

USO DA INFORMAÇÃO DE PATENTES PARA ESTUDO DOS MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE *IN VITRO* COMO ALTERNATIVA AO USO DE ANIMAIS

Ana Paula Gomes Braga de Azevedo¹; Luciana Goulart de Oliveira¹; Ricardo Carvalho Rodrigues²; Isabel Moniz Aragão de Lemos Loureiro¹; Roberto Becht Flatschart¹

¹INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. (apazevedo@inmetro.gov.br)

²INPI, Instituto Nacional de Propriedade Industrial.

Rec.: 04.07.2014. Ace.: 12.03.2015

RESUMO

Esse estudo tem como objetivo o levantamento e análise dos pedidos de patente depositados em âmbito mundial sobre métodos de ensaios para avaliação da citotoxicidade *in vitro*, visando o apoio à Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA) e o fornecimento de subsídios às pesquisas desenvolvidas no INMETRO. Os resultados obtidos revelaram que o interesse em proteger tecnologias relativas aos métodos de avaliação de citotoxicidade *in vitro* concentrou-se, principalmente, em países possuidores de avançados centros de validação de métodos alternativos como EUA, países da União Europeia e Japão, intensificando-se a partir dos anos 2000 de forma crescente o interesse em proteger tais métodos. Entre os métodos encontrados destacaram-se os relacionados ao emprego de técnicas de biologia molecular e cultura celular.

Palavras chave: Citotoxicidade. RENAMA. Patente. Métodos alternativos.

ABSTRACT

This study objectives to collect and analyze all the patent applications filed worldwide concerning assay methods to evaluate cytotoxicity *in vitro*, aiming to support the National Network of Alternative Methods (RENAMA) and providing subsidies for researches developed at INMETRO. The results obtained revealed that the interest in protecting technologies related to these methods was concentrated, mainly, in countries possessing developed validation centers of alternative methods, like United States, some European countries and Japan, which were intensified from 2000 on, with a growing interest in protecting these methods. Among the methods found most important were those related to employment of technics of molecular biology and cell culture.

Keywords: Cytotoxicity. RENAMA. Patents. Alternative methods.

Áreas tecnológicas: Propriedade Industrial; Políticas Públicas.

INTRODUÇÃO

Desde a Grécia Antiga animais são utilizados por pesquisadores para um melhor entendimento do funcionamento de órgãos e sistemas do corpo humano e aprimoramento de técnicas cirúrgicas. Com a ascensão da ciência médica, a partir do século XIX e o desenvolvimento da química sintética a partir da década de 1920, o campo da toxicologia cresceu em resposta à necessidade de se estudar os efeitos adversos potenciais de novos medicamentos, aditivos alimentares, pesticidas e outras substâncias (RENAMA, 2012).

Com o crescimento do uso de animais, surgiram no final da década de 1950 os primeiros movimentos para proteção dos animais utilizados em experimentação. A publicação do livro “The Principles of Human Experimental Technique”, dos pesquisadores William Russel e Rex Burch, representou um marco na discussão do uso de animais para a avaliação da toxicidade de substâncias e materiais. A partir de então foi estabelecido o princípio dos 3R (Reduction, Refinement, Replacement – em português, Redução, Refinamento, Substituição) tendo como objetivos centrais a diminuição do uso dos animais e, quando não fosse possível, ao menos de seu sofrimento. Tais princípios nortearam a busca por alternativas cientificamente válidas para os testes feitos em animais, uma vez que estudos posteriores também comprovaram a existência de diferenças teciduais e metabólicas entre humanos e animais, tornando evidente a necessidade de modelos *in vitro* apropriados (RENAMA, 2012). Algumas vantagens conhecidas dos ensaios *in vitro* são maior reprodutibilidade, períodos de testes mais curtos, em geral menor custo e maior facilidade de controle dos experimentos (CHIARI et al., 2012; SEHNEM et al., 2012).

