportunidades de melhorias para atender às necessidades dos executores de métodos alternativos e entender suas principais dificuldades na realização de ensaios, todos os 22 participantes responderam a essa questão. A maioria apontou o alto custo relativo ao processo de validação (15 respondentes ou 68,0%) seguido do alto custo de materiais (13 respondentes ou 59,1%) e compra de equipamentos (nove respondentes ou 40,9%). Oportunidades relacionadas ao ensino foram apontadas por 59,1%, que sentem necessidade de mais cursos e treinamentos na área (13 respondentes) com enfoque na parte prática (nove respondentes ou 40,9%). A dificuldade de encontrar pessoas que



Quadro 2. Quadro sinóptico com o conteúdo das transcrições das entrevistas realizadas.

Formação	O guia da OECD é autoexplicativo?	Dificuldades quanto ao uso dos Guias da OECD	Outras dificuldades	De onde vem a demanda?	Importância de um levantamento dos laboratórios para disseminação dos métodos?	Outras sugestões e comentários?
Bióloga 1	<p>"Não. Eu acho que dá uma batida de cabeça. É que eu aprendi o estudo antes de ler a normativa".</p>	<p>Engessamento do método: "Se eu tenho uma dificuldade e está dizendo na normativa que é aquilo que eu tenho que fazer, não há nada que eu possa fazer! Nada!". Custo: "A empresa não vai querer, expandir dinheiro, tempo do funcionário e tudo". Estudo diferente da normativa: "Os patrocinadores não vão querer contratar o estudo porque está diferente no que diz na normativa e isso é muito difícil".</p>	<p>Dificuldade de encontrar pessoas que trabalhem, no mesmo método: "Eu não conheço ninguém que trabalhe com codornas" "Toxicidade oral aguda".</p>	<p>Empresas por prestação de serviços</p>	<p>"Com certeza. É muito importante. É que agora já entrou em vigor. Mas principalmente antes, nesses 5 anos, nossa, com certeza, eles terem criado o Premasul, nossa, sem dúvidas foi um negócio ótimo para disseminar, porque tem laboratório que ainda está tentando disseminar esse tipo de coisa. Rola uma dificuldade. Porque você olha para o Guia, não é o meu caso porque eu entrei lá com o teste já implementado. Mas você olha para o Guia e para mim é muito simples. Mas para uma pessoa que não trabalha com isso, onde o laboratório não implementou ainda, tem coisa que é muito vaga, tem coisa que você só pega na prática mesmo. Rola muito disso no BCOP".</p>	<p>"Quando a gente vai fazer o BCOP, o laboratório para. Não o laboratório inteiro, mas a gente precisa de uma certa mobilização porque é um teste longo. Ele leva um tempo considerável. Então, muitos estudos que poderíamos colocar ao mesmo tempo, não podemos. Por causa do BCOP. Mas, ao mesmo tempo, a gente consegue 'rodar' várias amostras ao mesmo tempo. Isso também é uma coisa bacana". "Pelo menos três pessoas".</p>
Bióloga 2	<p>"Você precisa procurar os protocolos de validação que ele cita e ver realmente o passo a passo. Tem método que você não consegue, porque não diz a quantidade certa de um reagente a ser usada. Eles dão o 'grosso', mas parece que você que padroniza no seu laboratório mais ou menos os tempos quando eles não dão".</p>		<p>Implementação de métodos: "Por mais que esteja tendo a parte do Renama com o Premasul, com os cursos, não é todo mundo que consegue ter acesso, eu acho que essa divulgação de implementar os métodos para ter algo mais homogêneo. Não cada um fazer de um jeito".</p>	<p>"Vem de bastantes empresas que buscam regulatórios. Ou que foram já reprovados em algum momento, de novo com alguma exigência pela Anvisa ou que estão querendo colocar novamente no mercado".</p>	<p>"Sim, precisa ter essa divulgação, o que cada laboratório está trabalhando. Eu acho que no Brasil, ainda mais em empresa privada, é muito na 'caixinha', ninguém quer divulgar o que está fazendo, compartilhar o conhecimento. Mas eu acho importante fazer um levantamento para saber o que seu parceiro está fazendo, o que ele conseguiu ou não. Eu acho que teria como dividir pesquisa e interesses de empresas e prestação de serviços".</p>	
Farmacêutico 1	<p>"Eu acho que, tendo a OECD, a gente consegue executar. Eu acho que você vai sofrer um pouquinho no início para implementar a técnica. Até você ir pegando o pulo do gato para pegar a técnica".</p>	<p>O guia não dá alguns detalhes técnicos importantes: "Mas eu acho que ele peca um pouco na parte de detalhar a parte prática. Então, a gente acaba tendo que ter outros materiais de apoio, a gente acaba tendo que recorrer ao relatório de validação. O IIV5 tem um canal interativo que eles fazem a divulgação de vídeos dessas técnicas e o vídeo de BCOP é muito bom, muito legal. Então eles ensinam todas as técnicas de lavagem, todos os macetes que precisamos para executar a técnica, são os que eles ensinam lá. Então a gente acaba tendo que recorrer a esses materiais paralelos só mesmo para saber os pormenores da técnica".</p>			<p>"Dada a visibilidade desses métodos atualmente, tanto com a questão regulatória que o Brasil tem que se adequar até esse ano para implementação dessas metodologias e aceitação regulatória, eu acho que a Renama é o principal órgão que pode fazer essa interface entre o executor e o método, porque estamos dentro de um cenário que precisamos aplicar esses métodos e não temos pessoal treinado para fazer isso. E são muitos métodos e cada um tem uma avaliação diferente, um desfecho diferente, um <i>end point</i> diferente. Então não são metodologias nem um pouco parecidas entre si. Eu acho que essa interlocução Renama e pesquisadores e pessoas que vão executar as técnicas, ela tem que ser feita. Eu acho que o próprio programa da Premasul é uma tentativa de reduzir esses espaços, entre esses diferentes meios, mas acho que ainda está pouco, que pelo curto tempo que temos par nos adequar eu acho que ações tem que ser feitas com mais frequência. Eu acho que a ideia do Premasul é muito bacana, mas eu não sei se ela vai atingir todo mundo que precisa atingir no tempo que a gente tem. Mas eu acho que é um começo, um primeiro passo".</p>	<p>"Os cursos de curta duração, como um fim de semana abordando todos os detalhes técnicos das metodologias <i>ex vivo</i> e <i>in vitro</i>, são essenciais. Cada metodologia tem suas particularidades, exigindo domínio técnico e, em alguns casos, estrutura e equipamentos específicos, como o opacitômetro necessário para o BCOP. Promover a comunicação entre laboratórios e realizar cursos de curta duração pode aumentar o alcance e o treinamento de mais profissionais em menos tempo, suprindo nichos específicos do mercado de forma eficiente. Cursos extensos, como os oferecidos pelo Premasul, são valiosos, mas, devido ao seu longo período e alto custo, acabam limitando a participação. Portanto, uma abordagem focada em cursos rápidos e direcionados pode atender melhor às necessidades emergenciais do setor".</p>

