

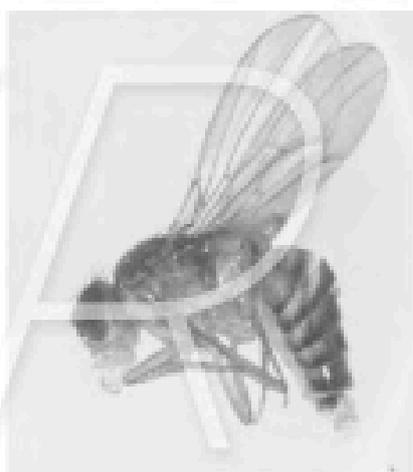
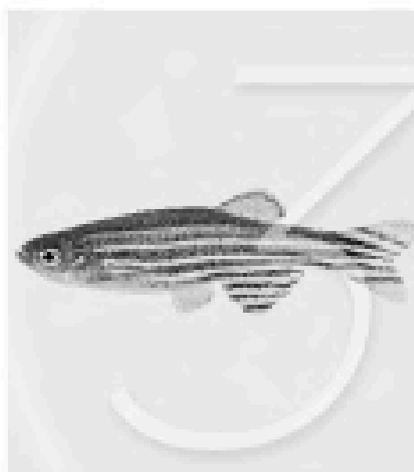
BIOÉTICA E MANEJO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Eduardo Carvalho Lira
(Organizador)



BIOÉTICA E MANEJO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Eduardo Carvalho Lira
(Organizador)



Editora chefe

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Editora executiva

Natalia Oliveira

Assistente editorial

Flávia Roberta Barão

Bibliotecária

Janaina Ramos

Projeto gráfico

Bruno Oliveira

Camila Alves de Cremonesi

2022 by Atena Editora

Luiza Alves Batista

Copyright © Atena Editora

Natália Sandrini de Azevedo

Copyright do texto © 2022 Os autores

Imagens da capa

Copyright da edição © 2022 Atena Editora

iStock

Direitos para esta edição cedidos à Atena

Edição de arte

Editora pelos autores.

Luiza Alves Batista

Open access publication by Atena Editora



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição-Não-Comercial-NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. Permitido o *download* da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

Conselho Editorial**Ciências Biológicas e da Saúde**

Profª Drª Aline Silva da Fonte Santa Rosa de Oliveira – Hospital Federal de Bonsucesso

Profª Drª Ana Beatriz Duarte Vieira – Universidade de Brasília

Profª Drª Ana Paula Peron – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília

Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Cirênio de Almeida Barbosa – Universidade Federal de Ouro Preto

Profª Drª Daniela Reis Joaquim de Freitas – Universidade Federal do Piauí

Profª Drª Débora Luana Ribeiro Pessoa – Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro



Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Profª Drª Elizabeth Cordeiro Fernandes – Faculdade Integrada Medicina
Profª Drª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Profª Drª Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Fernanda Miguel de Andrade – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Dr. Fernando Mendes – Instituto Politécnico de Coimbra – Escola Superior de Saúde de Coimbra
Profª Drª Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Helio Franklin Rodrigues de Almeida – Universidade Federal de Rondônia
Profª Drª Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Jefferson Thiago Souza – Universidade Estadual do Ceará
Prof. Dr. Jesus Rodrigues Lemos – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Jônatas de França Barros – Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. José Aderval Aragão – Universidade Federal de Sergipe
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Profª Drª Juliana Santana de Curcio – Universidade Federal de Goiás
Profª Drª Livia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás
Prof. Dr. Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Maria Tatiane Gonçalves Sá – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Maurilio Antonio Varavallo – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federaci do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá
Prof. Dr. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados
Profª Drª Regiane Luz Carvalho – Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino
Profª Drª Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora
Profª Drª Sheyla Mara Silva de Oliveira – Universidade do Estado do Pará
Profª Drª Suely Lopes de Azevedo – Universidade Federal Fluminense
Profª Drª Vanessa da Fontoura Custódio Monteiro – Universidade do Vale do Sapucaí
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Welma Emidio da Silva – Universidade Federal Rural de Pernambuco



Bioética e manejo de animais de laboratório

Diagramação: Camila Alves de Cremona
Correção: Mariane Aparecida Freitas
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores
Organizador: Eduardo Carvalho Lira

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

B615 Bioética e manejo de animais de laboratório /
Organizador Eduardo Carvalho Lira. – Ponta Grossa
- PR: Atena, 2022.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-65-258-0130-8

DOI: <https://doi.org/10.22533/at.ed.308221909>

1. Animais de laboratório. 2. Bioética. I. Lira,
Eduardo Carvalho (Organizador). II. Título.

CDD 636.0885

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br



Atena
Editora
Ano 2022

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.



DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Atena Editora declara, para os devidos fins de direito, que: 1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, direito sobre a publicação, inclusive não constitui responsabilidade solidária na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código Penal e no art. 927 do Código Civil; 2. Autoriza e incentiva os autores a assinarem contratos com repositórios institucionais, com fins exclusivos de divulgação da obra, desde que com o devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial; 3. Todos os e-book são *open access*, desta forma não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de *e-commerce*, ou qualquer outro meio virtual ou físico, portanto, está isenta de repasses de direitos autorais aos autores; 4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro; 5. Não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra.



Nossos agradecimentos ao Prof. Msc. Joel Majerowicz pela gentileza em dedicar parte do seu tempo a realizar a correção técnica do manuscrito desta obra.

