

A Alternativas para Animais de Laboratório: do animal ao computador

Octavio Augusto França Presgrave

INTRODUÇÃO

Embora as manifestações em defesa dos animais de laboratório e contra sua utilização em experimentos tenham crescido nos últimos anos e tomado mais espaço na mídia, essa idéia é muito mais antiga do que se imagina. Em 1760, Fergusson já demonstrava preocupação com os métodos bárbaros em testes animais. No século XIX, Jeremy Bentham lançou a máxima “a questão não é se os animais raciocinam, ou se eles podem falar, mas se eles sofrem”.

A primeira tentativa de propor um código de ética na prática da pesquisa partiu do inglês Marshall Hall, também no século XIX. Nesse código, ele propôs que a dor imposta aos animais fosse diminuída, além de fazer alusão à substituição dos grandes animais por animais inferiores na escala zoológica. Também fazia referência à necessidade de se evitar repetições desnecessárias para a obtenção de resultados.

Em 1842, foi fundada o que podemos chamar de primeira sociedade protetora dos animais, a British Society for the Prevention of Cruelty to Animals (Sociedade Britânica para a Prevenção da Crueldade aos Animais), mais tarde chamada de Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals. Mas foi em 1959, com a publicação do livro *Principles of Humane Experimental Technique* (Princípios da Técnica Experimental Humana), que Russel e Burch lançaram o conceito dos 3Rs – *Replacement, Reduction and Refinement* (Substituição, Redução e Refinamento). Cabe ressaltar que, sem desmerecer o trabalho desses dois cientistas, tais idéias já estavam contidas na idéia do código proposto por Hall. Russel e Burch, certamente, clarificaram esses conceitos de forma que os mesmos se tornaram mais populares e disseminados no meio científico.

Em 1978, defensores europeus dos direitos dos animais iniciaram a campanha para a retirada do método de irritação ocular em produtos cosméticos. Esse método foi descrito por Draize, em 1944, e sofreu diversas alterações ao longo dos anos; entretanto, continua sendo utilizado oficialmente por diversos órgãos oficiais, bem como pelas indústrias no desenvolvimento de novas fórmulas de forma a avaliar a segurança de seus produtos.

EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Antes de falarmos sobre as alternativas, vale a pena recordar alguns conceitos sobre a experimentação animal, que auxiliam, até certo modo, na compreensão e estruturação de uma metodologia alternativa.

As metodologias farmacológica e toxicológica (a experimentação animal, propriamente dita) se baseiam na observação dos efeitos de substâncias sobre organismos vivos, para a qual o experimentador se vale de técnicas fisiológicas ou bioquímicas. Por meio dessas observações, podem ser obtidos dados qualitativos ou quantitativos sobre a ação de medicamentos ou substâncias.

De forma geral, qualquer animal pode ser utilizado em experimentação; entretanto, procura-se um modelo específico para cada ação estudada. Como exemplo, podemos citar o uso do gato para estudos do sistema circulatório, a utilização do cão como modelo para estudo geniturinário e os pequenos roedores, para avaliações do sistema respiratório, entre outros.

A experimentação animal já constava descrita no *Corpus Hipocraticum* (c. 350 a.C.). Nele eram citados experimentos com porcos. Muitos outros fatos tiveram importante contribuição para o desenvolvimento dos ensaios biológicos. Entre os quais, podemos destacar a padronização da antitoxina diftérica por Erlich (fim do século XIX), a padronização da insulina (década de 20) e a mudança no conceito de unidade, com a introdução da preparação-padrão.

Outro fato importante, que muito contribui para o refinamento dos experimentos, é a introdução de métodos estatísticos, os quais fizeram com que se estabelecesse o nível de significância de um resultado, o que permitiu a extrapolação de dados de uma pequena amostra para uma população, indicando, ainda, a probabilidade de ocorrência desse fenômeno.

Tais fatos, em conjunto com outros, contribuíram e continuam contribuindo para a racionalização no uso de animais de laboratório.