No entanto, foi apenas em meados da década de 1970 que a pressão contra o uso de animais repercutiu no âmbito da regulamentação. Em 27 de julho de 1976 foi publicada a Diretiva Europeia nº 76/768/CEE, também chamada de “Diretiva de Cosméticos”, a principal legislação relacionada a produtos cosméticos, considerada um dos marcos regulatórios para o uso de métodos alternativos para avaliação da toxicidade de substâncias (SEHNEM et al., 2012; RENAMA, 2012).

Na década seguinte, em 24 de novembro de 1986, a Comunidade Europeia (CE) publicou a Diretiva nº 86/609/EC de bem estar animal (*Animal Welfare Guideline*), uma política declarada das instituições da CE para estimular e desenvolver o uso de métodos alternativos ao uso de animais. A Diretiva estabelece como “métodos alternativos” quaisquer procedimentos que substituam, reduzam ou refinem o uso de animais na pesquisa biomédica, ensaios ou ensino (implementação dos 3Rs), de modo que “uma experiência não poderá ser executada em animal se um outro método cientificamente satisfatório que não implique a utilização de um animal, seja razoável e praticamente possível”. Ensaios em animais, quando necessários, só podem ser realizados mediante a comprovação de segurança e eficácia em modelos *in vitro*, diretiva que diminui tanto o número de animais utilizados quanto seu sofrimento. (COMUNIDADE EUROPEIA, 1986; ROGERO et al., 2003; SEHNEM et al., 2012).

No Brasil, a Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, regulamentada pelo Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, também conhecida como Lei Arouca, tem como objetivo principal zelar pela ética na utilização de animais em pesquisa e ensino. Esta lei criou o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), entidade responsável por credenciar instituições que utilizam animais em seus trabalhos, publicar normas sobre o assunto, bem como monitorar e avaliar a introdução de métodos alternativos que substituam o uso de animais no ensino e na experimentação no país (BRASIL, 2008; BRASIL 2009; SEHNEM et al., 2012).

O processo de validação de métodos alternativos ao uso de animais no Brasil ainda não está plenamente definido. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a Resolução nº 899, em 29 de maio de 2003, estabelecendo um “Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos”, que, no entanto, é limitado, de maneira específica, a ensaios físico-químicos. Enquanto isso, países como os EUA e Japão, que possuem centros avançados de validação de

ensaios, bem como países da Comunidade Europeia e outros membros da OECD (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico) adotam métodos alternativos ao uso de animais com fins regulatórios (BRASIL, 2003; SEHNEM et al., 2012).

A Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA), instituída pela Portaria nº 491, de 03 de julho de 2012, do Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) vem atender a essa tendência mundial, ao preconizar a adoção dos princípios dos 3R e estimular o estabelecimento de infraestrutura laboratorial e de recursos humanos especializados capazes de implantar métodos alternativos aos testes com animais, além de desenvolver e validar novos métodos no Brasil (BRASIL, 2012).

A RENAMA é composta por duas categorias de laboratórios: os laboratórios centrais e os laboratórios associados. O Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro), o Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde (INCQS) e o Laboratório de Biociências (LNBio) atuam como laboratórios Centrais da RENAMA, sob a coordenação do MCTI (RENAMA, 2012). Já os Laboratórios Associados à RENAMA, públicos ou privados, que possuem reconhecida competência na realização e desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais de experimentação, têm a função de contribuir para a disseminação e desenvolvimento dos métodos alternativos, bem como a de constituir a infraestrutura de ensaio de métodos alternativos do país.

Dentre os métodos alternativos mais importantes estão os ensaios de citotoxicidade. Estes ensaios avaliam os efeitos tóxicos do agente testado às funções celulares basais, fazendo parte do primeiro nível de testes para avaliar a biocompatibilidade de materiais e substâncias, requisito obrigatório para considerar um produto seguro (ISO, 2009; ROGERO et al., 2003). Os ensaios de citotoxicidade possibilitam a avaliação do potencial toxicológico *in vitro* do produto quando em contato com a célula, indicando se o produto deve ser descartado ou objeto de estudos posteriores.