PREFÁCIO

Este livro nasceu do anseio de expandir conceitos sobre a ciência de animais de laboratório para os que iniciam suas carreiras acadêmico-científicas, promovendo o respeito e o bem-estar para com animais utilizados na experimentação científica. Essa semente sobre a importância do Bioterismo, lançada pela Professora Dr.^a Adela Rosenkranz através da formação de recursos humanos na América Latina reverberou no Nordeste do Brasil. Portanto, este livro é uma sinopse dos cursos de formação de alunos de pós-graduação e graduação, ao longo dos últimos dez anos, sobre Bioética e manejo de animais de laboratório que é ministrado pelo Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco. Iniciamos com um breve histórico sobre a utilização de animais para fins experimentais/didáticos, desde os primórdios da ciência, o que é amplamente questionado e discutido por correntes filosóficas antagônicas, que se posicionam na negativa absoluta baseada na suposição de maus tratos, ou aquelas favoráveis a utilização de animais como meio para o desenvolvimento tecnológico. Este preâmbulo é uma forma de aguçar a curiosidade do leitor e conduzi-lo aos capítulos seguintes nos quais são abordados a legislação brasileira para o uso de animais, os conceitos de biossegurança na experimentação animal, as principais espécies utilizadas na pesquisa experimental, os aspectos da fisiologia de ratos e camundongos e os métodos de colheita das amostras biológicas. Neste sentido, esta obra busca contribuir com o debate qualificado e focado no uso legal, ético como meio para encontrar soluções para diferentes problemas de saúde que afetam os animais, inclusive os humanos. Portanto, este livro é um preparo para aqueles que buscam a carreira científica, nas áreas das ciências biomédicas, mas também para aqueles que desejam ser informados dos conceitos atuais do bem-estar animal.

Glória Isolina Boente Pinto Duarte

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	1
UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS NA PESQUISA CIENTÍFICA – BREVE HISTÓRICO Glória Isolina Boente Pinto Duarte  https://doi.org/10.22533/at.ed.3082219091	
CAPÍTULO 2.....	5
BIOÉTICA: REGULAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS EM PESQUISA José Jairo Teixeira da Silva  https://doi.org/10.22533/at.ed.3082219092	
CAPÍTULO 3.....	12
PRINCIPAIS ESPÉCIES ANIMAIS UTILIZADAS EM PESQUISA EXPERIMENTAL Glória Isolina Boente Pinto Duarte  https://doi.org/10.22533/at.ed.3082219093	
CAPÍTULO 4.....	19
ASPECTOS GERAIS DA FISIOLÓGIA DO RATO E CAMUNDONGO DE BIOTÉRIO Eduardo Carvalho Lira  https://doi.org/10.22533/at.ed.3082219094	
CAPÍTULO 5.....	27
ASPECTOS REPRODUTIVOS GERAIS DE RATOS E CAMUNDONGOS Dayane Aparecida Gomes Ismaela Maria Ferreira de Melo  https://doi.org/10.22533/at.ed.3082219095	
CAPÍTULO 6.....	34
ANESTESIA, ANALGESIA E EUTANÁSIA DE ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO Ismaela Maria Ferreira de Melo  https://doi.org/10.22533/at.ed.3082219096	
CAPÍTULO 7.....	49
BIOSSEGURANÇA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL Leucio Duarte Vieira  https://doi.org/10.22533/at.ed.3082219097	
CAPÍTULO 8.....	60
MÉTODOS DE ADMINISTRAÇÃO E COLETA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS MAIS UTILIZADAS NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL Valéria Nunes de Souza  https://doi.org/10.22533/at.ed.3082219098	
CAPÍTULO 9.....	72
MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE MAMÍFEROS EM PESQUISA EXPERIMENTAL Samara Rodrigues Bonfim Damasceno Oliveira  https://doi.org/10.22533/at.ed.3082219099	
SOBRE OS ORGANIZADORES	88

CAPÍTULO 9

MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE MAMÍFEROS EM PESQUISA EXPERIMENTAL

Data de aceite: 01/03/2022

Samara Rodrigues Bonfim Damasceno Oliveira

Prof.^a Dr.^a Centro Universitário Estácio Recife

A EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL EM DADOS NUMÉRICOS

Os animais têm sido usados no ensino e pesquisa por milênios na história da humanidade. Evidências mostram que, mesmo na Grécia Antiga, Aristóteles usava animais em seus estudos, principalmente para avançar na compreensão dos animais vivos nas áreas de ciências naturais. Mas foi apenas durante os séculos XVIII e XIX, que o desenvolvimento de modelos animais se expandiu com cientistas, como Jean Baptiste Van Helmont, Francesco Redi, John Needham, Lazzaro Spallanzani, Lavoisier e Pasteur conduzindo experimentos em animais para estudar a origem da vida.

Contudo, atualmente a realização dos estudos baseados em animais está sob crescente escrutínio, por razões científicas e éticas, dentre as quais têm chamado atenção o número alarmante de animais que têm sido utilizados. Cerca de 50-100 milhões de animais, desde peixes-zebra a primatas não humanos são usados para experimentação científica todos os anos. Embora os experimentos com vertebrados sejam regulamentados na maioria dos países, aqueles com invertebrados não são e, portanto, faltam estatísticas de uso precisas. O número total de animais usados somente nos EUA, em 2010, foi de quase 1,37 milhão, no qual, a maioria dos procedimentos foi realizada em camundongos e ratos (96%), além de outros animais, como cobaias, coelhos e hamsters. No Reino Unido, mais de três milhões de animais foram usados em 2011, que incluíam principalmente camundongos (71%), peixes (15%),

ratos (7%) e pássaros (4%).

Estatísticas semelhantes para o uso extensivo de animais na União Europeia também estão disponíveis. Aproximadamente 200 mil peixes e 20 mil anfíbios foram usados no Reino Unido em 2004, predominantemente peixes-zebra e a rã africana, *Xenopus laevis*. Mais de 20 mil coelhos foram usados para testes de irritação ocular (teste de Draize) no Reino Unido em 2004. Os efeitos biológicos no olho são mais fáceis de visualizar devido ao menor fluxo lacrimal e à ausência de pigmento ocular nesses animais. Os coelhos também são frequentemente usados para a produção de anticorpos policlonais. Embora a maioria dos animais mencionados acima também seja usada na Índia, o uso de sapos nesse país precisa de permissão especial do respectivo guarda-florestal estadual, uma vez que os sapos são rotulados, como espécies ameaçadas de extinção. As rãs estão incluídas no Anexo IV da Lei de Proteção à Vida Selvagem de 1972, da Índia, bem como na lista vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais. Animais maiores, como cães, gatos e primatas não humanos juntos representam menos de 1% dos animais usados em pesquisas a cada ano no mundo. Eles são comumente usados, como modelos para doenças humanas em cardiologia, endocrinologia, estudos ósseos e articulares. Os gatos são mais comumente usados em pesquisas neurológicas.