Independentemente de estarmos trabalhando com animais ou células, a estrutura de um ensaio biológico se baseia em três pilares fundamentais: o estímulo, o substrato e a resposta.

O estímulo é a substância ou o produto que será administrado ao substrato, seja ele um animal, seja uma célula. Esse conjunto irá fornecer a resposta que pode ser, por exemplo, aumento de pressão arterial ou morte celular.

MÉTODOS ALTERNATIVOS

Métodos alternativos são procedimentos que podem substituir o uso de animais em experimentos, reduzir o número de animais necessários, ou refinar a metodologia de forma a diminuir a dor ou o desconforto sofrido pelos animais.

São alguns exemplos de substituição no uso de animais:

USO DE INFORMAÇÃO OBTIDA NO PASSADO – em virtude da coleta de dados históricos em experimentação animal ou mesmo de ocorrências em seres humanos, determinados experimentos podem não ter necessidade de serem repetidos.

USO DE TÉCNICAS FÍSICO-QUÍMICAS – com o aumento do conhecimento na área química, bem como por meio do desenvolvimento de métodos e equipamentos sofisticados, algumas substâncias que só antigamente poderiam ser testadas em animais podem ser ensaiadas por métodos químicos ou físico-químicos. Um dos exemplos a citar refere-se ao ensaio de potência de insulina. Anteriormente, três métodos eram utilizados: glicemia em camundongos, glicemia em coelhos ou convulsão em camundongos. Hoje em dia, para produtos acabados (para matéria-prima ainda se utiliza um dos métodos em animais), já se pode utilizar a determinação da potência por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Resolução).

USO DE MODELOS MATEMÁTICOS OU COMPUTACIONAIS – recurso em que se utiliza um banco de dados que pode prever determinadas ações de substâncias no organismo. O banco é formado por meio de informações obtidas no passado. Esse assunto será melhor abordado no item Sistemas Técnicos para a Predição de Toxicidade.

USO DE ORGANISMOS INFERIORES NÃO CLASSIFICADOS COMO ANIMAIS PROTEGIDOS – não deixa de ser algo polêmico, pois, quando pensamos sobre o prisma ético, ser vivo é ser vivo em qualquer situação, não importando se ele é um inseto ou um macaco. Entretanto, a utilização de larvas de camarão (*Artemia salina*)

ou o uso de pulga d'água (*Daphnia pulex*) são considerados como possibilidades de substituição ao uso de animais de laboratório. Em geral, esses invertebrados são muito utilizados em experimentos de ecotoxicologia, mas alguns trabalhos apresentam a sua utilização como proposta de alternativas ao teste de irritação em coelhos.

USO DE ESTÁGIOS INICIAIS DO DESENVOLVIMENTO DE ESPÉCIES ANIMAIS PROTEGIDAS – é o caso, por exemplo, do teste da HET-CAM (membrana córneo-alantóide de ovo de galinha embrionado), no qual se utiliza o ovo embrionado aos 9 dias, tempo este em que não há o desenvolvimento do sistema nervoso do embrião, o que, teoricamente, não causaria a ele dor ou sofrimento. Tal ensaio tem sido apontado como um bom substituto ao teste de irritação ocular em coelhos.

USO DE SISTEMAS *IN VITRO* – o sistema *in vitro*, como veremos adiante, pode ser considerado como uma substituição total ou parcial, sendo algumas vezes também classificado como uma redução.

VIGILÂNCIA PÓS-MERCADO E ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS – os dados obtidos nessas situações irão compor o conjunto de informações, que poderão subsidiar os bancos de dados, e as demais, que poderão ser utilizadas para se evitar a experimentação em animais.