Face às considerações anteriores, propõe-se, neste estudo, uma análise quantitativa e qualitativa dos pedidos de patente depositados em âmbito mundial sobre métodos de ensaios para avaliação da citotoxicidade *in vitro* como alternativa ao uso de animais. Este estudo, fruto da cooperação estabelecida entre o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) e o Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), objetiva precipuamente apoiar a RENAMA, fornecendo subsídios às pesquisas relacionadas à Metrologia em Ciências da Vida.

METODOLOGIA

A metodologia utilizada para atingir os objetivos do presente trabalho consistiu em duas etapas, a saber: busca e recuperação de pedidos de patente e, em seguida, tratamento e análise dos dados. A primeira etapa, relativa à busca e recuperação de pedidos de patente, envolveu ainda a escolha da base de patentes e a elaboração da estratégia de busca.

A escolha da base de patentes levou em consideração o objetivo do estudo que, por visar conhecer os interesses da indústria mundial na busca por proteção de patentes para novas tecnologias envolvendo métodos alternativos de avaliação de citotoxicidade *in vitro*, recaiu na base de patentes Derwent World Patents Index[®] - DWPISM (DWPI, 2013). A base Derwent World Patents Index - DWPISM é disponibilizada pelo banco de dados Dialog[®] que contém mais de 15 *terabytes* de informações provenientes dos mais renomados editores do mundo em 900 bases de dados abrangendo artigos técnicos, notícias, conferências e a maior coleção de bases de patentes, permitindo o acesso à informação de mais de 42,5 milhões de documentos de patentes depositados mundialmente. Especialistas reescrevem os títulos e resumos dos pedidos de patente, o que permite o aperfeiçoamento na recuperação dos pedidos de patente por meio da utilização de palavras-chave nas estratégias de busca.

A estratégia de busca foi elaborada a partir do estudo dos termos a serem utilizados como palavras-chave, por meio da leitura de artigos científicos, de alguns documentos de patentes nacionais e estrangeiros e de publicações em livros e outros materiais para conhecimento dos termos técnicos e de tecnologias empregadas. Os termos selecionados para recuperar os documentos de patente foram “toxic?”, “cytotoxic?”, “phototoxic?”, “neurotoxic?”, “nephrotoxic?”, “ecotoxic?”, “genotoxic?”, “hematotoxic?”, immunotoxic?, “embryotoxic?”, em combinação com as palavras “in vitro”, “in glass”, “ex vivo”, “explant” ou “non animal”. O sinal de interrogação (“?”) inserido ao final dos radicais selecionados representa o truncamento realizado pela base de patente. Esse recurso permite que sejam recuperadas todas as derivações do radical selecionado incluindo as variações de escrita e a forma plural da palavra. As palavras-chave da estratégia de busca foram pesquisadas nos títulos, resumos e, ainda, nos títulos e resumos reescritos, (quando existentes), dos pedidos de patente indexados na base consultada.

Todos os subgrupos que compõem o grupo G01N33 da Classificação Internacional de Patentes (CIP) foram utilizados para fins de refino da busca. Estes conjuntos de classificações representam tecnologias de investigação ou análise de materiais por métodos específicos. Para escolha e uso de todos esses subgrupos utilizou-se o recurso de truncamento mencionado anteriormente, ou seja, durante a execução da busca colocou-se o sinal de interrogação ao final do subgrupo (G01N33?).

Cabe ressaltar que não foi imposta restrição temporal à busca dos documentos de patentes. As etapas de busca e recuperação desses documentos foram realizadas em janeiro de 2013.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A recuperação dos documentos de patente relacionados aos métodos de avaliação de citotoxicidade foi realizada em 5 etapas distintas e seus resultados encontram-se listados na Tabela 1. Ao final de todas as combinações realizadas, ou seja, das 5 etapas de busca incluindo o refino com a classificação internacional obtivemos 2.245 famílias de patentes.

A Tabela 1 apresenta os resultados parciais relativos à estratégia de busca realizada.