Em 2008, um grupo de pesquisadores do Reino Unido realizou um estudo sobre as estimativas para o uso mundial de animais de laboratório relacionadas ao ano de 2005. Nessa pesquisa, foram analisados 179 países e o número estimado de animais utilizados somente naquele ano foi de 58.339.972, incluindo vertebrados e espécies de invertebrados, como cefalópodes. Se fossem incluídos os animais mortos para suprimento

de tecido, usados para manter as colônias geneticamente modificadas e o excedente reproduzido, o número aumentaria para mais de 115 milhões.

Em 2019, Taylor e Alvarez atualizaram o estudo realizado sobre a estimativa mundial do uso de animais que o grupo já havia analisado em 2005. Nessa versão mais atualizada da pesquisa, referente ao ano de 2015, o grupo aplicou um modelo de previsão baseado em taxas de publicação, para estimar o uso de animais dos mesmos 179 países analisados anteriormente. Isso gerou uma estimativa do uso global de animais em procedimentos científicos de 79,9 milhões, um aumento de 36,9% sobre o valor estimado equivalente para 2005 que na época apresentou valores de 58,3 milhões de animais. Os cientistas extrapolaram ainda mais essa estimativa para obter um valor global final mais abrangente para o número de animais usados para fins científicos, o que levou esse número para valores ainda mais altos, na faixa de 192,1 milhões, nesse caso foram incluídos animais mortos com o objetivo de fornecer tecidos para uso *ex vivo* ou *in vitro*; animais geneticamente modificados (GM) ou sem modificação genética que são usados para manter colônias GM estabelecidas; e animais sem modificação genética criados para uso em laboratório, mas não usados. Dentre todos os países analisados, o Brasil, ao mesmo tempo em que se destaca como um dos 10 países com maior quantidade de publicações do ano de 2015, também chama a atenção por estar na oitava posição em maior quantidade de uso de animais de experimentação, perdendo apenas para China, Japão, Estados Unidos da América (USA), Canadá, Austrália, Coreia do Sul e Reino Unido. O gráfico apresentado na figura 01 mostra essa escala em dados numéricos.

O grupo mencionou, dentre as suas conclusões, que desde o estudo de 2005, não houve aumento evidente na quantidade de países que publicam dados sobre o número de animais usados em experimentos. Assim, sem estatísticas regulares e precisas, o impacto dos esforços para substituir, reduzir e refinar os experimentos com animais não pode ser monitorado de forma eficaz.

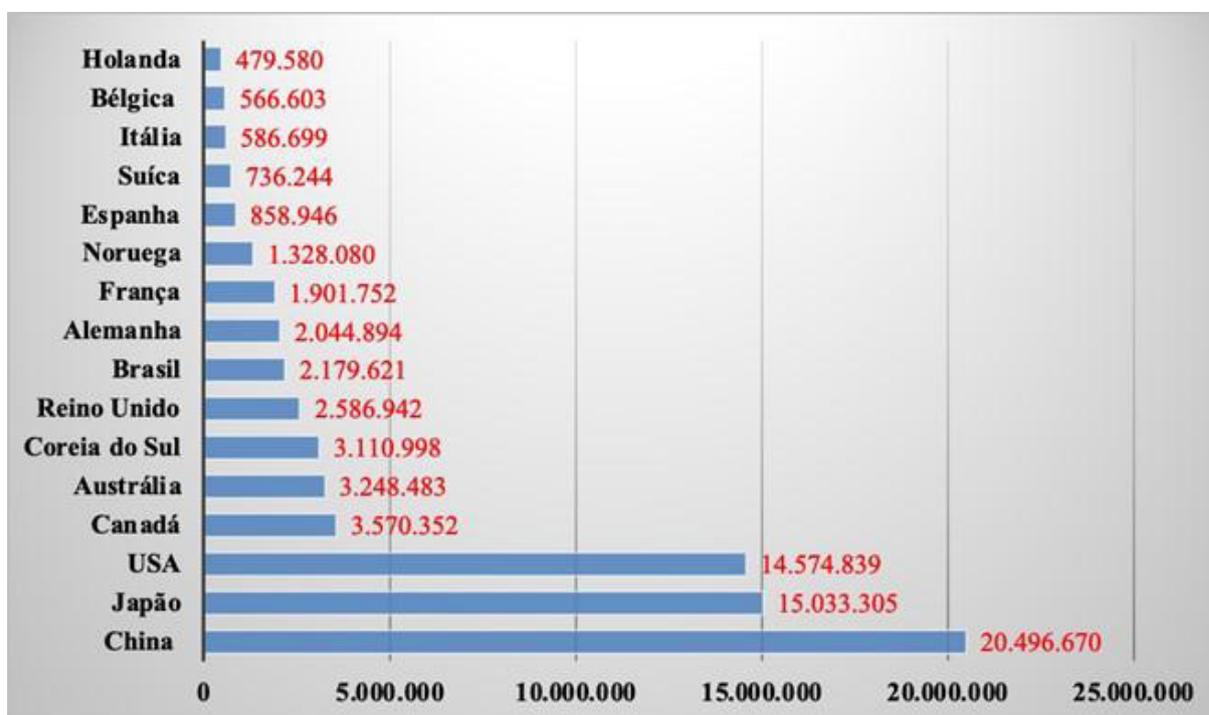


Figura 1 - Os principais países usuários de animais com base em números estimados do ano de 2015¹

Fonte: Adaptado de Taylor e Alvarez (2019).

¹ Os valores representam o número de procedimentos realizados com animais no ano de 2015. Os dados numéricos foram ajustados de acordo com as definições da União Europeia e os valores estimados foram derivados do modelo estatístico de cada estudo.

OS 3 RS

Os três Rs foram princípios propostos originalmente pelos estudiosos Russel e Burch da Federação de Universidades para o Bem-Estar Animal, os quais foram definidos como Substituição, Redução e Refinamento. A substituição envolve a adoção de alternativas aos animais protegidos, como o remanejamento para espécies não protegidas ou formas imaturas; linhagens celulares ou tecidos cultivados; modelagem matemática ou o uso de tecidos ou células humanas (com permissão), entre outras. A redução diz respeito a minimizar o número de animais usados para atingir efetivamente os objetivos de um experimento. O refinamento envolve a redução da capacidade de invasão de uma técnica ou a melhoria do bem-estar e da saúde animal durante os estudos científicos.