USO DE VOLUNTÁRIOS HUMANOS – outra questão polêmica que deve ser encarada com muito cuidado. É importante frisar que a utilização de humanos não se destina a estudar a toxicidade, mas, sim, a demonstrar a ausência da mesma. Isso quer dizer que não se deve utilizar seres humanos em estudos de toxicidade de produtos ou substâncias – somente depois que estas já passaram por toda uma bateria de testes, envolvendo os métodos *in vitro* e os testes em animais, cujos resultados já foram negativos. Dessa forma, a utilização de seres humanos já parte do pressuposto de que as possibilidades de toxicidade são mínimas e a sua utilização se faz necessária para a demonstração de ausência de efeitos tóxicos. Cabe ressaltar a necessidade de uma ampla discussão ética quando da utilização de seres humanos em experimentação.

Algumas classificações didáticas podem ser utilizadas para um melhor entendimento do conceito dos 3Rs. Por exemplo, a substituição pode ser direta ou indireta, total ou parcial.

SUBSTITUIÇÃO DIRETA – é aquela em que se utiliza um sistema visando fornecer respostas o mais próximo possível do modelo animal. Por exemplo: pele *in vitro* de animais ou voluntários humanos. Na realidade, existem diversas formas de obter essa pele *in vitro*, mas, de qualquer forma, o objetivo é, dentro desse sistema, obter um resultado muito próximo ou igual ao que se teria fazendo um ensaio de irritação cutânea em coelhos.

SUBSTITUIÇÃO INDIRETA – nela se utiliza um sistema que fornece um resultado, não por ação no mesmo substrato, mas, sim, por dosagem ou reação de algum mediador que produz a resposta no sistema *in vivo*. Por exemplo: o teste de LAL (*Limulus Amoebocyte Lysate*) substitui o ensaio de pirogênio em coelhos pela determinação qualitativa ou quantitativa da presença de endotoxinas numa solução. Em animais, essa presença se manifesta pela ocorrência de febre; no caso do método *in vitro*, o fenômeno é medido de forma indireta (ou seja, se há endotoxina em uma determinada quantidade, o efeito nos animais seria a febre).

SUBSTITUIÇÃO TOTAL – é aquela em que a informação necessária pode ser obtida sem o uso de animais de experimentação. Por exemplo: potência de insulina ou somatotropina por HPLC. Nesse caso, os animais são substituídos pela determinação da potência por métodos físico-químicos. Outro exemplo é a produção de anticorpos monoclonais em sistemas *in vitro*.

SUBSTITUIÇÃO PARCIAL – é aquela em que se substitui, parcialmente, a utilização de animais. Por exemplo: técnicas que utilizam cultura de células, órgãos isolados ou uso de preparações subcelulares (receptores isolados).

Pode-se notar que alguns conceitos se confundem entre si. Na realidade, essa divisão é muito mais didática do que outra coisa. Um exemplo disso é o conceito que trata do cultivo celular. Se a célula for de origem humana (por exemplo, um carcinoma), podemos interpretar como uma substituição total, mesmo

sendo uma célula de linhagem; se for de origem animal, é certo que para a sua obtenção foram utilizados vários animais, por mais que essas células sejam utilizadas e fornecidas por muito tempo, mas alguma vez foi necessária a utilização de animais para a sua obtenção. Esse caso pode ser interpretado como substituição parcial ou mesmo uma redução.

O mesmo raciocínio vale para o caso dos órgãos isolados, uma técnica muito utilizada em farmacologia. Por exemplo, a técnica de íleo isolado. Uma cobaia é sacrificada e com o fragmento de íleo que é retirado podem ser feitos vários experimentos. Pode-se, dentro desse raciocínio, considerar essa técnica como uma redução, já que se utilizam vários fragmentos de um único animal, e, conseqüentemente, vários experimentos, em vez de vários animais. Entretanto, a técnica pode ser entendida como substituição, uma vez que se utiliza uma parte de um animal para se estudar um fenômeno, não em vários animais inteiros, mas em partes do animal.

Como se pode observar, devemos nos deter na filosofia do princípio dos 3Rs sem nos preocupar com as divisões teóricas do mesmo.

Um dos progressos que os pesquisadores vêm alcançando na área da redução consiste no procedimento de *screening*, no qual a integração de ensaios *in vitro* com sistemas computacionais e a hierarquização de métodos podem fazer com que não exista a necessidade de se utilizar animais, pois, se no decorrer desse procedimento algum indício de toxicidade for verificado, os animais não são utilizados.