Tabela 1 - Resultados parciais relativos à estratégia de busca realizada

Busca	Estratégia	Famílias de Patentes
1	“toxic?” or “cytotoxic?” or “phototoxic?” or “neurotoxic?” or “nephrotoxic?” or “ecotoxic?” or “genotoxic?” or “hematotoxic?” or “immunotoxic?” or “embryotoxic?”	197.186
2	“in vitro” or “in glass” or “ex vivo” or “explant” or “non animal”	87.967
3	Busca 1 AND Busca 2	10.338
4	G01N033?	205.401
5	Busca 4 AND Busca 5	2.245

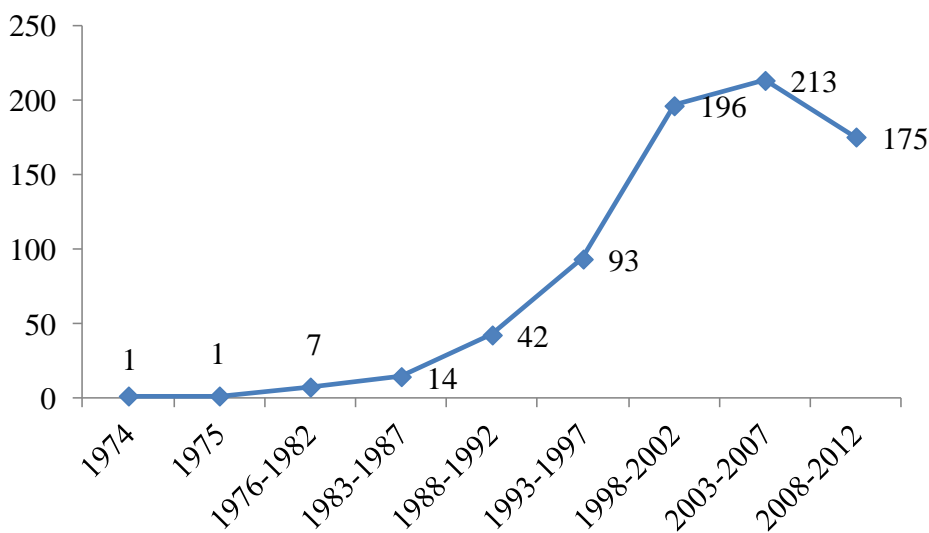
Fonte: Autoria própria, 2015.

Após as etapas de busca procedeu-se, então, à triagem manual desse conjunto para a identificação dos documentos de patente que apresentassem tecnologias aplicáveis ao objetivo do estudo. Essa triagem foi realizada a partir da leitura dos títulos e resumos de todos os 2.245 documentos. Ao final da análise qualitativa foi selecionado um conjunto de 745 famílias de patente de interesse à pesquisa.

A evolução dos pedidos de patente (representativos de cada família de patente) pela data de prioridade estão representados na Figura 1. A análise do Gráfico 1, sugere que o interesse pela proteção da tecnologia pode ter iniciado em meados da década de 70, motivado provavelmente pelo surgimento das primeiras regulamentações nesta mesma década na Europa. A partir de então, houve aumento dos pedidos de proteção por patentes para este tipo de tecnologia, sobretudo a partir do fim dos anos 90, devido, principalmente, a crescente preocupação com a substituição de animais em ensaios de toxicidade, sobretudo para cosméticos (COMUNIDADE EUROPEIA, 1986; RENAMA, 2012; SEHNEM et al., 2012).

A redução observada no número de depósitos de patentes entre 2008 e 2012 provavelmente não reflete uma diminuição real no número de depósitos. Como a busca dos documentos foi realizada no início do ano de 2013, documentos em período de sigilo não foram indexados na base de patentes, constituindo o que chamamos de efeito de borda.

Figura 1 - Evolução dos pedidos de patente pela data de prioridade



Fonte: Autoria própria, 2015.