Continua

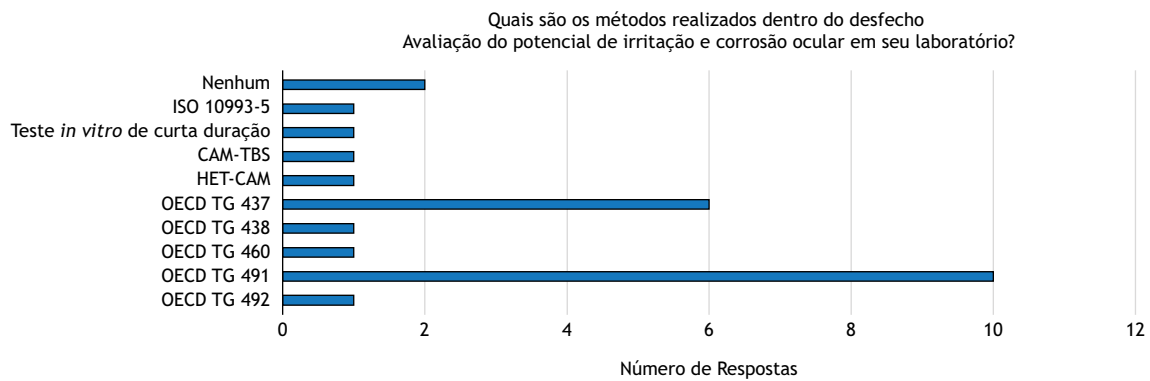


<p>Continuação</p>	<p>“Todos os <i>guidelines</i> são apenas um guia. Se você quiser uma abordagem mais aprofundada, é necessário consultar as literaturas citadas no final das diretrizes, em que a validação em que a validação foi publicada. Eu acredito que ele deveria fornecer um procedimento claro o suficiente para que todos possam desenvolver a técnica sem precisar pesquisar referências adicionais. E, às vezes, mesmo assim, não conseguimos encontrar o que precisamos. É necessário pesquisar muito, fazer cursos, treinamentos e buscar outras fontes”.</p>	<p>“Para uma abordagem mais aprofundada sobre o assunto, é necessário consultar as literaturas no final das diretrizes, em que a validação foi publicada. No entanto, as diretrizes não especificam a idade dos animais, o que dificulta garantir essa informação, pois os olhos vêm dos abateouros sem rastreabilidade exata. Outra questão é a preparação da fluoresceína, que precisa ser em concentrações específicas, mas o diluente não é claro, ou outro meio. Essas lacunas nas diretrizes resultam em dificuldades na aplicação prática, na qual ajustes são feitos com base em erros e acertos diários. Além disso, há falta de detalhes sobre a preparação das amostras, como a inclusão de surfactantes, o que não está claramente descrito”.</p>	<p>“Dificuldade de encontrar pessoas capacitadas para isso, dificuldade de encontrar insumos, tem muitas coisas que vamos importar, é a importação dos tecidos e no Brasil ainda é vista como um tráfico de órgãos, então é difícil trazer os tecidos pra o Brasil. Eu acho que enquanto a Anvisa não dá a integridade dela para facilitar a pesquisa ou desenvolvimento a gente vai ficar parado, estagnado nesta parte de avanço tecnológico relacionado a pesquisa.”</p>	<p>MV1: “Sim, é muito importante até mesmo para os nossos clientes, porque através dele eles podem escolher os laboratórios que são credenciados pelo Renama, se participam dos ensaios interlaboratoriais. Através desses ensaios o laboratório demonstra proficiência na realização da técnica. Então acredito que seja muito importante este tipo de participação”.</p> <p>MV1: “E como agora terá que fazer os testes alternativos, tem que ter mais laboratórios para fazer também”.</p>	<p>“Eu acho que os cursos do Renama e Premasul são enxugados na parte prática. Eu acho que se fosse mais detalhado, procedimento por procedimento, acho que seria mais proveitoso. Uma coisa é você estar no dia a dia executando. Outra coisa é você estar vendo alguém fazer e de uma maneira mais encurtada fica difícil essa assimilação para depois quando você estiver no dia a dia executando a análise”.</p> <p>L: “Eu acho extremamente importante a gente saber no primeiro da existência dos métodos, porque muitas vezes mesmo trabalhando na linha de pesquisa, eu trabalhava no veterinário, não é uma rotina ainda dentro de alguns cursos, ainda os métodos alternativos, quando você fala ainda mesmo dentro de programas de pós-graduação sobre métodos alternativos, ainda é um assunto que não é tão discutido, ainda não estão com atuação tão grande, a exploração adequada para agente tentar fazer a redução máxima dos animais. É importante que tenha uma maior difusão do assunto e quanto mais cursos são oferecidos, a gente possa treinar saber que os testes existem, pra que cada teste serve, que a gente consiga trazer isso par nossa rotina. Eu sinto uma diferença muito grande de um programa de pós-graduação pro outro. A gente vê que tem programas dentro de uma mesma instituição que tem um perfil extremamente desenvolvido para métodos alternativos e alguns programas que ainda deveriam estar passando por processos de reformulação, modernização e se adequando para que a aplicação destes testes se torne mais viável”.</p>	<p>Continua</p>
<p>Médica Veterinária 1 e Biólogo 3</p>	<p>“Uma boa parte da Normativa você vai entender. Eu tive uma dificuldade muito grande de entender a parte de cálculos na hora que ela coloca dentro da normativa. A partir do momento que fizemos o teste hoje, a colocação dos dados em tabela. Eu fui fazendo a aplicação das fórmulas, ficou muito mais claro que a leitura que eu fiz pela OECD”.</p>	<p>Sobre o guia ser “engessado”: “Eu acho que eles tentam colocar uma indicação para cada teste, né. No sentido que você tenha um protocolo pré-estabelecido. Eu acho interessante porque ela te dá um norte sobre a utilização e a funcionalidade de um teste. A partir do momento que você aprofunda dentro da leitura, do conhecimento da aplicação daquele teste, você vê que ele tem uma gama maior de função ou de interpretação ou de base que você pode associar com outros testes, ser mais bem aproveitados do que é colocado só na OECD”.</p>				
<p>Médica Veterinária 2</p>						



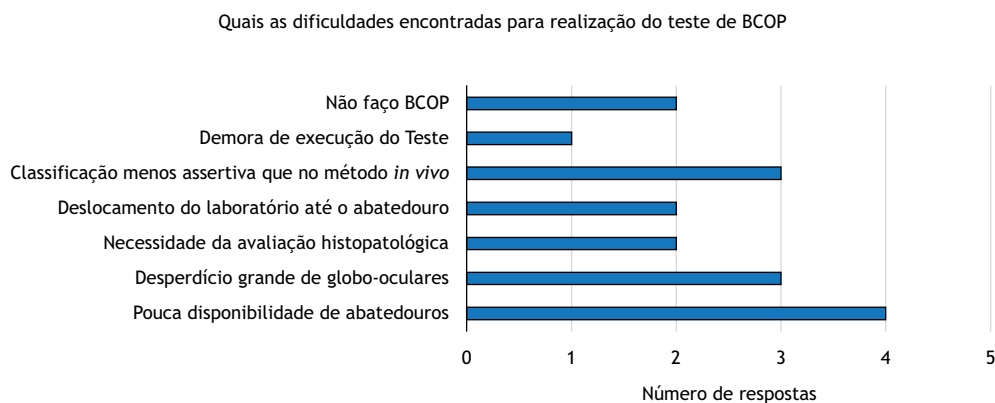
<p>Continuação</p>	<p>“Não. O Guia não é autoexplicativo. O guia explica o básico do procedimento. Mas os detalhes você precisa ter conhecimento prévio ou você conhecer quem já faça a prática ou buscar em artigos científicos as metodologias, mas o guia não é autoexplicativo”.</p>	<p>“Eu acho que é engessado, no sentido que, a minha experiência, citando uma dificuldade que eu tenho tido basicamente no processo de diluição. Então quando eu não consigo diluir minha substância no que é indicado, eu preciso fazer toda uma comprovação em cima do diluente que eu utilizo. E muitas vezes no guia eu não tenho outras opções, né. E acaba que eu fico com um pouco de receio disso não ser aceito lá na frente. Então mesmo com as comprovações, porque acaba que eu preciso desenvolver os métodos de comprovação e eu tenho um pouco de receio de isso não ser aceito lá na frente, só com embasamento científico”.</p>	<p>“O maior entrave tem sido a implementação de acordo com o Guia com uma equipe pequena e conhecimento técnico restrito em cultivo celular. Outros desafios surgirão após superar essa barreira inicial. Os métodos alternativos são novos para todos, e estamos em um momento de mudança regulatória. Implementar um método validado é difícil, com pouca possibilidade de modificação. Aqui a dificuldade aumenta com a importação de equipamentos e reagentes. dependemos de capacitação local, tornando o processo mais caro e complexo”.</p>	<p>“Os métodos alternativos são novos para todo mundo. Estamos passando por momento de mudança de paradigma, então tudo é muito novo. E a implementação por si só de um método é difícil para atender critérios regulatórios, porque você tem que atender todos os critérios do guia, por ser um método que foi validado. Então, você não tem muita possibilidade de modificar esse método. Especificamente no Brasil, a dificuldade é ainda maior porque a gente demanda tanto de equipamento quanto de reagentes importados e o custo desse método para a gente é bem maior se comparado com outros países. Então além de a gente depender de realizar capacitação no Brasil, de importar e custar mais caro pra gente esses métodos”.</p>	<p>“Eu acho que a Renama é importantíssima porque ela agrega pessoas com interesses em comum. E agregando pessoas com interesses em comum a gente consegue se organizar e se ajudar nessa implementação, tirando dúvidas, repassando processos, capacitando pessoas. Então, a Renama como agente promotor disso, eu acho muito importante”.</p>	<p>“Existem vários gargalos e acho que temos pouco incentivo, porque para tentar desenvolver uma metodologia é nova e muito caro, e mesmo quando consegue, a gente precisaria de um investimento muito maior para fazer uma validação interlaboratorial, e depois ainda atender critérios regulatórios no Brasil. Então precisaria de muito mais investimento, porque a gente está desenvolvendo essa metodologia e depois validando longo e caro. Então a gente não tem esse investimento direcionado para isso. E a gente também não tem facilidade de aquisição de reagentes. A gente compra anticorpo importado, e é tudo muito mais caro para a gente e também de equipamentos. Outra coisa é a parte legal. A gente tem alguns entraves legais, a própria utilização de tecidos, então tudo isso tem q ser revisito no Brasil. O arcabouço legal, as condições e aquisição de reagentes e mais investimentos direcionados para o desenvolvimento de metodologias no Brasil”.</p>
<p>Médica Veterinária 3</p>	<p>“Primeiro, é necessário um estudo aprofundado do protocolo, do assunto e do documento de validação, que geralmente está nas referências do protocolo. O documento de validação da técnica fornece muito mais informações e é mais detalhado. Implementar um teste em um laboratório não é uma tarefa fácil; demanda muito estudo das técnicas, dos possíveis vieses, do domínio de aplicação da técnica, das substâncias, e requer expertise na área. Nós implementamos vários protocolos, mas a existência de um treinamento facilita muito”.</p>	<p>Da pesquisa e um pouco do regulatório.</p>	<p>“Eu acho que a Renama é importantíssima porque ela agrega pessoas com interesses em comum. E agregando pessoas com interesses em comum a gente consegue se organizar e se ajudar nessa implementação, tirando dúvidas, repassando processos, capacitando pessoas. Então, a Renama como agente promotor disso, eu acho muito importante”.</p>	<p>“Existem vários gargalos e acho que temos pouco incentivo, porque para tentar desenvolver uma metodologia é nova e muito caro, e mesmo quando consegue, a gente precisaria de um investimento muito maior para fazer uma validação interlaboratorial, e depois ainda atender critérios regulatórios no Brasil. Então precisaria de muito mais investimento, porque a gente está desenvolvendo essa metodologia e depois validando longo e caro. Então a gente não tem esse investimento direcionado para isso. E a gente também não tem facilidade de aquisição de reagentes. A gente compra anticorpo importado, e é tudo muito mais caro para a gente e também de equipamentos. Outra coisa é a parte legal. A gente tem alguns entraves legais, a própria utilização de tecidos, então tudo isso tem q ser revisito no Brasil. O arcabouço legal, as condições e aquisição de reagentes e mais investimentos direcionados para o desenvolvimento de metodologias no Brasil”.</p>		