Um exemplo de hierarquização pode ser, antes de se passar a fazer a experimentação em animais, o de verificar a medida de pH da substância ou produto; dependendo da faixa em que este se encontra (abaixo de 2,0 ou acima de 11,5) já pode ser considerado como corrosivo. Neste caso, interrompe-se o procedimento, do contrário pode-se seguir a aplicação. Outro exemplo, admitindo se ter chegado ao uso de animais, é fazer primeiramente o teste de irritação cutânea para, caso esta seja negativa, em seguida, fazer o teste de irritação ocular, caso contrário, este não deve ser realizado.

O refinamento é obtido por meio do uso de anestésicos (quando estes não interferem nos resultados experimentais) pela melhoria do desenho experimental e, conseqüentemente, pela utilização de métodos estatísticos que configuram uma melhor confiabilidade nos resultados.

EXPERT SYSTEMS – SISTEMAS TÉCNICOS PARA PREDIÇÃO DE TOXICIDADE

Um sistema técnico para a predição de toxicidade é considerado como sendo qualquer sistema formal, não necessariamente computacional, que permite que um usuário obtenha predição racional sobre a toxicidade de substâncias químicas. Todos os sistemas técnicos são construídos sobre dados experimentais representando uma ou mais manifestações tóxicas de substâncias em sistemas biológicos (banco de dados) e/ou regras derivadas desses dados.

Exemplos de sistemas técnicos:

- QSAR – *Quantitative Structure-Activity Relationship*
- PBPK – *Physiologically Based Pharmacokinetic*
- Derek – *Deductive Estimation of Risk from Existing Knowledge*
- Compact – *Computer-Optimised Molecular Parametric Analysis of Chemical Toxicity*
- Topkat – *Toxicity Prediction by Computer Assisted Technology*
- *Harzardexpert*
- *Metaboloexpert*
- *OncoLogic*
- StAR – *Standardised Argument Report*

Cada um desses sistemas se destina a um fim específico. Os mais conhecidos são o QSAR e o PBPK. O primeiro prediz os efeitos tóxicos com base na comparação estrutura-atividade das substâncias, e o segundo prediz as ações farmacocinéticas (absorção, metabolismo, eliminação etc.).

A BUSCA PELOS MÉTODOS ALTERNATIVOS

Hoje em dia, buscamos alternativas tanto na área experimental quanto na educacional. Basicamente, em termos de ensino, a experimentação animal já pode ser substituída, praticamente, sem causar prejuízos muito sérios ao aprendizado.

Na área de educação veterinária, já contamos com diversos modelos para o ensino e o treinamento de cirurgias, suturas e demais procedimentos. São modelos de cães e gatos, de diversos tamanhos, simulando, inclusive, respiração e outros parâmetros fisiológicos. Muitas pessoas combatem esse tipo de técnica, afirmando que elas não reproduzem inteiramente os aspectos e as condições encontrados na utilização de um animal verdadeiro. Realmente nada se compara ao organismo real, entretanto, o aprendizado nesses modelos nos fornece uma boa visão dos procedimentos e técnicas, possibilitando uma segurança maior quando diante de uma situação real. Cabe ressaltar que a utilização de bonecos já é prática na medicina humana e em treinamentos de primeiros socorros, simulando diversos tipos de queimaduras, forma correta de respiração artificial etc.

No treinamento em técnicas de experimentação animal existe um modelo de rato em silicone, no qual se pode treinar administração oral, intravenosa e intraperitoneal, simulando a textura e a resistência normais, além de apresentar tubos na cauda, simulando veias, contendo um líquido mimetizando sangue.

Um outro recurso, muito utilizado na área da farmacologia, são os simuladores em CD-ROM. Com eles, podemos ‘administrar’ diversos agonistas e antagonistas e visualizar seus efeitos em diversos parâmetros fisiológicos, tais como respiração ou pressão arterial.