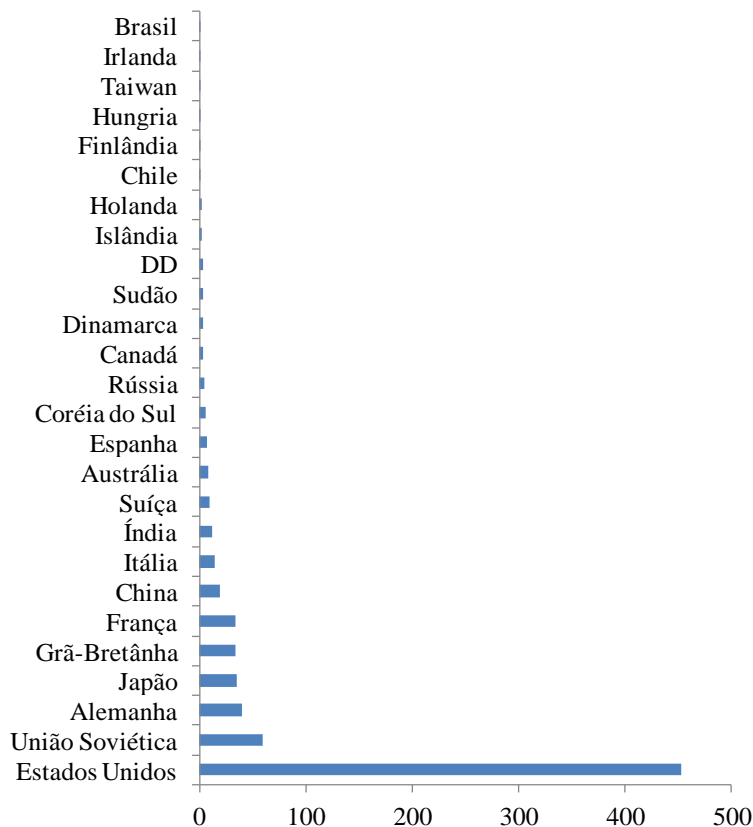
Entre as 745 famílias de pedidos de patente selecionados na análise qualitativa, 453 citam como o país e/ou escritório de patentes prioritário para o depósito os Estados Unidos da América (US), seguido do Escritório Europeu (EP), Alemanha (DE), Japão (JP), Reino Unido (GB) e França (FR), conforme mostra a Figura 2. No universo de documentos analisados, Brasil aparece como país prioritário em apenas 1 pedido de patente, cujo titular é a Universidade Federal de Minas Gerais.

Segundo Sehnem *et al.* (2012) é nos EUA, União Europeia e Japão que funcionam centros avançados de validação de ensaios de métodos com o propósito de atender requisitos regulatórios referentes à substituição do uso de animais. Essa é a possível razão do interesse de proteção da tecnologia nesses países, uma vez que o país de prioridade, em geral, está relacionado ao interesse geográfico de proteção da tecnologia.

A análise dos 745 documentos representativos de cada família de patente revela que 91% dos seus depositantes possuem apenas 1 pedido de patente, 8% depositaram 2 a 4 pedidos de patentes e apenas 1% depositou mais de 5 pedidos. Esses dados sugerem que esta seja uma área tecnológica dispersa, preponderando depositantes isolados, o que provavelmente está relacionado ao interesse pulverizado em se desenvolver ou aprimorar métodos de ensaios de citotoxicidade *in vitro*.

Nas seções a seguir são analisados os documentos de patente representativos de cada família de patente para os depositantes mais expressivos entre as 745 famílias estudadas.

Figura 2 - Número de depósito de patentes pelo país de prioridade



Fonte: Autoria própria, 2015.

A análise das instituições depositantes de 5 ou mais pedidos de patentes relacionadas ao tema mostrou que essas instituições estão situadas em três países: Estados Unidos, França e Israel, o que sugere uma possível concentração de pesquisa e desenvolvimento (P&D) desta tecnologia em instituições desses países. Conforme podemos ver na Tabela 2, a Universidade da Califórnia (US) lidera o ranking, seguida pelo Inst. Nat. Sante Rech. Med. (FR) e pelo Yissum Res. Dev. Co., empresa de P&D da Universidade Hebraica de Jerusalém.

A análise dos quadros reivindicatórios dos pedidos de patentes das instituições com 5 ou mais pedidos de patentes depositados, considerando apenas 1 documento por família de patente, revelou que somente 16% continham um método de ensaio de citotoxicidade como objeto de proteção no quadro reivindicatório.

