

Alternativas para animais de laboratório: *sistemas in vitro*

Maria das Graças Müller de Oliveira Henriques
André Luiz Franco Sampaio

SciELO Books / SciELO Livros / SciELO Libros

ANDRADE, A., PINTO, SC., and OLIVEIRA, RS., orgs. *Animais de Laboratório: criação e experimentação* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.



All the contents of this work, except where otherwise noted, is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial-ShareAlike 3.0 Unported.

Todo o conteúdo deste trabalho, exceto quando houver ressalva, é publicado sob a licença Creative Commons Atribuição - Uso Não Comercial - Partilha nos Mesmos Termos 3.0 Não adaptada.

Todo el contenido de esta obra, excepto donde se indique lo contrario, está bajo licencia de la licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 3.0 Unported.

A Alternativas para Animais de Laboratório: sistemas *in vitro*

Maria das Graças Müller de Oliveira Henriques
André Luiz Franco Sampaio

HISTÓRICO

Há muitos anos os seres humanos têm utilizado animais para melhor compreender a anatomia, fisiologia e os mecanismos envolvidos no desenvolvimento das doenças. O trabalho médico mais antigo que se tem conhecimento, o *Corpus Hippocraticum* (cerca de 350 a.C.), já contém descrições de experimentos com porcos. No entanto, a partir de meados do século XIX, a experimentação animal ganhou um novo ímpeto, principalmente, devido aos avanços nas ciências básicas da medicina, tais como a anatomia e fisiologia, e não como se imagina, pelo desenvolvimento de novas terapias e imunoprevenções.

A primeira tentativa para vacinação foi feita na China, logo no início do século VI d. C., baseada em observações em seres humanos. Um dos primeiros textos sobre medicina chinesa, *The golden mirror of medicine*, lista diversas formas de inoculação contra varíola, tais como inalação de raspas de escaras de varíola e a introdução de um pedaço de algodão com conteúdos da vesícula da varíola no nariz (Plotkin & Plotkin, 1988).

UMA ABORDAGEM CIENTÍFICA PARA O DESENVOLVIMENTO DE VACINAS E MEDICAMENTOS

A primeira tentativa científica para controlar uma doença infecciosa através de inoculação sistemática é atribuída a Edward Jenner. Após 25 anos de estudos, Jenner publicou seus achados sobre varíola e varicela em 1798 (Jenner, 1798). Esta publicação também contém resultados de seu experimento realizado em 1796, no qual um menino de oito anos de idade, chamado James Phipps, foi inoculado com material de varicela e, em seguida, inoculado com o vírus da varíola.

Tal como diversos outros desenvolvimentos da medicina, a introdução da vacinação contra a varicela encontrou muito ceticismo. Porém, com o passar dos anos, esse método encontrou ampla aplicação. É interessante notar que o estudo de Jenner foi completamente baseado em observações em seres humanos e experimentos envolvendo animais não contribuíram de forma alguma nesses resultados.

Passaram-se 84 anos entre a proposta de Jenner para vacinação de varíola e o desenvolvimento de uma primeira vacina baseada em pesquisa científica, a vacina contra cólera, desenvolvida por Pasteur em 1880.

Durante esse tempo, o campo da pesquisa não estava parado. No geral, a maior atenção era dedicada ao desenvolvimento de estudos comparativos de patologia e a tentativa de compreensão da etiologia de doenças. A crença inicial de que um miasma (uma emanção maléfica) era o causador das doenças foi substituída pela compreensão de que as infecções poderiam ser causadas por organismos vivos.

Em 1840, o patologista e anatomista alemão Jacob Henle (1809-1885) publicou seu trabalho sobre doenças contagiosas, no qual demonstrava que organismos vivos, e não miasmas, eram os causadores de doenças.

Ele concluiu que, para estabelecer a associação entre o agente causal e a infecção, é essencial cultivar o microorganismo fora do agente hospedeiro (apud Brown, Cussler & Hendriksen, 1996).

O postulado de Koch, publicado em 1884, tem importância histórica com relação ao papel de animais de experimentação no estudo de doenças infecciosas; ele estabelece o critério para co-relacionar um microorganismo com uma infecção e inclui o isolamento do microorganismo em cultura pura, a partir de material coletado de um paciente, seguido pela introdução da cultura em um animal experimental apropriado. O postulado de Koch ganhou uma aceitação geral na microbiologia e ajudou a estabelecer as bases para o intenso uso dos animais de laboratório.