Hoje em dia, existem alguns vídeos que detalham métodos de vias de administração, cirurgia, anestesia, enfim, diversos exemplos de manejo e experimentação animal.

Na área experimental, muitos ensaios têm sido propostos. Alguns deles já estão em estágio avançado de validação, enquanto outros estão ainda sendo muito estudados para se verificar as possibilidades de substituir ou reduzir o uso de animais em experimentação.

Alguns exemplos de técnicas alternativas:

- LAL (*Limulus Amoebocyte Lysate*) – substitui o ensaio de pirogênio em coelhos. Baseia-se na reação entre a endotoxina e substrato LAL. Dependendo do método, a presença de endotoxina pode ser constatada por meio da coagulação (método gel-clot) ou da liberação de cor (método cromogênico).
- HET-CAM (membrana cório-alantóide de embrião de galinha) – forte candidato para a substituição do teste de irritação ocular e de mucosas. Baseia-se na alteração dos vasos da membrana cório-alantóide, por meio da observação do tempo do surgimento de congestão, hemorragia e coagulação.
- Citotoxicidade – compreende diversas técnicas usando parâmetros de morte ou alterações fisiológicas de diferentes linhagens celulares. Entre os métodos mais utilizados, estão a difusão em agarose (células L929), captação de vermelho neutro ou MTT – (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium), ambos utilizando células 3T3 ou SIRC.
- Pele reconstituída – utilização de fragmentos de pele humana (a partir de circuncisão ou sobras de cirurgia plástica). Observação de alterações histológicas e/ou liberação de mediadores inflamatórios.
- RBC (*Red Blood Cell Assay*) – baseia-se na avaliação da hemólise e na desnaturação causadas por produtos (cosméticos) e/ou substâncias (tensoativos) perante um controle conhecido, geralmente, Lauril Sulfato de Sódio.

- WBC (*Whole Blood Assay*) – possível substituto para o ensaio de detecção de pirogênio em coelhos, por meio da liberação de mediadores inflamatórios quando um produto injetável é colocado em contato com sangue total humano.
- Kits comerciais – Corrositexâ, Skintexâ, Eyetexâ, Episkinâ, entre outros, são exemplos de kits utilizados para determinar grau de corrosão, potencial de irritação cutânea ou ocular.

PRESENTE E FUTURO

Conforme já dito, esses métodos se encontram em distintos estágios de desenvolvimento e validação. Esse processo é bastante árduo, podendo atingir 10 anos ou mais. Qualquer método, para ser validado, tem de passar por estudos colaborativos, realizados por vários laboratórios, em que são analisadas as variações inter e intralaboratoriais.

Não podemos pensar que seja possível a substituição de todos os ensaios que utilizam animais. Por exemplo, experimentos que envolvem aprendizagem e memória ainda não apresentam propostas de substituição, o que não quer dizer que daqui a 10, 20 ou 50 anos isso não seja possível. O avanço do conhecimento científico humano e o desenvolvimento de métodos imunológicos, químicos e genômicos poderão contribuir muito para o futuro dos métodos alternativos.

É importante ressaltar que não cabem discussões por parte de protecionistas e cientistas sobre quem tem razão em sua forma de pensar, ou seja, se deve-se parar com os experimentos ou continuar. É necessário que ambas as partes se juntem e discutam seus pontos de vista e possibilidades de estudos. É preciso que cada um compreenda e respeite o prisma com que o outro olha e entende o tema. Essas discussões têm de ocorrer sob atmosfera técnica e científica, jamais em clima fundamentalista ou radical. Até a década de 60, ninguém poderia imaginar que seria possível detectar pirogênio sem ser em coelhos; entretanto, em 1964, Levin e Bang descreveram o que seria a base do método de LAL e, hoje, já falamos em quantificar a liberação dos mediadores envolvidos na febre.