Tabela 2 - Maiores depositantes de pedidos de patente (com 5 ou mais pedidos depositados)

Depositantes	País	Nº de Patentes
Univ California	US	11
Inst Nat Sante Rech Med	FR	9

Tabela 2 - Maiores depositantes de pedidos de patente (com 5 ou mais pedidos depositados)

Depositantes	País	Nº de Patentes
Yissum Res Dev Co	IL	8
Centre Nat Rech Scient	FR	7
Harvard College	US	7
Massachusetts Inst Technology	US	7
Precision Therapeutics Inc	US	7
Castle Arthur	US	6
Porter Mark	US	6
Elashoff Michael	US	6
Gene Logic Inc	US	6
Mendrick Donna	US	6
Johnson Kory	US	6
Geron Corp	US	6
Univ John Hopkins	US	6
Cornell Res Foundation Inc	US	5
Hepahope Inc	US	5
Higgs Brandon	US	5
Roussy Inst Gustave	FR	5
Scripps Research Inst	US	5
Univ Leland Stanford Junior	US	5

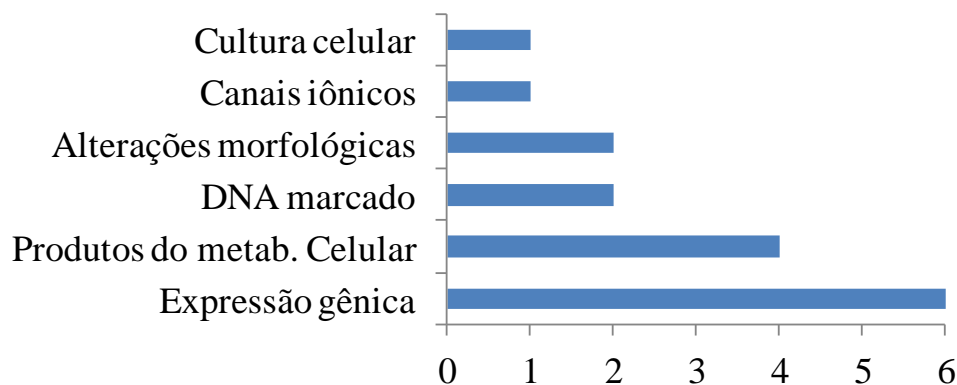
Fonte: Aatoria própria, 2015.

Os métodos de ensaios de citotoxicidade reivindicados nos pedidos de patente analisados são apresentados na Figura 3. Dentre as metodologias reivindicadas, as que envolvem ensaios com expressão gênica são os mais citados (37,5%), seguidos daqueles que quantificam substâncias do metabolismo celular (25%).

Foram citados também métodos para marcação de DNA, quantificação de alterações morfológicas, atividade de canais iônicos e cultura celular. Esses métodos tiveram, em sua maioria, grande desenvolvimento no início dos anos 2000 e são métodos quantitativos que, segundo a norma ISO 10993-5 (Biological Evaluation of Medical Devices Part 5: Tests for Cytotoxicity: *in vitro* methods), devem ser preferencialmente utilizados nesse tipo de ensaio.

A análise temporal dos pedidos indica que a maioria dos depósitos efetuados pelos principais depositantes, tendo escopo de proteção os métodos para ensaios de citotoxicidade *in vitro*, ocorreu a partir dos anos 2000, período em que houve grande avanço científico das técnicas de biologia molecular e cultura celular.

Figura 3 - Métodos de ensaios citotoxicidade reivindicados



Fonte: Autoria própria, 2015.

CONCLUSÃO

É crescente a preocupação mundial em se minimizar o uso de animais em testes de citotoxicidade de drogas, cosméticos e outras substâncias, substituindo-os por ensaios *in vitro*.

Os primeiros movimentos regulatórios nesse sentido surgiram nos anos 70, quase ao mesmo tempo do interesse em se proteger tecnologias com esse propósito, e se intensificaram no início dos anos 2000. Países com importantes centros de validação de métodos *in vitro* como EUA, países da União Europeia e Japão, são desde então, locais com prioridade de depósitos de patentes desse tipo de tecnologia.