A ordem descrita por Russel e Burch (1959) sugere a preferência em que esses preceitos devem ser seguidos, onde a primeira prerrogativa é que animais sencientes não devem ser usados, se alternativas não sencientes estiverem disponíveis. Se o princípio da substituição não puder ser aplicado e os animais tiverem que ser usados, então entra em ação o princípio da redução, no qual o design e a análise do projeto devem ser tais que o número mínimo de animais sencientes seja usado compatível com o alcance dos objetivos da pesquisa. E em todas as situações envolvendo o uso de animais, o princípio do refinamento é essencial, onde devem ser tomadas medidas apropriadas para mitigar qualquer sofrimento ou angústia que os animais possam sentir.

Considerando a prerrogativa dos 3 Rs, parte considerável das preocupações que levam a restrições e maiores escrutínios de cientistas que fazem uso da experimentação animal residem no fato de ainda ser necessário utilizar animais sencientes nas pesquisas. Dessa forma, tentativas de substituição de animais de experimentação por medidas alternativas, com validação científica mundial, têm surgido e se tornado cada vez mais presentes na pesquisa básica.

MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE MAMÍFEROS EM PESQUISA CIENTÍFICA

O uso de animais em diversos estudos permanece inaceitável para algumas pessoas devido à constante preocupação com o bem-estar animal. A maioria dos cientistas e alguns membros do público em geral, no entanto, concordam que os testes em animais devem ser permitidos onde não houver alternativas viáveis, e desde que sejam realizados sob regulamentos estritos. Para tanto, acredita-se que é útil investigar os mecanismos subjacentes às doenças, validar novos medicamentos e fornecer informações sobre a toxicidade e as interações dos medicamentos.

De uma forma geral, há um consenso relacionado à tentativa de minimização do número de animais empregados para tais investigações científicas. Dessa maneira, alguns autores sugerem a utilização de técnicas alternativas aos testes em mamíferos, baseado no princípio da senciência, a qual apresenta evidências de que essa classe de animais teria alta capacidade de reconhecimento de sensações dolorosas e desconfortos advindos da prática experimental. Alguns desses métodos alternativos são detalhados abaixo e incluem simulações de computador e modelos matemáticos; testes *in vitro* (tecidos e células); estudos com modelos de células 3D e sistemas microfluídicos, bem como o uso de organismos inferiores que não são classificados como animais protegidos.

Simulação *in silico* e informática

A expressão *in silico* é geralmente usada para referir-se à experimentação realizada por computador e está relacionada aos termos biológicos mais comumente conhecidos *in vivo* e *in vitro*. Estas simulações computacionais podem reduzir o número de experimentos necessários, embora as simulações não possam substituir completamente os experimentos porque todos os princípios que governam um sistema geralmente não são conhecidos e as simulações usam aproximações em algum nível de detalhe devido à limitação do computador e da vida humana. Embora não sejam determinísticas, a simulação e a informática estão se tornando essenciais

em todos os campos da pesquisa científica para fazer uso eficiente do conhecimento existente no projeto de experimentos. Modelos de computador foram construídos para modelar o metabolismo humano, para estudar o acúmulo de placa de ateroma e risco cardiovascular, e para avaliar a toxicidade de drogas, tarefas para as quais os animais também são usados. Perfis de toxicidade e absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) de poluentes ambientais e cosméticos podem ser previstos usando ferramentas computacionais para modelagem biocinética de base fisiológica. De maneira semelhante, as proteínas, receptores, célula de bicamada lipídica, cérebro, dentre outras estruturas, são frequentemente simulados, em várias escalas de detalhes, a fim de prever seu comportamento ou resposta a condições físicas e/ou estimulação química.

Com o passar dos anos, a simulação computacional e métodos de informática (Figura 2) têm minimizado o número de animais utilizados na descoberta de drogas, reduzindo as moléculas candidatas a fármacos em potencial. Da mesma forma, também tem reduzido o número de experimentos com animais exigidos nas ciências biológicas básicas pelo uso eficiente do conhecimento existente. Além disso, modelos computadorizados de anatomia, em 3D de alta definição, têm sido desenvolvidos para nivelar os detalhes que podem substituir a dissecação de animais para o ensino de anatomia.

Os modelos matemáticos podem contribuir para o trabalho experimental, através da definição de variáveis e testando teorias, reduzindo o custo desses experimentos e os tornando mais eficazes, como no caso da predição da estrutura de proteínas, que poderiam prever suas propriedades físicas e químicas. Vários tipos de testes científicos podem também ser beneficiados por esses estudos, todavia, apesar de contribuir para a diminuição do número de animais utilizados, essa metodologia não dispensaria o teste final em animais ou substituto biológico (ovos fertilizados de galinha ou cultura de células, por exemplo). Nesse contexto, é sempre importante lembrar que computadores processam e armazenam conhecimentos já existentes e muitos deles foram adquiridos com a utilização de animais na pesquisa.



Figura 02 - Demonstração de simulação *in silico*

Fonte: <https://www.istockphoto.com/br>.

Culturas de células e tecido

A prática de cultura de células e tecidos é utilizada principalmente em pesquisa básica aplicada. Essas técnicas são utilizadas em larga escala, em estudos sobre a ação de quimioterápicos sobre a viabilidade de células cancerígenas, e dessa forma, esses experimentos são a base para saber se uma droga tem o potencial de cessar a proliferação desordenada de células cancerígenas. Além disso, também podem ser realizados em cultivo de células, alguns testes de toxicidade de algumas substâncias, com tais ensaios fornecendo suporte, por exemplo, para ampliar o conhecimento sobre a potencialidade de uma droga ou substância recém-descoberta ser tóxica para células de nosso organismo. Assim, células em cultura são fáceis de serem manipuladas e observadas do ponto de vista microscópico, bioquímico e molecular, após a adição de substâncias no meio onde estão sendo cultivadas (Figura 3). Entretanto, é necessário que essa mesma substância testada nas células seja estudada quando aplicada em um organismo vivo (em animais de experimentação), pois para a concretização de muitas análises experimentais, a resposta sistêmica avaliada em um organismo vivo pode apresentar vários fatores do próprio organismo que podem se tornar interferentes nos resultados.