Fonte: Elaborada pelos autores, 2023.



Elaborada pelos autores, 2023.

Figura 1. Percentual de respostas para a pergunta “Quais são os métodos realizados dentro do desfecho avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular em seu laboratório?” (N = 17 respondentes).



Fonte: Elaborada pelos autores, 2023.

Figura 2. Percentual de respostas para a pergunta “Quais as dificuldades encontradas para realização do teste de BCOP?” (N = 8 respondentes).

trabalham com o mesmo método para troca de informações e *networking* foi apontado por aproximadamente 36% dos respondentes (oito) (Figura 3).

Foi ainda oferecida uma pergunta aberta: “Você poderia sugerir uma forma de melhorar os testes executados pelo seu laboratório?”, com um total de 10 respondentes. As respostas incluíram: (i) necessidade de investimento (verba) para aquisição de materiais, equipamento e consumíveis de qualidade (60%); (ii) investimento em recursos humanos, como treinamentos, capacitações e mais servidores públicos (50%), seguidos de (iii) necessidade maior contato com o Renama e agências regulatórias (10%), (iv) dificuldade de importação de materiais (10%) e (v) dificuldade de implementar boas práticas de laboratório (10%).

Entrevistas

A segunda etapa do estudo contou com sete participantes. As transcrições das entrevistas realizadas estão resumidas no quadro sinóptico apresentado no Quadro 2.

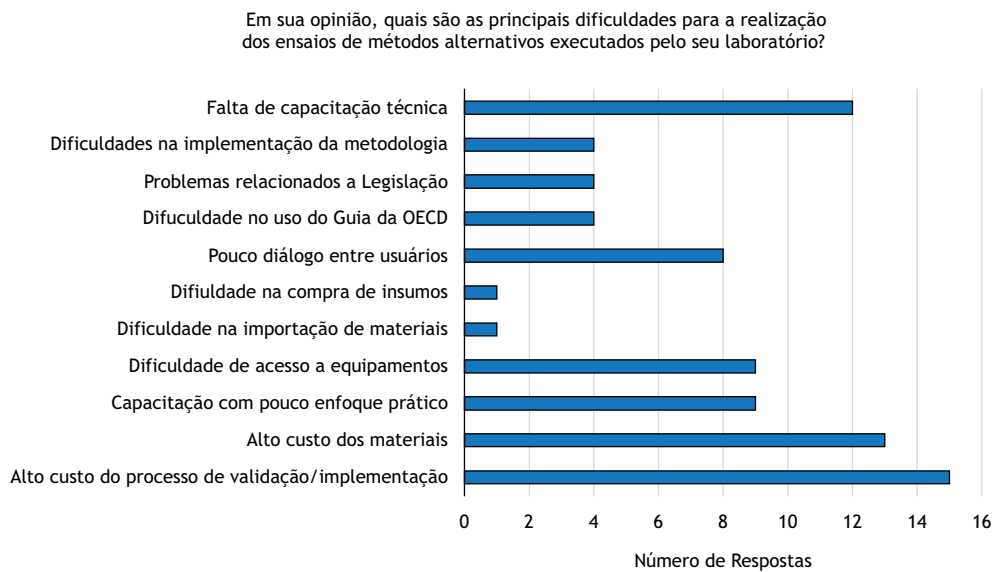
As principais dificuldades dos executores dos métodos de BCOP estavam relacionadas aos fatores relatados a seguir.

Pouca disponibilidade do abatedouro fornecer globo oculares

O **Biólogo 1** afirmou que, com a RN n° 18 (Concea), a demanda para execução do BCOP aumentou e os abatedouros “não tinham disponibilidade porque já iam vender para outro laboratório. A gente só precisava de contatos de frigoríficos que possam atender a nossa demanda”. O **Biólogo 2** declarou que “não era sempre que conseguíamos os olhos. Quando íamos coletar tínhamos que avisar com bastante antecedência”.

O **Médico Veterinário 1** e o **Biólogo 3** relataram que a dificuldade do fornecimento estava relacionada a necessidade de incineração do material: “Antigamente tínhamos dois fornecedores locais, porém eles argumentam que o olho é uma fonte de contaminação. Então eles não podem repassar os olhos do boi para o nosso laboratório porque precisam garantir que no final esses olhos serão incinerados”.

Esta mesma dificuldade foi apresentada pelo **Biólogo 1**, ao afirmar que “os frigoríficos não estão dispostos nem a vender esse globo ocular para a gente porque tem uma preocupação em relação à encefalopatia fungiforme que é a doença da vaca louca” e “[...] Tem que ser incinerado. Isso, e por mais que a gente fale para o frigorífico que a gente pode fazer um atestado, uma carta



Fonte: Elaborada pelos autores, 2023.

Figura 3. Percentual de respostas para a pergunta “Em sua opinião, quais são as principais dificuldades para a realização dos ensaios de métodos alternativos executados pelo seu laboratório?” (N = 22 respondentes).

do laboratório dizendo que é para fins de pesquisa, mesmo assim eles não aceitam. Então isso tem sido um pouco complicado”.

Desperdício de globos oculares

O grande desperdício de globos oculares foi outro fator discutido. De quatro laboratórios diferentes de origem dos respondentes, três compram os globos oculares e um laboratório recebe de doação. O valor médio pago por laboratório foi de R\$ 3,00 por globo, em 2020. A quantidade média de globos oculares solicitada por visita pelos usuários foi de 43 ± 13 .

Todos afirmaram haver um desperdício muito grande de globos oculares causado por arranhões, opacidade, e outros danos. O Médico Veterinário 1 e o Biólogo 3 afirmaram que “como os olhos do boi são retirados no frigorífico, geralmente vem com arranhão, ou com diâmetro muito pequeno que você não consegue ter um diâmetro adequado para encaixar dentro dos holders. Por isso pedimos sempre a mais para que no dia não falte”.

O Biólogo 1 afirma que

“quando a gente faz o pedido, geralmente é em torno de 40 globos oculares. Elas chegam no laboratório, quando vamos fazer uma avaliação macroscópica tem muitas córneas que estão lesionadas, estão com arranhão, algo que impeça que a gente use no teste. Então eu acho que essa dificuldade acontece mais porque a coleta é feita por um funcionário do frigorífico. Então não tem o mesmo que teria se fosse o técnico mesmo realizando essa coleta. Então a gente “desperdiça” muitas córneas. Eu acabo usando umas 18.”

Difículdade de classificação do método

Outro tópico abordado foi o fato de que o método de BCOP não fornece uma classificação tão assertiva com este método. O Biólogo

1 afirmou “não conseguir uma classificação tão assertiva quanto no *in vivo*”. Isso seria um problema por esse método avaliar irritantes e não categorizados (não irritantes). Como solução para este problema, o Farmacêutico 1 sugeriu que a “avaliação histopatológica deveria ser pensada para entrar no Guia, porque eu acho que ela é o gargalo que pode ajudar a separar mais as categorias”.

Deslocamento do laboratório até o abatedouro

Outro ponto a ser destacado foi o deslocamento do laboratório até o abatedouro. Metade dos entrevistados disseram que a distância não é um problema, estando o abatedouro localizado em um raio médio de 78,3 km, envolvendo um tempo médio de 1 h 30 min de deslocamento do laboratório até o abatedouro. Porém, o Biólogo 1 afirmou que “o teste a gente inicia no dia seguinte, porque não dá tempo”.