O uso de animais de experimentação assumiu então, a partir dessa data, uma posição-chave na clínica e na patologia experimental. A necessidade de bons modelos experimentais utilizando animais aumentou quando se descobriu que nem todas as espécies são igualmente sensíveis aos microorganismos patogênicos. Por exemplo, Koch utilizou camundongos, cobaias e coelhos em seus estudos sobre carbúnculo maligno, levando rapidamente ao desenvolvimento de uma vacina. Nos casos em que foi difícil encontrar um modelo animal adequado, como no caso da poliomielite, as investigações estagnaram durante muitos anos. Entretanto, resultados rápidos também foram obtidos na pesquisa com a difteria, quando encontrou-se um modelo relativamente simples em cobaias (Hendriksen, 1988).

No Quadro 1, podemos observar a intensificação das descobertas a partir da introdução da experimentação em animais de laboratório.

Quadro 1 – Fatos importantes no estudo de doenças infecto-contagiosas

ANO	DESCOBERTA
1796	Edward Jenner descreve a vacina contra varíola através de observações e experimentações em seres humanos
1840	Jacob Henle descreve o microorganismo como agente causal das doenças
1880	Pasteur desenvolve a vacina contra cólera
1881	Pasteur desenvolve a vacina anti-rábica
1884	Koch isola o agente causador da tuberculose e publica o postulado de Koch
1894	Roux e Martin desenvolvem a vacina contra difteria
1928	Fleming descobre a penicilina
1949	Enders, Weller e Robbins descrevem a primeira vacina contra poliomielite

BEM-ESTAR DOS ANIMAIS E O INTERESSE EM ALTERNATIVAS PARA OS TESTES EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO

As implicações éticas da experimentação animal foram debatidas violentamente desde o início. Em 1760, o fisiologista inglês Ferguson (1710-1776) descreveu o tratamento bárbaro a que animais eram submetidos em alguns experimentos.

As reflexões sobre relação entre homem e animal foram grandemente influenciadas pelos conceitos éticos formulados por Jeremy Bentham (1748-1832). Bentham considerava a capacidade de sofrer dos animais como uma característica essencial para que fossem tratados com benevolência. A Inglaterra era o centro da oposição aos animais de experimentação e, em 1842, foi criada a Sociedade Britânica para Prevenção da Crueldade com Animais, considerada a primeira sociedade mundial protetora de animais.

No entanto, o desenvolvimento da ciência médica e, sobretudo, a descoberta da vacina contra difteria, causaram profundo impacto na opinião pública. O fato de que pesquisas envolvendo animais levaram à

prevenção de uma doença que vitimava milhares de crianças anualmente, convenceu até mesmo os críticos mais afeccionados da necessidade de tais estudos. Apesar disso, a oposição ao uso de animais de experimentação sempre esteve presente, com períodos de declínio e reincidência.

Porém, com o advento do desenvolvimento de vacinas e dos primeiros antibióticos, teve início um uso muito mais intenso e sistemático de animais de experimentação. Estes passaram a ser utilizados em ensaios para o desenvolvimento de novas vacinas, na busca de novos medicamentos eficazes contra dezenas de doenças e, também, no controle de qualidade das vacinas e dos medicamentos já desenvolvidos. A sociedade passou a ficar preocupada, então, com a quantidade de animais e o tipo de tratamento recebido por eles durante esses ensaios.

TRATAMENTO HUMANITÁRIO

Os pesquisadores ingleses Russel & Burch (1959) publicaram *O Princípio da Técnica Experimental Humanitária* e introduziram o conceito dos 3Rs.

- *Replacement* – substituição de espécie por outra mais abaixo na escala zoológica ou para microorganismos, ou, se possível, para material não biológico;
- *Reduction* – redução do número de animais utilizados;
- *Refinement* – refinamento das técnicas para minimizar o nível de estresse e dor causada ao animal durante a experimentação.

Esse trabalho de conscientização teve grande repercussão em diversos países do mundo e em diversos estratos da sociedade, mudando a visão das pessoas sobre o uso dos animais e levando a uma reflexão se o uso de animais de laboratórios poderia ser minimizado.

Não é apenas a pesquisa científica básica que faz uso de animais de experimentação. Os maiores usuários são as indústrias farmacêuticas e de cosméticos. Essas indústrias demandam milhares de animais anualmente, que são utilizados nos diversos testes solicitados por organismos mundiais para a investigação da segurança de uso e validação dos produtos fabricados. A utilização dos animais para os testes toxicológicos de novos produtos farmacêuticos e cosméticos tem sido alvo de grandes protestos mundiais. De um lado estão as sociedades protetoras, contra os testes; de outro, a indústria e até mesmo alguns órgãos governamentais, defensores da necessidade dos testes para garantir a segurança e a eficácia dos produtos fabricados.