A introdução e o grande desenvolvimento de técnicas de biologia molecular e de cultura celular no período se refletiram na metodologia de ensaios de citotoxicidade reivindicados nos documentos patentários das instituições com mais depósitos sobre o tema no mundo, considerando-se o universo de documentos analisado.

Os resultados apresentados neste estudo, bem como todos aqueles que decorrerão de trabalhos futuros empregando abordagem semelhante sobre o tema, são de grande relevância para as instituições participantes da RENAMA, os usuários de seus serviços e, por extensão, a sociedade. Tais informações direcionam a fundamentação de decisões metodológicas com base em informações confiáveis e não tendenciosas provenientes de documentos de patentes.

PERSPECTIVAS

A busca por métodos alternativos ao uso de animais em testes de substâncias tende a crescer, uma vez que diversos países têm aprovado regulamentações nesse sentido.

No Brasil, com a aprovação da Portaria Normativa nº18, de 24 de setembro de 2014, as instituições que realizam pesquisas com animais têm até 5 anos para substituir o método original pelo alternativo quando possível, desde que o método esteja validado e reconhecido internacionalmente (MCTI, 2014).

Desta forma, estudos semelhantes a este serão necessários para fundamentar a validação de novos métodos alternativos ao uso de animais em todo o mundo.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Poder Executivo, Brasília, DF, 02 jun. 2003, Seção 1, p.79.

BRASIL. Decreto nº 6899, de 15 de julho de 2009. Dispõe que a criação e utilização de animais de laboratório ficam restritas ao âmbito de entidades de direito público ou privado. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Poder Executivo, Brasília, DF, 16 jul. 2009, Seção 1, p.2.

BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Dispõe zelar pela ética na utilização de animais em pesquisa e experimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Poder Executivo, Brasília, DF, 09 out. 2008, Seção 1, p.1-2.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI. Portaria normativa nº18, de 28 de setembro de 24 de setembro de 2014. Reconhece métodos alternativos em pesquisas no Brasil e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Poder Executivo, Brasília, DF, 25 set. 2014, Seção 1, p.9.

BRASIL. Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI. Portaria nº 491, de 3 de julho de 2012. Institui a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Poder Executivo, Brasília, DF, 5 jul. 2012. Seção 1, p.19.

CHIARI, B. G.; MAGNANI, C.; SALGADO, H. R. N.; CORRÊA, M. A.; ISAAC, V. L. B. Estudo da segurança de cosméticos: presente e futuro. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 3, p. 323-330, 2012.

COMUNIDADE EUROPEIA (CE). Diretriz 86/609/EC, Animal Welfare Guideline. 1986. Disponível em: <<http://renama.org.br/2012/09/metodos-alternativos/>>. Acesso em: 26 jun. 2014.

DIALOG PROQUEST®, MEGASEARCH BRASIL®, 2013. Disponível em <<http://www.dialogbr.com.br/>>. Acesso em: 26 jun. 2014.

DWPI. Derwent World Patents Index®. Dialog Proquest®, MegaSearch Brasil®, 2013. Disponível em: <<http://library.dialog.com/bluesheets/html/bl0351.html>>. Acesso em: 26 jun. 2014.

EPOQUE FACT SHEET. Epodoc References to the bibliographic and abstract data of the patent documentation of the European Patent Office. February, 2013. Disponível em: <<https://epoxy.epo.org/files/epoque/factsheets/epodocfs.pdf>>. Acesso em: 26 jun. 2014.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION (ISO). Biological Evaluation of Medical Devices Part 5: Tests for Cytotoxicity: *in vitro* methods. EN ISO 10993-5, Brussels, 2009.

RENAMA. Rede Nacional de Métodos Alternativos, 2012. Disponível em: <<http://renama.org.br>>. Acesso em: 26 jun 2014.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

SEHNEM, D. P.; BENAMOR, L.; JESUS, L. S.; VALENTIM, R. M.; SOUZA, E. T. G.; ZAMBUZZI, W. F.; TAKAMORI, E. R. Métodos alternativos para avaliação da citotoxicidade de biomateriais. **Revista Rede de Cuidados em Saúde**, v. 6, n. 2, 2012.