Problemas técnicos de execução

Os problemas técnicos de execução do teste também foram apontados nas entrevistas. Categorizamos como problemas técnicos as questões referentes ao tempo gasto de lavagem do material durante a execução do teste que, de forma manual, implica uma execução demorada, tempo e dificuldade de lavagem com produtos de cor, que o material não era possível de ser retirado apenas com as lavagens preconizadas pelo Guia, e tempo de execução em si da metodologia. Isso fica claro no relato do Biólogo 1:

“quando a gente começou a fazer a técnica, a gente não a tinha automatizada, pela bomba de sucção. Então, fazíamos tudo na seringa e isso consumia um tempo muito grande. E como trabalhávamos com muitas amostras, pegamos um projeto que tínhamos 86 amostras de agrotóxicos para avaliar, isso era um problema porque eram muitas lavagens e tal. Quando adquirimos a bomba que não é tão cara, e ela não tem manutenção quase nenhuma, economizou cerca de 2 h de ensaio, dentro do mesmo dia;”



“muitos agrotóxicos que analisávamos tinham cor. Eles eram azuis, vermelhos, então às vezes só com o número de lavagens descritos no Guia nós não conseguíamos remover completamente as substâncias. Então tínhamos que fazer várias lavagens e às vezes ficavam impregnados um pouco na superfície da córnea. Porque algumas dessas substâncias tinham ingredientes que nem sei se são moléculas orgânicas. Parece que tem algumas coisas inorgânicas que impregnam ali e é muito difícil de tirar. Então eu acho que isso é uma limitação técnica.”

Outra dificuldade do teste é relacionada ao tempo de execução das amostras. O **Biólogo 2** afirma que “dependendo se for líquido ou sólido demora e você fica mais tempo no laboratório, porque tem que terminar as leituras no dia”. O **Biólogo 1** afirma que pelo teste ser longo, outros funcionários precisam parar suas atividades para ajudá-lo na execução do método:

“Quando a gente vai fazer o BCOP, o laboratório para. Não o laboratório inteiro, mas a gente precisa de uma certa mobilização porque é um teste longo. Ele leva um tempo considerável. Então muitos estudos que poderíamos colocar ao mesmo tempo, não podemos. Por causa do BCOP. Mas, ao mesmo tempo, a gente consegue “rodar” várias amostras ao mesmo tempo. Isso também é uma coisa bacana, mas temos sempre ao menos três pessoas.”

Dificuldades de implementação da metodologia

As dificuldades de implementação da metodologia foram abordadas pelo **Médico Veterinário 3**: “Eu acho que atualmente o meu maior entrave tem sido a implementação tentando fazer isso de acordo com o Guia. Como a minha equipe é muito pequena e a gente tem um conhecimento técnico um pouco restrito na área de cultivo celular, na área mais específica, para extrapolar eu tenho tido um pouco de dificuldade”.

O **Farmacêutico 1** abordou as questões relativas à implementação dos métodos devido à aceitação regulatória para a substituição dos métodos alternativos e necessidade de mais treinamentos:

“Dada a visibilidade desses métodos atualmente, tanto com a questão regulatória que o Brasil tem que se adequar até esse ano para implementação dessas metodologias e aceitação regulatória, eu acho que a Renama é o principal órgão que pode fazer essa interface entre o executor e o método, porque estamos dentro de um cenário que precisamos aplicar esses métodos e não temos pessoal treinado para fazer isso. E são muitos métodos e cada um tem uma avaliação diferente, um desfecho diferente, um *endpoint* diferente. Então não são metodologias nem um pouco parecidas entre si. Eu acho que essa interlocução Renama e pesquisadores e pessoas que vão executar as técnicas, ela tem que ser feita. Eu acho que o próprio programa da Premasul é uma tentativa de reduzir esses espaços, entre esses diferentes meios, mas acho que ainda está pouco, que, pelo curto tempo que temos para nos adequar, eu acho que ações tem que ser feitas com mais frequência. Eu acho que a ideia do Premasul é muito bacana, mas eu não sei se ela vai

atingir todo mundo que precisa atingir no tempo que a gente tem. Mas eu acho que é um começo, um primeiro passo.”

O **Farmacêutico 2** completa sobre a questão de mudança regulatória e implementação do método:

“Os métodos alternativos são métodos que são novos para todo mundo. Estamos passando por momento de mudança regulatória, de mudança de paradigma, então tudo é muito novo. E a implementação por si só de um método é difícil para atender critérios regulatórios, porque você tem que atender todos os critérios do método, e é um método formatado, é um método que foi validado. Então você não tem muita possibilidade de modificar esse método. Especificamente no Brasil, a dificuldade é ainda maior porque a gente demanda tanto de equipamento quanto de reagentes importados e o custo desse método para a gente é bem maior se comparado com outros países. Então além de a gente depender de realizar capacitação no Brasil, de importar e custar mais caro pra gente esses métodos.”

Uso do Guia da OECD

Em relação ao uso do Guia da OECD, todos os entrevistados abordaram algum tipo de dificuldade. Vários entraves foram mencionados quanto à rigidez do método, incluindo a impossibilidade de realizar mudanças no protocolo, pois alguns destes trabalham prestando serviço para empresas privadas e possuem receito de mudar o protocolo e o requisitante não aceitar essa modificação; falta de detalhamento técnico da parte prática, necessidade de buscar outros materiais de apoio, como o material de validação do método.

Segundo o **Biólogo 1**, “Se eu tenho uma dificuldade e está dizendo na normativa que é aquilo que eu tenho que fazer, não há nada que eu possa fazer! Nada!”; “a empresa não vai querer expandir dinheiro, tempo do funcionário e tudo”; “Os patrocinadores não vão querer contratar o estudo porque está diferente no que diz na normativa e isso é muito difícil”.

O **Farmacêutico 1** aponta:

“O guia não dá alguns detalhes técnicos importantes, mas eu acho que ele peca um pouco na parte de detalhar a parte prática. Então, a gente acaba tendo que ter outros materiais de apoio, a gente acaba tendo que recorrer ao relatório de validação. O IIVS tem um canal interativo que eles fazem a divulgação de vídeos dessas técnicas e o vídeo de BCOP é muito bom, muito legal. Então eles ensinam todas as técnicas de lavagem, todos os macetes que precisamos para executar a técnica, são os que eles ensinam lá. Então, a gente acaba tendo que recorrer a esses materiais paralelos só mesmo para saber os pormenores da técnica.”

Para o **Biólogo 3**:

“Se você quiser ter uma abordagem mais aprofundada sobre o assunto você tem que consultar as literaturas que se encontram no final da literatura. Através dela é que foi feita a validação e publicada. No *guideline* não especifica uma idade dos animais. Como que a gente consegue garantir isso no dia a dia? Porque como os olhos vem dos abatedouros é difícil



sabermos a idade exata dos animais. Como está no *guideline* a gente tem que reportar, mas se a gente não consegue ter essa rastreabilidade fica difícil. Outra questão que eu comento que o *guideline* não tem é como é preparada a Fluoresceína. Fala que tem que ser preparada em uma concentração de 4 mg/mL para líquidos e 5 mg/mL para sólidos. Mas qual que é o diluente? É a solução fisiológica? É o próprio meio? Então isso é pobre de informação. Durante o dia a dia mesmo que você verifica os erros e acertos e vai melhorando a técnica.”

O **Médico Veterinário 1** complementa: “Não está exatamente descrito o mesmo em relação às amostras. Se deve ter surfactante ou não, como que a gente prepara essa amostra para aplicação”. Já o **Médico Veterinário 3** afirma que:

“Eu acho que é engessado, no sentido que, a minha experiência, citando uma dificuldade que eu tenho tido basicamente no processo de diluição. Então quando eu não consigo diluir minha substância no que é indicado, eu preciso fazer toda uma comprovação em cima do diluente que eu utilizo. E muitas vezes no Guia eu não tenho outras opções, né. E acaba que eu fico com um pouco de receio disso não ser aceito lá na frente. Então mesmo com as comprovações, porque acaba que eu preciso desenvolver os métodos de comprovação e eu tenho um pouco de receio de isso não ser aceito lá na frente, só com embasamento científico.”

Custo, investimento e legislação

Podemos perceber, especialmente dentre os profissionais entrevistados oriundos de laboratórios públicos, a questão de necessidade de investimento e o alto custo dos materiais importados, assim como o alto custo de um processo de validação, como dificuldades levantadas. Segundo o **Farmacêutico 2**:

“Existem vários gargalos ainda que a gente precise tentar desenvolver metodologias. De um modo geral acho que temos pouco incentivo, porque para tentar desenvolver uma metodologia é muito caro, e mesmo quando você desenvolve uma metodologia, no caso que a gente em um método que desenvolveu de tecido de córnea a gente precisaria de um investimento muito maior para fazer uma validação interlaboratorial, e depois isso pudesse atender para critérios regulatórios no Brasil. Então precisaria de muito mais investimento, porque a gente está desenvolvendo metodologia e depois validando essa metodologia. Isso é um processo longo e caro. Então a gente não tem esse investimento direcionado para isso. E a gente também não tem facilidade de aquisição de reagentes. A gente compra anticorpo importado, e é tudo muito mais caro para a gente e também de equipamentos. Outra coisa é a parte legal. A gente tem alguns entraves legais, a própria utilização de tecidos, então tudo isso tem que ser revisto no Brasil. O arcabouço legal, as condições e aquisição de reagentes e mais investimentos direcionados para o desenvolvimento de metodologias no Brasil.”