Atualmente, há um grande movimento internacional, baseado nos 3Rs, para a validação e a aplicação de novas técnicas, especialmente *in vitro*, para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos, cosméticos e imunobiológicos. Atendendo a pressões de organismos internacionais, as indústrias farmacêuticas e de cosméticos têm sistematicamente adotado metodologias mais modernas que atendam aos 3Rs para o desenvolvimento de seus produtos.

OS 3RS NO DESENVOLVIMENTO DE IMUNOBIOLOGICOS E FÁRMACOS

A indústria de imunobiológicos também é uma grande usuária de animais na produção de vacinas, além dos testes de eficácia e segurança. Hoje, com a adoção de sistemas *in vitro* de cultura de células, pode-se substituir completamente o uso de animais ou seus derivados para as fases de produção e testes de algumas vacinas. O Quadro 2 ilustra alguns casos nos quais métodos alternativos podem ser utilizados para a substituição, ou pelo menos redução do uso de animais, na produção de vacinas.

Quadro 2 – Métodos alternativos para a substituição ou redução do uso de animais na produção ou teste de vacinas

VACINA	ANIMAL OU MÉTODO						
	Macaco	Cachorro	Coelho	Camundongo	Células humanas	Ovos com embrião de galinha	Teste de Flocculação
Adenovírus	P				P T		T
Difteria							
Catapora	P	P			P	P	
Pólio	P T				P		
Raiva			P		P T	P	
Rubéola	P	P	P		P	P	
Varíola			T		P	P T	
Tétano				T			T
Febre Amarela				T	P T		

P – Produção; T – Teste.

Na indústria farmacêutica, o uso de animais permitiu o desenvolvimento de medicamentos para as mais diversas enfermidades e doenças durante muitos anos. Entretanto, novos métodos têm sido aplicados no desenvolvimento de novos fármacos, especialmente na fase de descobrimento e, em alguns casos, nos estudos toxicológicos. Na indústria farmacêutica, e também de cosméticos, um dos grandes vilões é o teste de Draize, amplamente utilizado e recomendado por organismos internacionais para a determinação do potencial irritante de produtos nos olhos.

Atualmente, alguns métodos *in vitro* tentam minimizar o teste de Draize mediante a avaliação dos produtos em sistemas de cultura de tecidos ou células (fibroblastos). Esses testes podem detectar o grau de irritabilidade dos produtos, servindo como um pré-teste, evitando assim o uso excessivo de animais. Entretanto, o uso mais amplo dessas metodologias ou a substituição do teste de Draize ainda são motivos de acirrados debates no meio científico.

Uma das áreas que mais obteve sucesso na utilização dos 3Rs foi a pesquisa de novos fármacos. A indústria farmacêutica conta hoje com sistemas robotizados capazes de processar milhares de amostras por dia, sendo capazes de testar essas amostras em diversos alvos moleculares ou celulares para o desenvolvimento de novos fármacos. Os modelos utilizados para os ensaios podem compreender sistemas enzimáticos, essenciais para o desenvolvimento de algumas doenças ou para a sobrevivência de parasitas vírus, ou ainda sistemas de culturas de células, em particular as tumorais, para o desenvolvimento de novos quimioterápicos. Esses ensaios permitem a avaliação de grande quantidade de amostras em curto prazo e, apesar de não serem definitivos, podem orientar a continuidade da pesquisa. Na seqüência, são realizados ainda ensaios *in vitro* mais sofisticados e, só então, iniciam-se os estudos com animais de laboratório começando-se sempre com animais de pequeno porte como camundongos, ratos e cobaias.

AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA PRIMÁRIA – ENSAIOS *IN VITRO*

Na busca de produtos naturais ou sintéticos com atividade antiinflamatória, imunomoduladora, antineoplásica ou contra parasitos protozoários, pode-se utilizar diferentes ensaios *in vitro* para a determinação da atividade biológica dessas moléculas.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA OU IMUNORREGULADORA

Na avaliação primária de compostos com atividade antiinflamatória ou imunorreguladora, podem ser feitos ensaios utilizando linhagem de células mantidas em cultura, substituindo por completo o uso de animais neste passo, avaliando-se a produção de óxido nítrico, proliferação de linfócitos e produção de citocinas. Esses ensaios são bastante informativos já que tanto o óxido nítrico como as citocinas possuem uma participação, seja em processos inflamatórios, seja em respostas imunes.

PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) é um mediador inflamatório produzido quando macrófagos, entre outras células, são ativados (Fig. 1). O NO pode atuar tanto no desenvolvimento de reações inflamatórias quanto na atividade bactericida ou antiparasitária dessas células. Quando alguma substância consegue inibir a sua produção, isso indica um potencial papel antiinflamatório. No entanto, se alguma substância for capaz de aumentar a sua produção, isso pode ser um indicativo de uma potencial atividade estimuladora das atividades antiparasitária ou bactericida dos macrófagos.