De qualquer maneira, os estudos prévios *in vitro* auxiliam na redução do número de animais utilizados nas pesquisas. Um exemplo concreto da utilização prática de cultura de células na ciência é relacionado à pesquisa utilizando a glândula hipófise (pituitária) humana. Essas glândulas, as quais eram provenientes de doadores cadáveres, eram utilizadas para extração do hormônio do crescimento para ser oferecido no tratamento de crianças com deficiência na produção desse hormônio. Após a constatação de contaminação de algumas crianças com doenças infecciosas provenientes do doador, essa prática caiu em desuso. A bioengenharia utilizando a bactéria *Escherichia coli* tornou a produção desse hormônio mais eficiente sem o risco de contaminações. Outro exemplo são os tecidos coletados de biópsias de mama, os quais podem ser utilizados, por exemplo, para estudar o desenvolvimento de câncer nesse órgão. Além disso, células derivadas de tecidos de outros órgãos podem ser utilizadas para os mais diferentes propósitos científicos.



Figura 3 – Demonstração de cultivo celular

Fonte: <https://www.istockphoto.com/br>.

Modelos microfluídicos (órgãos em chips) e cultura de células 3D

Com o avançar da ciência e tecnologia, alguns modelos de tecidos foram construídos usando cultura de células tridimensionais (3D), bem como alguns chips contendo modelos de órgãos. Geralmente, esses modelos são construídos com a ajuda de células humanas, o que minimiza a necessidade do uso animal, além de funcionarem como excelentes estratégias de compreensão do que acontece nas células humanas em condições fisiológicas e patológicas. Esses modelos também fornecem melhor controle sobre as condições investigativas, bem como experimentação mais rápida e conveniente e vão além das alternativas à experimentação animal, uma vez que esta tecnologia em combinação com as células-tronco pluripotentes induzidas emergentes (IPSC) está se movendo no sentido de fazer órgãos e tecidos implantáveis. Modelos de sistemas de múltiplos órgãos englobando coração, músculo, pele, cérebro, testículos, medula, intestino, rim, pulmões, fígado, bem como órgãos individuais, foram feitos em canais microfluídicos, juntamente com a recriação de microambientes físicos e químicos relevantes. Essas técnicas também chamadas de sistemas biomédicos ou biológicos microeletromecânicos (Bio-MEMS) ou *lab-on-a-chip* (LOC) (Figura 4) e sistemas de análise micro total apresentam grande potencial de substituição de muitos testes em animais em laboratórios comerciais no setor farmacêutico, indústrias de biotecnologia, química e segurança ambiental.

Dentre os sistemas microfisiológicos existentes, os que são caracterizados pelo cultivo de tecidos humanos organizados em histoarquitetura tridimensional em dispositivos microfluídicos foram recentemente introduzidos, como sendo os mais promissores. Fatores solúveis, gradientes, concentração de gás, fluxo de fluido, composição da matriz extracelular, propriedades mecânicas e geometria são alguns dos parâmetros que a tecnologia microfluídica permite controlar de forma mais precisa. Os modelos microfluídicos, dentre todas as suas potencialidades de aplicação, representam um passo importante para a recapitulação de um ambiente de ferida de pele que se assemelha à situação *in vivo*. Recentemente, um sistema *lab-on-a-chip* capaz de induzir mecanicamente áreas livres de células circulares, dentro de camadas de células confluentes em um ambiente microfluídico, foi desenvolvido para permitir a indução automatizada, miniaturizada e integrada de feridas definidas. Aspectos investigados, usando dispositivos microfluídicos, incluem o controle de infecção de biofilme para feridas crônicas, uma investigação quantitativa de migração e proliferação celular, migração de células de músculo liso vascular, interações célula-célula e célula-matriz extracelular, migração de células endoteliais ou germinação na presença de gradientes de fator de crescimento e tensão de cisalhamento.

Nesse contexto de avanço biotecnológico, as células cultivadas em formato tridimensional, conhecidas como cultura de células 3D, permitem um crescimento de células em agregados 3D ou esferoides usando um andaime, matriz ou de forma livre de andaime. A condição de cultura 3D pode ser modificada para incluir fatores ou proteínas encontrados em determinado tecido ou microambiente tumoral. As matrizes contêm componentes da matriz extracelular que levam ao aumento do contato célula-célula, comunicação e ativação da via de sinalização, de modo que a diferenciação funcional e morfológica da célula pode ser amplamente restaurada para o que é visto *in vivo*. Assim, os níveis de expressão de genes e proteínas nessas células e, portanto, os comportamentos celulares são semelhantes aos níveis *in vivo*. Portanto, o conjunto dessas características encontradas nesse modelo de investigação científica preenche diversas lacunas existentes entre a triagem de drogas *in vitro* e *in vivo*, possivelmente diminuindo o uso de modelos animais.