Similarmente, para o **Biólogo 3**:

“tem muitas coisas que vamos supor, é a importação dos tecidos e no Brasil a visão de importação ainda é vista como

um tráfico de órgãos, então é difícil trazer os tecidos para o Brasil. Eu acho que, enquanto a Anvisa não dá a integridade dela para facilitar a pesquisa ou desenvolvimento, a gente vai ficar parado, estagnado nesta parte de avanço tecnológico relacionado a pesquisa.”

Necessidade e acesso a mais cursos e treinamentos

A necessidade e o acesso a mais cursos e treinamentos na metodologia (capacitação) e implementação do método foram destacadas pelos entrevistados. A dificuldade em encontrar pessoas capacitadas foi abordada pelo **Médico Veterinário 1** e **Biólogo 3**, e o **Biólogo 2** afirmou “por mais que esteja tendo a parte do Renama com o PremaSul, com os cursos, não é todo mundo que consegue ter acesso”. Já a respeito de treinamento e implementação, o **Médico Veterinário 1** e **Biólogo 3** afirmaram que

“os cursos do Renama e PremaSul são enxutos na parte prática. Eu acho que se fosse mais detalhado, procedimento por procedimento, acho que seria mais proveitoso. Uma coisa é você estar no dia a dia executando. Outra coisa é você estar vendo alguém fazer e de uma maneira mais encurtada fica difícil essa assimilação para depois quando você estiver no dia a dia executando a análise.”

Segundo o **Biólogo 2**, “Por mais que esteja tendo a parte do Renama com o PremaSul, com os cursos, não é todo mundo que consegue ter acesso, eu acho que essa divulgação de implementar os métodos para ter algo mais homogêneo, não cada um fazer de um jeito”.

Disseminação dos métodos alternativos nos cursos de graduação e pós-graduação

A questão da disseminação dos métodos alternativos nos cursos de graduação e pós-graduação também foi identificada, como apontado pela **Médica Veterinária 2**:

“Eu acho extremamente importante a gente saber primeiro da existência dos métodos, porque... quando você fala ainda mesmo dentro de programas de pós-graduação sobre métodos alternativos, ainda é um assunto que não é tão discutido, ainda não estão com atuação tão grande, a exploração adequada para a gente tentar fazer a redução máxima dos animais. É importante que tenha uma maior difusão do assunto e quanto mais cursos são oferecidos... Eu sinto uma diferença muito grande de um programa de pós-graduação pro outro. A gente vê que tem programas dentro de uma mesma instituição que tem um perfil extremamente desenvolvido para métodos alternativos e alguns programas que ainda deveriam estar passando por processos de reformulação, modernização e se adequando para que a aplicação destes testes se torne mais viável.”

Esse comentário destaca a importância de conscientizar as pessoas sobre a existência de métodos alternativos em pesquisa, particularmente em programas de pós-graduação, para promover uma maior disseminação e discussão sobre o assunto.



DISCUSSÃO

Historicamente, testes em animais foram utilizados para determinar o nível de toxicidade ocular como prática comum por décadas⁶. No entanto, devido a preocupações éticas, legais e os avanços na biotecnologia, houve um aumento no desenvolvimento de métodos alternativos que possam prever a toxicidade de produtos químicos com a redução ou sem o uso de animais²⁷. Embora existam desafios associados à implementação de métodos alternativos, também existem inúmeras oportunidades associadas. Compreender tal cenário fortalece iniciativas e subsidia a criação de novos saberes.

Para esse fim, uma das estratégias com grande valor para a coleta de informações com aprofundamento de questões é o uso da pesquisa qualitativa do tipo entrevistas^{40,43}. Diante dos dados do presente trabalho, foi possível realizar um diagnóstico, com executores de métodos alternativos no Brasil, identificando alguns dos principais desafios, dificuldades e limitações. Além disso, temas secundários foram identificados, podendo abrir caminhos para que cientistas atuem com oportunidades para empreender de forma inovadora na resolução de problemas⁴⁴, como aplicação de cursos, ou oferta de serviços, sendo as *deep techs* de biotecnologia responsáveis por 61% do setor na região de América Latina e Caribe⁴⁵.

Pesquisar com recursos limitados é uma tarefa que exige iniciativa e criatividade para adequar o conhecimento aos obstáculos, como a falta de materiais, investimento e falta de incentivo. Esse é um problema mundial, e de certamente, de grande relevância no Brasil⁴⁶. Algumas das limitações para substituição animal são: a falta de legislação específica sobre o uso de material biológico de origem humana para testes toxicológicos dificultando o acesso aos modelos alternativos *in vitro*⁴⁷; dificuldades relativas ao longo processo de aceitação de uma metodologia validada internacionalmente entrar na legislação brasileira; o longo processo de validação de um método alternativo, que pode levar em média de 10 a 15 anos⁴⁶.

Outra limitação é o fato de um único método *in vitro* não ser capaz de substituir o teste *in vivo* e prever todas as categorias tóxicas de produtos químicos. No entanto, uma combinação estratégica de vários métodos alternativos dentro de uma estratégia de ensaios pode ser capaz de substituir os animais³⁰. Em casos de difícil classificação para avaliação toxicológica ocular ou cutânea, por exemplo, é utilizada a avaliação histopatológica⁴⁸. Como desafio enfrentado por esse mesmo desfecho, podemos citar a questão dos centros de abate, pois normalmente se encontram distantes dos executores de métodos, dificultando a chegada do material ao laboratório, assim como a falta de financiamento público para as pesquisas brasileiras e desenvolvimento de métodos.

Um aspecto importante identificado na fala do Biólogo 1, quando afirma que “o teste a gente inicia no dia seguinte, porque não dá tempo”, indica que a distância geográfica é um fator que dificulta a realização de testes experimentais dentro do prazo de 24 h após a coleta de amostras. Estudos apontam o uso de veículos aéreos não tripulados (VANT) como uma solução inovadora para o problema de transporte de amostras biológicas, testados e avaliados em diferentes cenários no mundo^{50,51}. A Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) tem atuado na área de forma pioneira propondo um modelo de logística através de VANT para a Saúde Pública⁵¹. Adicionalmente,

a literatura carece de estudos experimentais que validem o prolongamento de uso de globos oculares após 24 h da coleta, permitindo que os globos oculares possam ser utilizados de forma mais sustentável e por mais tempo, sendo necessária ainda a identificação de protocolos de preservação adequados à realização deste teste.

É válido destacar ainda que matadouros produzem grande quantidade de resíduos biológicos e, na maioria das vezes, grande parte desses materiais são subutilizados e destinados incorretamente, como, por exemplo, na incineração ou descarte em lixões ou aterros^{53,54}. Estudos anteriores destacaram diversas aplicações benéficas para os resíduos provenientes de matadouros^{54,55,56}, sendo a reciclagem animal uma atividade indispensável para a sustentabilidade da cadeia produtiva de proteína animal. O recolhimento e destino correto dos resíduos produzem produtos do setor em outras indústrias, como: alimentação animal, agricultura, indústria química e petroquímica e indústria de higiene e beleza⁵⁷. Apesar de a literatura apontar grande oferta desse material, nossa pesquisa apontou dificuldades de obtenção do material biológico por parte de alguns pesquisadores pela localização regional não dispor de muitos centros de abate, e também uma preocupação e resistência dos abatedouros em doar esse material com receio de zoonoses.

Outra questão relevante apontada neste trabalho foi o desperdício grande de globo ocular por arranhões, diâmetro reduzido e danos ocasionados na coleta do material após recebimento no laboratório e avaliação prévia para o teste de BCOP. Como uma solução para o problema do desperdício visando a sustentabilidade, Khan et al.⁵⁸ sugerem o desenvolvimento de uma iniciativa de treinamento institucional colaborativo (CITI), na qual funcionários ou voluntários treinados devem estar presentes no momento da remoção. Os módulos da CITI permitem orientar com precisão os trabalhadores para que a extração dos órgãos tenha maior sucesso. Nessa iniciativa, antes da extração, os pesquisadores aprenderiam os procedimentos de manuseio e transporte de tecidos por meio de treinamento obrigatório. Todos os procedimentos seriam supervisionados pelo pesquisador principal e os pesquisadores receberão instruções para seguir as políticas do matadouro, sob risco de exclusão do processo de coleta de amostras⁵⁸.

Alguns relatos de participantes da presente pesquisa apontam que o método de BCOP não fornece uma classificação tão assertiva quanto o método *in vivo*. Em contrapartida, a avaliação da profundidade da lesão em córneas isoladas foi proposta por Maurer et al.⁵⁹ para prever o grau e a duração da lesão tecidual⁵⁸. A caracterização adicional do dano pela avaliação histopatológica também ajuda na identificação de casos em que a resposta se estabelece na fronteira entre duas categorias com base nos critérios de decisão do método^{59,60}. Dessa maneira, o documento de Orientação n° 160 da OECD recomenda que os usuários preservem os tecidos para avaliação histopatológica com a finalidade de acompanhar a profundidade de lesão para uma melhor compreensão dos danos oculares, através do método de hematoxilina e eosina (H&E)⁴⁸, Jeong et al.⁶¹ observou que a coloração tradicional H&E pode não oferecer informações suficientes para classificar produtos químicos irritantes aos olhos. Pensando em um aprimoramento, os autores realizaram o teste de BCOP com químicos de resultados conhecidos e propuseram a avaliação histopatológica da estrutura da córnea



através de três métodos de coloração H&E, tricrômio de masson e ácido periódico schiff⁶¹. Portanto, a avaliação histopatológica das córneas aparece como uma importante técnica complementar ao BCOP para suprir as informações necessárias para uma classificação mais assertiva, como a almejada pelos entrevistados da pesquisa.