Figura 1 – Ensaios que podem ser utilizados na descoberta de novos fármacos como alternativa ao uso de animais



Elaboração: André L. F. Sampaio

PRODUÇÃO DE CITOCINAS

As citocinas constituem uma família de peptídeos com diversas atividades biológicas e são produzidas, principalmente, por linfócitos e macrófagos. A regulação da produção de diferentes citocinas pode desempenhar um papel tanto antiinflamatório como imunomodulador. Na Fig. 1 está representada uma metodologia que pode ser utilizada para se avaliar o efeito de novos compostos sobre a produção de citocinas. Entre as citocinas que podem ser avaliadas, podemos citar: interleucina (IL)-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, o fator de necrose tumoral e o interferon- γ .

PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS

A avaliação da capacidade de um composto em inibir a proliferação de linfócito fornece uma informação fundamental para o desenvolvimento de novos fármacos imunossupressores. Esses fármacos têm aplicação fundamental no tratamento de doenças auto-imunes e na rejeição de transplantes. Nessas situações, ocorre uma multiplicação e ativação exagerada dos linfócitos que passam a ter uma atuação nociva ao organismo. Nesses experimentos, os animais servem de fonte de células para os ensaios.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA

Na busca de novos medicamentos contra neoplasias, pode-se iniciar os testes com ensaios sobre alvos moleculares, relacionados com a resistência das células tumorais à quimioterapia convencional, ou com linhagens de células tumorais em cultura. Existem diversas linhagens desenvolvidas a partir de tumores malignos de camundongos, macacos e seres humanos que hoje são mantidas exclusivamente em cultura, muitas delas resistentes a múltiplas drogas antitumorais. A proliferação dessas células pode ser avaliada frente a diferentes concentrações da amostra que se pretende testar, monitorando a sobrevivência e a taxa de multiplicação celular. Quanto mais eficaz for uma substância em matar a célula em cultura ou impedir sua proliferação, maior será seu potencial como fármaco contra neoplasias. A grande vantagem do uso dessa metodologia reside na diminuição do número de substâncias para testes posteriores em animais, já que tais testes podem ser extremamente agressivos, dependendo da linhagem tumoral inoculada nos animais.

ATIVIDADE CONTRA PARASITAS

Pode-se também testar amostras contra o crescimento de parasitas *in vitro*. Esses testes podem ser feitos tanto em culturas puras dos parasitas como em cultura de células infectadas. Em tais experimentos, avalia-se a capacidade da amostra em matar o parasito diretamente, ou após a interação do parasito e as células em uma cultura mista. Caso uma amostra mostre-se capaz de matar o parasito nessas condições, a ela é atribuída uma atividade farmacológica que permite o prosseguimento dos estudos.

HOME PAGES DE INTERESSE

INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS (ICCVAM)

<http://iccvam.niehs.nih.gov/home.htm>

<http://ntp-server.niehs.nih.gov/htdocs/iccvam/toc.html>

FUND FOR THE REPLACEMENT OF ANIMALS IN MEDICAL EXPERIMENTS

<http://www.frame.org.uk/index.htm>

DEVELOPMENT OF ALTERNATIVES TO ANIMAL USE FOR SAFETY TESTING AND HAZARD ASSESSMENT

http://www.solutions-site.org/cat9_sol103_5.htm

ALTERNATIVES FOR ANIMAL TESTING ON THE WEB

http://altweb.jhsph.edu/publications/humane_exp/het-toc.htm

FOUNDATION FOR BIOMEDICAL RESEARCH

<http://www.fbresearch.org/index.html>

CENTER FOR ALTERNATIVES TO ANIMAL TESTING

http://caat.jhsph.edu/pubs/animal_alts/preface.htm

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BROWN, F.; CUSSLER, K. & HENDRIKSEN, C. F. M. (Eds.). *Replacement, Reduction and Refinement of Animal Experiments in the Development and Control of Biological Products: developments in biological standardization*. Basel: Ed Karger, 1996. v.86.
- HENDRIKSEN, C. F. M. *Laboratory Animals in Vaccine production and Control, Replacement, Reduction and Refinement*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1988.
- JENNER, E. *An Inquiry into the Causes and Effects of the Variolae Vaccinae*. London: Samson Low, 1798.
- PLOTKIN, S. L. & PLOTKIN, S. A. A short history of vaccination. In: PLOTKIN, S. A. & MORTIMER, E. A. (Eds.) *Vaccines*. Philadelphia: WB Saunders Company, 1988.
- RUSSEL, W. M. S. & BURCH, R. L. *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen, 1959.