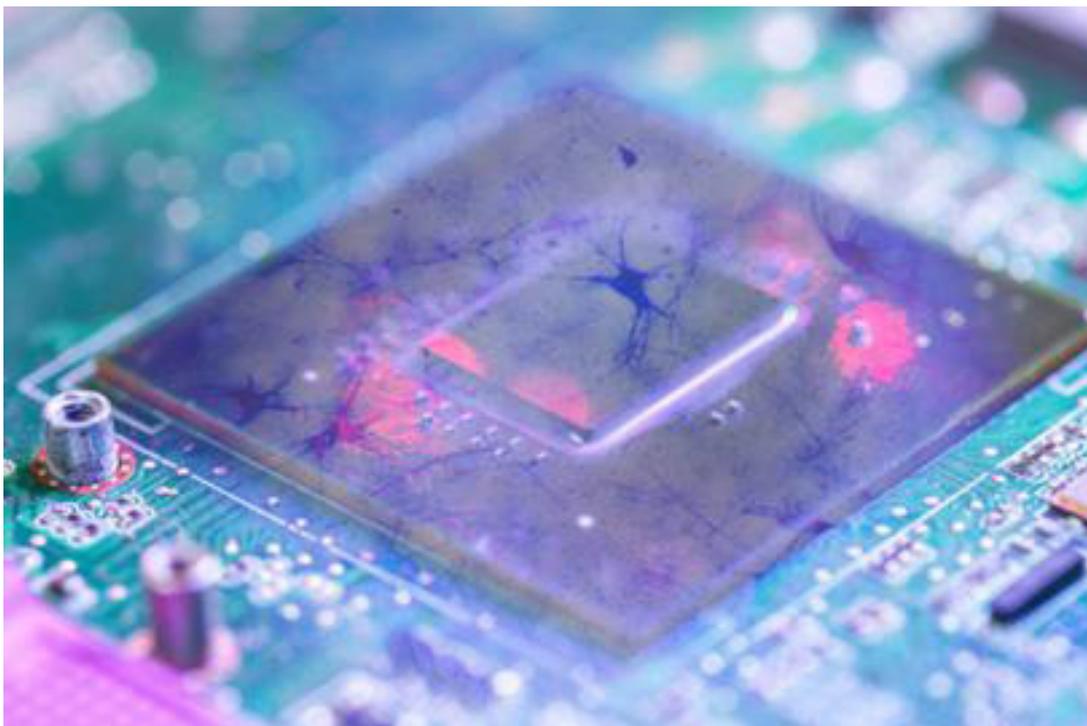


Figura 04 – Órgão em chip (neurônio com Chip de CPU com pouca luz)

Fonte: <https://www.istockphoto.com/br>

Peixe-Zebra (*Zebrafish*)

Apesar do grande número de métodos alternativos disponíveis, o uso de vertebrados ainda é imprescindível para algumas áreas da ciência devido à sua elevada complexidade biológica e semelhança com os humanos. A utilização do zebrafish (*Danio rerio*) como modelo experimental tem crescido rapidamente para a pesquisa biomédica. Pesquisadores do mundo todo estão se interessando cada vez mais por esse pequeno peixe tropical de água doce e uma das razões mais difundidas é que os embriões dessa espécie, ao contrário dos de camundongos, se desenvolvem fora do organismo materno e são transparentes. Essa é uma grande vantagem que permite aos pesquisadores estudar detalhadamente o desenvolvimento embrionário dos vertebrados, sem a necessidade de procedimentos invasivos. Outro fator benéfico é que o zebrafish pode produzir de 200 a 300 ovos fertilizados por semana e completa sua embriogênese em 72h. E ainda, os adultos e os embriões dessa espécie são de tamanho pequeno, tem menor custo e o intervalo entre gerações é curto.

O pequeno peixe de água doce *Danio rerio*, conhecido como peixe-zebra devido à coloração do seu tegumento (Figura 5), é comumente usado para pesquisas básicas e estudos de modelos de doenças. Vários recursos tornam o peixe-zebra um sistema de pesquisa valioso, pela sua semelhança do genoma com humanos, fácil manipulação genética, transparência embrionária, rápido desenvolvimento embrionário e grande número de descendentes. Outra vantagem é o menor desenvolvimento neurológico em comparação aos mamíferos, provavelmente implicando redução na percepção da dor e suscetibilidade ao estresse. O peixe-zebra é usado como um sistema modelo para biologia e patologia da pele, pois possui uma pele composta por uma epiderme e uma derme colágena, separadas por uma membrana basal. O peixe-zebra é usado para estudos de cicatrização de feridas, pois os principais eventos encontrados no reparo da pele de mamíferos estão presentes, embora o ambiente líquido circundante represente uma grande diferença objetiva para os humanos. O peixe-zebra é amplamente utilizado também em estudos relacionados à melanogênese, distúrbios de pigmentação e melanoma.



Figura 5 - Peixe-Zebra (*Danio rerio*)

Fonte: <https://www.istockphoto.com/br>.

Na verdade, células de pigmento preto originadas da crista neural (melanóforos) estão presentes na derme e se comportam de forma semelhante aos melanócitos humanos. Quanto aos estudos de melanoma, peixes-zebra geneticamente modificados expressando oncogenes de melanoma recapitulam a gênese e o desenvolvimento do melanoma. As doenças de pele hereditárias que afetam a adesão celular e os distúrbios de queratinização também foram reproduzidos no peixe-zebra. As limitações no uso do peixe-zebra como modelo animal de pele incluem a falta de uma barreira epidérmica e de apêndices, e a presença de escamas nos peixes adultos. No entanto, a falta de barreira epidérmica permite a triagem sistêmica de drogas, simplesmente adicionando compostos à água.

Drosophila

Apesar de estar tão distante dos humanos filogeneticamente, a mosca da fruta *Drosophila melanogaster* (Figura 06) é usada como modelo animal para elucidar as redes moleculares subjacentes à fisiologia da pele. A *D. melanogaster* possui epiderme de camada única e tem sido amplamente utilizada para estudos de fechamento de feridas. De fato, vários *insights* sobre os mecanismos moleculares subjacentes ao comportamento das células epiteliais no reparo da pele foram obtidos usando o modelo de fechamento dorsal larval de *D. melanogaster*.

Outros campos dermatológicos que usam modelos de mosca da fruta são o envelhecimento e distúrbios imunológicos. Além disso, a *D. melanogaster* também tem sido usada para identificar mecanismos moleculares subjacentes a doenças de pele genéticas humanas. Os modelos de *D. melanogaster* são convenientes por serem geneticamente tratáveis e, devido ao grande número de descendentes gerados, permitem análises de alto rendimento. No entanto, a transferência de resultados para doenças dermatológicas humanas é limitada pelas diferenças estruturais e fisiológicas da pele humana.