Diversos obstáculos foram mencionados em relação à utilização dos Guias da OECD. De modo geral, as diretrizes da OCDE para métodos alternativos oferecem um conjunto de princípios e critérios robustos para validar e avaliar a fiabilidade e relevância dos testes que não utilizam animais para fins regulamentares. No entanto, os presentes relatos apontam uma percepção de inflexibilidade dos procedimentos propostos, pela impossibilidade de alterar o protocolo devido ao fato de que alguns usuários prestam serviços para empresas privadas e têm receio de que a modificação do protocolo não seja aceita pelo cliente, por risco de não aceitação regulatória. Além disso, o fator tempo de execução durante o teste foi apontado de forma crítica na pesquisa, principalmente no que tange o número de lavagens e retirada de substâncias coloridas, não preconizadas no Guia da OECD 437. Além disso, foi destacada a carência de informações técnicas detalhadas na execução prática, o que exige que os usuários busquem outros recursos de apoio, incluindo os documentos originais de validação do método. Apesar de todos os entrevistados apontarem alguma dificuldade no uso do Guia da OECD referente ao BCOP, a literatura científica não apresenta relatos similares, sendo esse tema de grande importância, demandando análises mais aprofundadas que contribuam na maior disseminação e uso destes métodos.

A pergunta aberta “Você tem alguma sugestão para melhorar os testes realizados em nosso laboratório?” permitiu identificar de modo direto oportunidades de melhoria nesta aplicação. Entre elas, destacam-se a necessidade de implementar boas práticas laboratoriais e a importância de captar e capacitar uma equipe técnica permanente, reduzindo a dependência por pessoal temporário, como alunos bolsistas. Para isso, a oferta de treinamento e formação adequada na realização de métodos alternativos torna-se fundamental.

Apesar de o Brasil liderar a PReMASUL, que foi criada em 2015 pelo MCTI com o objetivo de oferecer cursos para disseminar o conceito de “métodos alternativos” nos países do Mercosul, promover o desenvolvimento de infraestrutura laboratorial e formar profissionais especializados, nossa pesquisa revelou oportunidades de aprimoramento. Entre os entrevistados da área, 59,1% expressaram a necessidade de mais cursos e treinamentos práticos em metodologias e implementação de métodos alternativos. Além disso, 36,4% destacaram a importância de estabelecer conexões com outros profissionais que trabalham com os mesmos métodos para troca de informações e *networking*. Outro aspecto importante a considerar foi a necessidade da disseminação dos métodos alternativos nos cursos de graduação e pós-graduação. Além de promover a criação da PReMASUL, o Brasil foi pioneiro ao estabelecer a pós-graduação *lato sensu* em métodos alternativos, tendo o primeiro curso de especialização do país na área oferecido desde 2019 pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) da Fiocruz. O programa foi criado com a premissa de oferecer formação básica consolidada, focada nos conceitos de bioética, experimentação animal, métodos alternativos e validação, de modo relacionado e

aplicado^{27,62}. Tais iniciativas destacam-se também como uma oportunidade para empreendedorismo científico⁴⁴.

A presente pesquisa identificou ainda diversos desafios relacionados a custos e recursos financeiros. Observa-se que 68,0% dos entrevistados mencionaram o alto custo associado ao processo de validação, seguido por 59,1% que apontaram o elevado custo dos materiais e 40,9% que destacaram os desafios relacionados à aquisição de equipamentos. Para abordar essas questões, é importante: buscar maneiras de tornar mais acessíveis a importação e a compra de insumos, aprimorar a infraestrutura laboratorial, investir em equipamentos mais robustos e estabelecer práticas eficazes de manutenção e calibração. Além disso, promover o desenvolvimento de políticas públicas para garantir um financiamento adequado e fortalecer as parcerias com entidades como o Renama e agências regulatórias, bem como incentivar uma cadeia produtiva de insumos organizada e protegida pode representar um caminho promissor para melhorar essa situação.

Este estudo revelou uma série de desafios e oportunidades relacionada ao uso de métodos alternativos em pesquisa toxicológica ocular. Apesar de todas as dificuldades apontadas, é importante notar que esta pesquisa oferece contribuições valiosas para a literatura, ao documentar as experiências práticas, os desafios enfrentados pelos usuários de métodos alternativos no Brasil e as oportunidades que podem ser abertas para mitigar as dificuldades encontradas pelos pesquisadores. Essas descobertas podem servir como base para futuras pesquisas e formulação de políticas públicas que visam melhorar a eficácia e a adoção desses métodos, promovendo a pesquisa mais ética, eficiente e sustentável no país, fortalecendo o ecossistema de inovação aberta e transformação digital baseadas no Marco Legal da Inovação, com papel fundamental da adoção de tais práticas na política local de seus núcleos de inovação tecnológica⁶³.

Uma das principais limitações do estudo diz respeito ao tamanho da amostra. Embora o procedimento de amostragem tenha sido cuidadosamente planejado para incluir uma ampla variedade de experiências, nosso procedimento de amostragem se limitou à lista de laboratórios oficiais cadastrados na Renama e aos participantes abordados em eventos sobre o tema. No entanto, nossas conclusões podem ser generalizadas apenas para este grupo de estudo, e o padrão de respostas pode diferir em outros países ou se conseguíssemos abordar um universo maior de respondentes. Embora tenham sido empregados métodos rigorosos de coleta e análise de dados, como entrevistas semiestruturadas e análise temática, é possível que outros métodos pudessem ter proporcionado uma compreensão mais aprofundada ou complementar das experiências e percepções dos participantes. Futuras pesquisas podem se beneficiar de amostras mais amplas, incluindo laboratórios ainda não cadastrados na Renama e de outros países, com apoio da pesquisa aos Centros de Validação de Métodos Alternativos de cada país, com o mesmo padrão metodológico de coleta e análise de dados, para obter uma compreensão mais abrangente e precisa desse tema.

Esperamos que o mapeamento das instituições que realizam métodos alternativos no Brasil contribua para que tais métodos sejam implantados e substituídos, fortalecendo iniciativas sobre a importância de participação em redes colaborativas tais como Renama e



BraCVAM (Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos). Além disso, a PReMASUL tem um papel importante de inserir o Brasil e demais países do Mercosul na rota das pesquisas e desenvolvimento de metodologias alternativas. Essas iniciativas possibilitam parcerias com laboratórios nacionais e internacionais para pesquisas multicêntricas, treinamentos em técnicas de interesse, além de um impacto positivo nas demandas de pesquisas em saúde pública. Ainda, os editais de apoio à inovação, como o Inova Fiocruz, podem desempenhar um papel crucial no fortalecimento e na implementação de métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa e desenvolvimento, oferecendo financiamento e recursos essenciais para que instituições de pesquisa e laboratórios possam superar alguns dos principais desafios identificados na implementação desses métodos.

Estudos anteriores destacam outros métodos válidos ainda não publicados nos guias internacionais, como os da OECD, mas que estão sendo utilizados para avaliar efeitos oculares, apontando para a necessidade de validação de modelos e o desenvolvimento adicional de métodos para aplicações em doenças oculares e fornecer informações sobre a reversibilidade dos efeitos^{24,64,65,66}. Com relação ao BCOP, vários dos desafios encontrados em nosso estudo se conectam com os que vem sendo relatadas nas revisões dos guias internacionais para a realização do BCOP. Isso inclui altas taxas de falsos positivos para alguns grupos químicos e categorias de irritantes oculares, exigindo testes adicionais para classificação definitiva, detecção de reversibilidade e toxicidade sistêmica associada à exposição ocular. Revisões recentes do Guia Internacional apontam também a necessidade de

minimizar o intervalo entre a colheita e o uso das córneas no BCOP, geralmente realizando ambos no mesmo dia. Diante disso, em um contexto internacional, é provável que usuários do BCOP em outros países vivam algumas condições similares às descritas aqui, hipótese a ser confirmada apenas em futuros estudos.

CONCLUSÕES

A pesquisa revelou uma série de desafios enfrentados pelos laboratórios brasileiros na implementação de métodos alternativos para a avaliação de irritação ocular, com destaque para o BCOP. As principais dificuldades incluem: os altos custos de validação e importação de materiais, a necessidade de maior oferta de treinamentos, o deslocamento aos abatedouros e a pouca disponibilidade de globos oculares. Apesar dessas barreiras, a adoção de métodos alternativos é essencial para promover práticas mais éticas e sustentáveis na pesquisa toxicológica. A criação de políticas públicas que facilitem a importação de insumos, o fortalecimento das parcerias entre instituições de pesquisa e a oferta de financiamento adequado são passos fundamentais para superar essas dificuldades. Adicionalmente, a disseminação desses métodos em cursos de graduação e pós-graduação pode promover uma maior conscientização e adoção dessas práticas. Futuras ações na implantação do BCOP podem focar nas interações de importantes atores institucionais na produção de adaptações técnicas, produção de documentos e revisões dos guias atuais, e estudos que possam ampliar sua utilidade como método alternativo na avaliação de toxicidade ocular.