É importante entender que não devemos deixar de usar os animais somente porque assim queremos, sem que estejamos certos de que os ensaios utilizados nessa substituição refletem os efeitos que realmente estamos estudando. Devemos ter certeza de que o método alternativo é suficientemente capaz de indicar, o mais precisamente possível, as condições de eficácia e segurança de uma substância ou produto. Devemos ter a consciência de que podemos substituir o uso de animais em alguns experimentos, desde que as alternativas estejam bem definidas e validadas. Assim, temos a obrigação de continuar a estudar e a desenvolver métodos visando a substituições futuras.

BIBLIOGRAFIA

- ARCHER, G. et al. The validation of toxicological prediction models. *Alternatives to Laboratory Animals*, 25(5):505-516, 1997.
- BALLS, M. Replacement of *animal procedures*: alternatives in research, education and testing. *Laboratory Animals*, 28:193-211, 1994.
- BALLS, M. Reducing animal testing: tests matter more than what is tested. *Alternatives to Laboratory Animals*, 25(6):613-617, 1997.

- BALLS, M. & FENTEM, J. Progress toward the validation of alternative tests. *Alternatives to Laboratory Animals*, 25(1):33-43, 1997.
- BALLS, M. & FENTEM, J. Non-animal alternatives and reduction in laboratory animal use. *Alternatives to Laboratory Animals*, 25(3):215-218, 1997.
- BALLS, M. et al. The three Rs: the way forward. *Alternatives to Laboratory Animals*, 23:838-866, 1995.
- CASTEL, J. V. & GÓMEZ-LECHÓN, M. J. *In vitro Methods in Pharmaceutical Research*. San Diego: Academic Press, 1997.
- CURREN, R. D. & HARBELL, J. W. In vitro alternatives for ocular irritation. *Environmental Health Perspectives*, 106(suppl. 2):485-492, 1998.
- DEARDEN, J. C. The development and validation of expert systems for predicting toxicity. *Alternatives to Laboratory Animals*, 25(3):223-252, 1997.
- DE TORRES, E. P.; LARRAURI, A. G. & KUHN, G. R. Ensayos alternativos a la experimentación animal. *Animales de Experimentación*, 3(2):30-36, 1997.
- FESTING, M. F. W. Reduction of animal use: experimental design and quality of experiments. *Laboratory Animals*, 28(3):212-221, 1994.
- FLECKNELL, P. A. Refinement of animal use – assessment and alleviation of pain and distress. *Laboratory Animals*, 28(3):222-231, 1994.
- HARTUNG, T. & SPIELMANN, H. Der lange Weg zur validierten Ersatzmethode. *Alternatives in Experimentation*, 12(2):98-103, 1995.
- HARTUNG, T. et al. Novel pyrogen tests based on the human fever reaction. *Alternatives to Laboratory Animals*, 29:99-123, 2001.
- KIMBER, I. et al. Alternative approaches to the identification and characterization of chemical allergens. *Toxicology in vitro*, 15:307-312, 2001.
- MAJMUDAR, G. & SMITH, M. *In vitro* screening techniques in dermatology. *Cosmetics & Toiletries*, 113(4):69-113, 1998.
- OSBORNE, R. & PERKINS, M. A. An approach for development of alternative test methods based on mechanisms of skin irritation. *Food and Chemical Toxicology*, 32(2):133-142, 1994.
- SPIELMANN, H. & LIEBSCH, M. Lessons learned from validation of *in vitro* toxicity test: from failure to acceptance into regulatory practice. *Toxicology in vitro*, 15:585-590, 2001.
- RYAN, C. A.; HULETTE, B. C. & GERBERICK, G. F. Approaches for the development of cell-based *in vitro* methods for contact sensitization. *Toxicology in vitro*, 15:43-55, 2001.
- VAN ZUPTEN, L. F. M. & VAN DER VALK, J. B. F. Developments on the implementation of the three Rs in research and education. *Toxicology in vitro*, 15:591-595, 2001.
- WORTH, A. P.; BARRAT, M. D. & HOUSTON, J. B. The validation of computational prediction techniques. *Alternatives to Laboratory Animals*, 26(2):241-247, 1998.