Figura 6 – Mosca-das-frutas macho (*Drosophila melanogaster*)

Fonte: <https://www.istockphoto.com/br>

Microrganismos

Alguns micro-organismos, como bactérias (Figura 7) e leveduras, são aceitos como modelos para investigação de fatores associados ao metabolismo, à genética e à bioquímica. Como uma das práticas mais comuns relacionadas a esse recurso, encontram-se os estudos associados aos fundamentos dos mecanismos de expressão gênica desses organismos, os quais são aplicáveis para a compreensão do desenvolvimento saudável e patológico de embriões humanos. Dentre as justificativas para o uso desses modelos como possíveis alternativas de substituição do uso animal na pesquisa científica, existem alguns estudos mostrando que algumas semelhanças são preservadas entre esses micro-organismos e mamíferos, como, por exemplo, as leveduras que possuem receptores de estrogênio, os quais apresentam afinidade idêntica aos encontrados em útero de ratas, e dados como estes reforçam a validade científica do uso desses seres, como modelos de pesquisa, que podem ser úteis na tentativa de minimizar o número de animais protegidos em testes de laboratório, apesar de não substituírem totalmente os mamíferos por diversos outros fatores inerentes à diferença fisiológica entre tais espécies.

Outro exemplo de micro-organismos utilizado atualmente em investigações científicas são os vírus, os quais podem ser empregados em benefício da saúde humana e de forma indireta minimizar o uso de animais de laboratório, em termos de quantidade, pelo fato de possibilitar, através do seu estudo, a aplicação de metodologias modernas, como a tecnologia do DNA recombinante e, dessa forma, tornar mais concretas e objetivas algumas pesquisas, diminuindo a necessidade de rastreios farmacológicos que costuma usar uma quantidade muito alta de animais na pesquisa básica. Nesse contexto, a terapia gênica tem utilizado algumas espécies de vírus, como veículos para transportar genes normais para células de tecidos acometidos por doenças genéticas, então quando o vírus (modificado para que não cause doença) infecta a célula hospedeira, ele transfere o gene que os pesquisadores inseriram no seu genoma, fazendo com que a célula do hospedeiro expresse o gene de interesse. O desenvolvimento de tecnologias como essa tem aperfeiçoado cada vez mais o poder investigativo de muitos pesquisadores ao redor do mundo, sem a necessidade de uso de quantidades alarmantes de animais para isso.



Figura 7 – Cultura de bactérias aeróbias na placa de ágar

Fonte: <https://www.istockphoto.com/br>.

A figura 8 traz uma comparação dos pontos fortes e fracos dos modelos experimentais citados no presente capítulo, usando uma escala relativa, com informações acerca de complexidade, limitações experimentais, potencial para manipulação, isolamento de variáveis, compreensão mecânica e valor terapêutico.

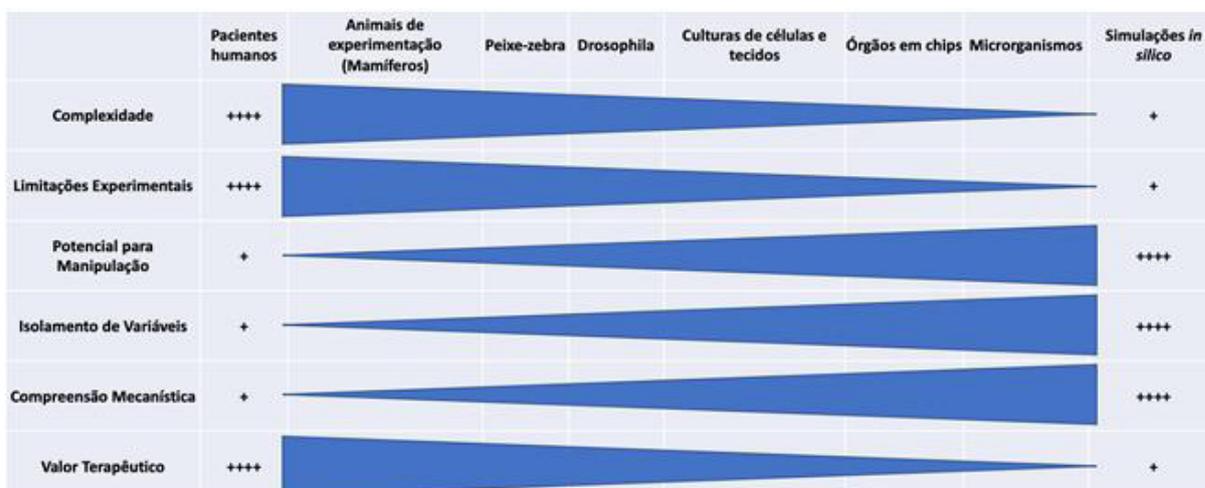


Figura 8 - Comparação dos pontos fortes e fracos dos modelos experimentais disponíveis usando uma escala relativa

Fonte: Elaborado pela autora.

POR QUE O USO DE ANIMAIS EM PESQUISA AINDA SE FAZ NECESSÁRIO?

Desde 1901, dois terços dos ganhadores do Nobel de Fisiologia ou Medicina confiaram em dados de animais para suas pesquisas. Ratos, camundongos e outros roedores representam 95% de todos os animais usados e os primatas não humanos representam 0,33%. Ao lado da constituição genética, existem muitas semelhanças anatômicas entre esses animais e o ser humano, pois eles possuem um mesmo conjunto de órgãos como coração, fígado, rins, pulmão e outros tecidos. Além de possuírem o mecanismo interno do corpo e fisiologia semelhantes, como sistema circulatório, respiratório, nervoso, endócrino, dentre outros. Portanto, essas semelhanças tornam algumas espécies animais propensas ao uso em laboratório.

Nos séculos XIX e XX, as maiores descobertas de drogas só foram possíveis devido ao uso de animais. Ao longo do último século, todo Prêmio Nobel de pesquisa médica dependeu da pesquisa animal. O primeiro Prêmio Nobel em 1901 em Medicina foi para soroterapia e pesquisas envolvendo o uso de cavalos. Na década de 1880, Behring usou cavalos para a produção de antitoxina diftérica e para o desenvolvimento de uma vacina contra a difteria e o tétano, ganhando o primeiro prêmio Nobel de fisiologia ou medicina em 1901. A insulina foi isolada pela primeira vez em cães em 1922 e revolucionou o tratamento do diabetes. Na década de 1970, o tratamento com antibióticos e vacinas para a hanseníase foi desenvolvido com tatus. Domagk introduziu a atividade antibacteriana do prontossil em 1939, por meio de experimentos com frango. Os mais recentes ganhadores do Nobel de Fisiologia ou Medicina em 2020 também trabalharam com animais, especificamente com chimpanzés, na pesquisa relacionada à descoberta do vírus da Hepatite C.