REFERÊNCIAS

1. Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos - Abihpec. Panorama do setor: a indústria de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos essencial para o Brasil. São Paulo: Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos; 2021[acesso 8 ago 2022]. Disponível em: https://abihpec.org.br/site2019/wp-content/uploads/2021/08/Panorama_do_Setor_Atualizado_Julho-Atualizado.pdf
2. Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos - Abihpec. Panorama do setor de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos. São Paulo: Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos; 2019[acesso 8 ago 2022]. Disponível em: <https://abihpec.org.br/publicacao/panorama-do-setor-2019-2/>
3. Grand View Research. Chitosan market size, share & trends analysis report by application (pharmaceutical, water treatment, cosmetics, biomedical, food & beverage), by region, and segment forecasts, 2023 - 2030. San Francisco: Grand View Research; 2022[acesso 7 out 2022]. Available from: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/global-chitosan-market>
4. Chorilli M, Scarpa MV, Leonardi GR, Franco YO. Toxicologia dos cosméticos. *Lat Am J Pharm.* 2007;26(1):144-54.
5. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução-RE Nº 475, de 9 de fevereiro de 2023. Adotar as medidas cautelares para ações de fiscalização em vigilância sanitária em pomadas para trançar, modelar ou fixar cabelos. *Diário Oficial União.* 10 fev 2023.
6. Organisation de Coopération et de Développement Économiques - OECD. Guidelines for the testing of chemicals, section 4: test Nº 405: acute eye irritation/corrosion. Paris: Organisation de Coopération et de Développement Économiques; 2021[acesso 30 jun 2023]. Disponível em: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-405-acute-eye-irritation-corrosion_9789264185333-en
7. Knight A. Review the three RS and the humanity criterion: an abridged version of the principles of humane experimental technique by W. M. S. Russell and R. L. Burch. *Balls Michael Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments Nottingham, England. J Anim Ethics.* 2012;2(1):107-9. <https://doi.org/10.5406/janimaethics.2.1.0107>
8. Brasil. Decreto Nº 6.899 de 15 de julho de 2009 Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal CONCEA, estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria-Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais - CIUCA, mediante a regulamentação da Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. *Diário Oficial União.* 16 jul 2009.



9. Brasil. Lei Nº 11.794 de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso 7º do paragrafo 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei Nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Diário Oficial União. 9 out 2008. 2008.
10. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (BR). Portaria Nº 4.556, de 15 de março de 2021. Cria a Rede Nacional de Métodos Alternativos ao Uso de Animais - RENAMA no âmbito do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações. Diário Oficial União. 17 mar 2021.
11. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (BR). Resolução normativa Nº 17 de 3 de julho de 2014. Dispõe sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. Diário Oficial União. 4 jul 2014.
12. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução RDC Nº 35, de 7 de agosto de 2015. Dispõe sobre a aceitação dos métodos alternativos de experimentação animal reconhecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Diário Oficial União. 10 ago 2015.
13. Organisation de Coopération et de Développement Économiques - OECD. OECD iLibrary. Paris: Organisation de Coopération et de Développement Économiques; 2023.
14. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (BR). Resolução normativa Nº 58, de 24 de fevereiro de 2023. Dispõe sobre a proibição do uso de animais vertebrados, exceto seres humanos, em pesquisa científica, desenvolvimento e controle de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes que utilizem em suas formulações ingredientes ou compostos com segurança e eficácia já comprovadas cientificamente e dá outras providências. Diário Oficial União. 25 fev 2023.
15. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (BR). Resolução normativa Nº 18, de 24 de set 2014. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil, nos termos da resolução normativa Nº 17, de 3 de julho de 2014, e dá outras providências. Diário Oficial União. 25 set 2014 .
16. Organisation de Coopération et de Développement Économiques - OECD. Guidelines for the testing of chemicals: test no. 437: bovine corneal opacity and permeability test method for identifying i) chemicals inducing serious eye damage and ii) chemicals not requiring classification for eye irritation or serious eye damage. Paris: Organisation de Coopération et de Développement Économiques; 2023[acesso 27 out 2023]. Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/9789264203846-en>
17. Organisation de Coopération et de Développement Économiques - OECD. Guidelines for the testing of chemicals: test no 438: isolated chicken eye test method for identifying: i) chemicals inducing serious eye damage and ii) chemicals not requiring classification for eye irritation or serious eye damage. Paris: Organisation de Coopération et de Développement Économiques; 2023[acesso 27 out 2023]. Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/9789264203860-en>
18. Organisation de Coopération et de Développement Économiques - OECD. Guidelines for the testing of chemicals: test no 460: fluorescein leakage test method for identifying ocular corrosives and severe irritants. Paris: Organisation de Coopération et de Développement Économiques; 2023[acesso 27 out 2023]. Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/9789264185401-en>
19. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (BR). Resolução normativa Nº 31, de 18 agosto de 2016. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. Diário Oficial União. 19 ago 2016
20. Organisation de Coopération et de Développement Économiques - OECD. Guidelines for the testing of chemicals: test no 491: short time exposure in vitro test method for identifying i) chemicals inducing serious eye damage and ii) chemicals not requiring classification for eye irritation or serious eye damage. Paris: Organisation de Coopération et de Développement Économiques; 2023[acesso 27 out 2023]. Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/9789264242432-en>
21. Organisation de Coopération et de Développement Économiques - OECD. Guidelines for the testing of chemicals: test no 492: reconstructed human cornea-like epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage. Paris: Organisation de Coopération et de Développement Économiques; 2023[acesso 27 out 2023]. Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/9789264242548-en>
22. Organisation de Coopération et de Développement Économiques - OECD. Guidelines for the testing of chemicals: test no 494: vitrigel-eye irritancy test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage. Paris: Organisation de Coopération et de Développement Économiques; 2021[acesso 27 out 2023]. Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/9f20068a-en>
23. Organisation de Coopération et de Développement Économiques - OECD. Guidelines for the testing of chemicals: test no 496: in vitro macromolecular test method for identifying chemicals inducing serious eye damage and chemicals not requiring classification for eye irritation or serious eye damage. Paris: Organisation de Coopération et de Développement Économiques; 2019[acesso 27 out 2023]. Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/970e5cd9-en>
24. Lee M, Hwang J-H, Lim K-M. Alternatives to in vivo draize rabbit eye and skin irritation tests with a focus on 3d reconstructed human cornea-like epithelium and epidermis models. Toxicol Res. 2017;33(3):191-203. <https://doi.org/10.5487/TR.2017.33.3.191>
25. Prinsen MK, Koëter HBWM. Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the draize eye irritation test with rabbits. Food Chem Toxicol. 1993;31(1):69-76. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(93\)90182-x](https://doi.org/10.1016/0278-6915(93)90182-x)



26. United Nations - UN. Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS). Vol. 1. New York: United Nations; 2011.
27. Organisation de Coopération et de Développement Économiques - OECD. Guidance document no 263 on integrated approaches to testing and assessment (IATA) for serious eye damage and eye irritation. series on testing and assessment. Paris: Organisation de Coopération et de Développement Économiques; 2019[acesso 27 out 2023]. Disponível em: [https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV-JM-MONO\(2017\)15/REV1&doclanguage=en](https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV-JM-MONO(2017)15/REV1&doclanguage=en)
28. Scott L, Eskes C, Hoffmann S, Adriaens E, Alepée N, Bufo M et al. A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol In Vitro*. 2010;24(1):1-9. [acesso 23 set 2024]. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.05.019>
29. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2012.
30. Van Rompay AR, Verstraelen S, Blaauboer BJ. CON4EI: Consortium for in vitro eye irritation testing strategy. *Toxicol In Vitro*. 2018;49:1. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.03.011>
31. Alépée N, Adriaens E, Abo T, Magby J, Mewes KR, Giusti A. Development of a defined approach for eye hazard identification of chemicals having surfactant properties according to the three UN GHS categories. *Toxicol In Vitro*. 2023;89:1-9. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2023.105576>
32. European Chemical Agency - ECHA. How to use new or revised in vitro test methods to address skin corrosion / irritation. Helsinki: European Chemical Agency; 2018.
33. OECD (2024), Test No. 467: Defined Approaches for Serious Eye Damage and Eye Irritation, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. [acesso 23 set 2024]. <https://doi.org/10.1787/28fe2841-en>.
34. Alépée N, Adriaens E. Development of a defined approach for eye hazard identification of solid chemicals according to the three UN GHS categories. *ALTEX*. 2024;41(3):457-468. [acesso 23/07/24]. doi: 10.14573/altex.2401191. Epub 2024 May 17. PMID: 38760936.
35. Garnett T. Meat and dairy production and consumption. Food Climate Research Network; 2007.
36. Ritchie H, Rosado P, Roser M. Environmental impacts of food production. *Our World Data*. 2022[acesso 19 set 2023]. Disponível em: <https://ourworldindata.org/environmental-impacts-of-food>
37. Verstraelen S, Maglennon G, Hollanders K, Boonen F, Adriaens E, Alépée N et al. Reprint of "CON4EI: bovine corneal opacity and permeability (BCOP) test for hazard identification and labelling of eye irritating chemicals". *Toxicol In Vitro*. 2018;49:53-64. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.03.005>
38. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução RDC Nº 390, de 26 de maio de 2020. Estabelece critérios, requisitos e procedimentos para o funcionamento, a habilitação na Reblas e o credenciamento de laboratórios analíticos que realizam análises em produtos sujeitos ao regime de vigilância sanitária e dá outras providências. Diário Oficial União. 27 maio 2020.
39. Souza VRS, Marziale MHP, Silva GTR, Nascimento PL. Tradução e validação para a língua portuguesa e avaliação do guia COREQ. *Acta Paul Enferm*. 2021;34:1-9. <https://doi.org/10.37689/acta-ape/2021A002631>
40. Tong A, Sainsbury P, Craig J. Consolidated criteria for reporting qualitative research (COREQ): a 32-item checklist for interviews and focus groups. *Int J Qual Health Care*. 2007;19(6):349-57. <https://doi.org/10.1093/intqhc/mzm042>
41. Timoteo MO, Batista BAC, Costa-Silva D, Granjeiro JM, Olej B, Alves GG. The impact of online management systems: a qualitative assessment of staff perception at a clinical research laboratory. *Res Soc Dev*. 2020;9(10):1-29. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i10.9188>
42. Orri M, Paduanello M, Lachal J, Falissard B, Sibeoni J, Revah-Levy A. Qualitative approach to attempted suicide by adolescents and young adults: the (neglected) role of revenge. *PLoS One*. 2014;9(5):1-8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096716>
43. Sofaer S. Qualitative research methods. *Int J Qual Heal Care*. 2002;14(4):329-36. <https://doi.org/10.1093/intqhc/14.4.329>
44. Gimenes I, Freitas RM, Alves GG, Pintor AVB. Empreender para inovar: oportunidades para atuação na ciência. *Rio Janeiro Dent J*. 2021;6(2):1-4. <https://doi.org/10.29327/244963.6.2-2>
45. Peña, Ignacio; Jenik M. Deep tech: the new wave. Washington: Inter-American Development Bank; 2023[acesso 19 set 2023]. Disponível em: <https://publications.iadb.org/en/deep-tech-new-wave>
46. Nundes RNC, Gonzalez MS. Refinar, reduzir e substituir na experimentação animal: por que devemos ensinar? In: Coelho FJF, editor. *Cadernos de ensino de ciências, saúde e Biotecnologia*. Jundiaí: Paco; 2018. p. 87-97.
47. De Vecchi R, Dakic V, Mattos G, Rigaudeau AS, Oliveira V, Garcia C et al. Implementation, availability and regulatory status of an OECD accepted Reconstructed Human Epidermis model in Brazil. *Vigil Sanit Debate*. 2018;6(1):1-8. <https://doi.org/10.22239/2317-269X.01055>
48. Organisation de Coopération et de Développement Économiques - OECD. Guidance document on the collection of eye tissues for histological evaluation and collection of data series on testing and assessment. Series on Testing and Assessment Nr 160. 2011[acesso 19 set 2023]. Disponível em: https://www.oecd.org/env/ehs/testing/RevisedGD160_Draft_v_21Dec2016_cleared.pdf
49. Flemons K, Baylis B, Khan AZ, Kirkpatrick AW, Whitehead K, Moeini S et al. The use of drones for the delivery of diagnostic test kits and medical supplies to remote first nations communities during Covid-19. *Am J Infect Control*. 2022;50(8):849-56. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2022.03.004>



50. Malamule D, Moreira S, Madeira C, Lutucuta C, Ailstock G, Maxim L et al. Quality analysis of tuberculosis specimens transported by drones versus ground transportation. *Drones*. 2022;6(7):1-10.
51. Fundação Oswaldo Cruz. Scilog: logística 4.0 da saúde através de veículos autônomos. Ágora Solução de Serviço. [s.d.].
52. Wang X, Shakeel A, Salih AE, Vurivi H, Daoud S, Desidery L et al. A scalable corneal xenograft platform: simultaneous opportunities for tissue engineering and circular economic sustainability by repurposing slaughterhouse waste. *Front Bioeng Biotechnol*. 2023;11:1-10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1133122>
53. Limeneh DY, Tesfaye T, Ayele M, Husien NM, Ferede E, Haile A et al. A comprehensive review on utilization of slaughterhouse by-product: current status and prospect. *Sustainability*. 2022;14(11):1-20. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/su14116469>
54. Ware A, Power N. Biogas from cattle slaughterhouse waste: energy recovery towards an energy self-sufficient industry in Ireland. *Renew Energy*. 2016;97:541-9. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.05.068>
55. Chakraborty R, Gupta AK, Chowdhury R. Conversion of slaughterhouse and poultry farm animal fats and wastes to biodiesel: parametric sensitivity and fuel quality assessment. *Renew Sustain Energy Rev*. 2014;29:120-34. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.08.082>
56. Tarafdar A, Gaur VK, Rawat N, Wankhade PR, Gaur GK, Awasthi MK et al. Advances in biomaterial production from animal derived waste. *Bioengineered*. 2021;12(1):8247-58. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1982321>
57. Associação Brasileira de Reciclagem e Animal - ABRA. Anuário ABRA: setor de reciclagem animal. Brasília: Associação Brasileira de Reciclagem e Animal; 2021.
58. Khan RL, Khraibi AA, Dumée LF, Corridon PR. From waste to wealth: repurposing slaughterhouse waste for xenotransplantation. *Front Bioeng Biotechnol*. 2023;11:1-17. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1091554>
59. Maurer JK, Parker RD, Jester J V. Extent of initial corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2002;36(1):106-17. <https://doi.org/10.1006/rtph.2002.1551>
60. Institute for In Vitro Sciences. Guidelines for Histopathological Evaluation of Bovine Corneas As an Endpoint of the Bovine Corneal Opacity and Permeability (Bcop) Assay. Gaithersburg: Institute for In Vitro Sciences; 2016.
61. Jeong MK, Kim B-H. Grading criteria of histopathological evaluation in BCOP assay by various staining methods. *Toxicol Res*. 2022;38(1):9-17. <https://doi.org/10.1007/s43188-021-00099-w>
62. Pedro DA. Métodos alternativos ao uso de animais em ensino e pesquisa: evolução e panorama atual do Brasil. *Encicl Bio*. 2021;18(37):334-48.
63. Brasil. Lei nº 13.243, de 11 de janeiro de 2016. Dispõe sobre estímulos ao desenvolvimento científico, à pesquisa, à capacitação científica e tecnológica e à inovação e altera a Lei nº 10.973, de 2 de dezembro de 2004, a Lei nº 6.815, de 19 de agosto de 1980, a Lei nº 8.666, de 21 de junho de 1993, a Lei nº 12.462, de 4 de agosto de 2011, a Lei nº 8.745, de 9 de dezembro de 1993, a Lei nº 8.958, de 20 de dezembro de 1994, a Lei nº 8.010, de 29 de março de 1990, a Lei nº 8.032, de 12 de abril de 1990, e a Lei nº 12.772, de 28 de dezembro de 2012, nos termos da Emenda Constitucional nº 85, de 26 de fevereiro de 2015. *Diário Oficial União*. 12 jan 2016.
64. Clippinger AJ, Raabe HA, Allen DG, Chosky NY, van der Zalm AJ, Kleinstreuer NC et al. Human-relevant approaches to assess eye corrosion/irritation potential of agrochemical formulations. *Cut Ocular Toxicol*. 2021;40(2):145-67. <https://doi.org/10.1080/15569527.2021.1910291>
65. Araujo Lowndes Viera LM, Silva RS, da Silva CC, Presgrave OAF, Boas MHSV. Comparison of the different protocols of the Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) by evaluating the eye irritation potential of surfactants. *Toxicol In Vitro*. 2022;78. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105255>
66. Kaluzhny Y, Klausner M. In vitro reconstructed 3D corneal tissue models for ocular toxicology and ophthalmic drug development. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2021;57(2):207-37. <https://doi.org/10.1007/s11626-020-00533-7>

Agradecimentos

Os autores agradecem ao apoio financeiro do Inova Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq-Brasil), do qual Gutemberg Gomes Alves é bolsista produtividade em pesquisa 2.

Contribuição dos Autores

Presgrave OAF, Gonzalez MS, Alves GG - Concepção, planejamento (desenho do estudo). Gimenes I - Aquisição, análise, interpretação dos dados e redação do trabalho. Todos os autores aprovaram a versão final do trabalho.

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Licença CC BY. Com essa licença os artigos são de acesso aberto que permite o uso irrestrito, a distribuição e reprodução em qualquer meio desde que o artigo original seja devidamente citado.