Animais ainda são permitidos e necessários para triagem de drogas em bioensaios e para testes pré-clínicos, incluindo estudos de toxicidade gerais e específicos. Esses dados pré-clínicos de segurança e eficácia são necessários para o envio às autoridades regulatórias de medicamentos antes que a permissão para estudos adicionais em humanos seja concedida. Além disso, os animais têm sido considerados bons modelos para estudos das doenças humanas, bem como para a obtenção de conhecimentos biológicos básicos; a descoberta e desenvolvimento de medicamentos, vacinas e dispositivos médicos; nos testes de segurança de medicamentos, outros produtos químicos e de consumo; em pesquisa ambiental e na qualificação de pessoal de nível superior e mão de obra especializada para a realização de pesquisas.

As experimentações animais podem incluir pesquisa básica (por exemplo, comportamental, embriológica, fisiologia e genética) que é necessária para contribuir indiretamente para a remediação de doenças humanas e pesquisa aplicada (acadêmica e/ou comercial), como patologia, farmacologia, toxicologia, teste de drogas e pesquisa de patógenos. Um número maior e uma variedade maior de animais são usados na pesquisa básica do que na pesquisa aplicada, que geralmente envolve estudos sobre embriogênese, biologia do desenvolvimento, comportamento e reprodução em moscas-das-frutas, nematoides, camundongos e ratos. A pesquisa aplicada visa responder a questões específicas e é geralmente realizada na indústria farmacêutica ou por universidades. Modelos animais de doenças, descobertos ou gerados por programas de pesquisa básica, são usados para pesquisa aplicada. Os exemplos incluem o uso de animais transgênicos, modelos animais de doenças que ocorrem naturalmente, modelos animais induzidos de doenças humanas e estudos de toxicidade.

A pesquisa animal é, portanto, essencial para o avanço de novas tecnologias e medicamentos cruciais para melhorar a saúde humana e animal. Também é vital para a nossa compreensão da biologia animal e humana fundamental, bem como de áreas essenciais da ciência animal aplicada, como a forma como os animais funcionam em face das mudanças climáticas ou distúrbios antropogênicos. Além disso, estudos que exploram a saúde e o bem-estar animal nos permitem gerenciar os animais em cativeiro, de maneira mais eficaz e prevenir o mal-estar que leva às doenças.

Contudo, apesar da grande diversidade de motivos que tornam a pesquisa animal necessária, os cientistas são cada vez mais solicitados a justificar suas abordagens experimentais ao usar animais protegidos. Isso é parcialmente motivado por demandas do público em geral de que o uso de animais em pesquisas deve ser moral e eticamente justificável. Uma pesquisa recente nos EUA demonstrou que 50% do público se opôs ao uso de

animais em pesquisas. Em 2015, nove países europeus apresentaram uma petição à Comissão Europeia (CE) para proibir a pesquisa em animais. No entanto, a CE se opôs a esse movimento, mas respondeu afirmando que a justificativa ética e a adoção do Princípio dos 3Rs (Substituição, Redução e Refinamento) é uma obrigação para estudos experimentais. Obviamente, é do interesse dos cientistas adotar uma abordagem ética e humana para a criação e o projeto experimental, já que animais saudáveis produzem resultados robustos e confiáveis, subjacentes a produções científicas válidas. Por exemplo, a melhoria no manejo de roedores reduz o estresse, e isso leva a dados menos variáveis e resultados mais significativos. A incorporação do princípio dos 3Rs no planejamento e execução científicos, portanto, beneficia diretamente a qualidade dos dados.

O PRINCÍPIO DA SENCIENTIA ANIMAL VERSUS USO DE MAMÍFEROS NA PESQUISA

O uso de animais não humanos como modelos em pesquisas e testes de fármacos é uma prática fundamental pela qual o conhecimento científico contemporâneo é certificado. A pesquisa com animais representa o principal método de investigação científica requerido. Por exemplo, Rupke (1987) argumenta que a vivisseção foi imprescindível para a medicina se transformar de uma arte em uma ciência, porque fazer uso dessa prática significava utilizar o método experimental.

A incongruência central da pesquisa animal é que animais não humanos são usados como modelos, porque são vistos como carentes de certas capacidades conscientes, contudo são usados exatamente por causa de suas semelhanças biológicas com os humanos, dentre as quais está a sua capacidade de sentir. Esta incoerência é refletida no princípio dos 3Rs, no qual a ideia de substituir, reduzir e refinar o uso de animais em pesquisa repousa em uma compreensão particular de senciência.

A definição de senciência é a capacidade de perceber pelos sentidos, uma capacidade de sentir ou experimentar subjetivamente, baseado no princípio de que o animal deve estar consciente para que algo seja percebido ou experimentado. Isso significa que o animal está ciente das sensações, sentimentos, emoções e outras saídas subjetivas do processamento neural de entradas sensoriais geradas tanto de dentro, quanto de fora do corpo. Por esta definição, portanto, os animais que são sencientes devem possuir a capacidade de serem conscientes.

Pode-se inferir que um animal está consciente, quando exhibe flexibilidade comportamental, incluindo capacidades para direcionar a atenção para estímulos relevantes, para determinar respostas apropriadas à situação, sob novas condições e para se envolver em comportamentos volitivos direcionados a objetivos.

Ter a capacidade de sentir dor é suficiente para a senciência. As evidências disponíveis apoiam a tese de que mamíferos e pássaros são seres caracteristicamente sencientes, embora também haja fortes evidências de senciência da maioria das espécies de vertebrados e, entre os invertebrados, pelo menos os cefalópodes. Assim, partindo do princípio da senciência animal, atualmente há um questionamento sobre o fato desse aumento aparentemente muito significativo no uso de animais de laboratório em todo o mundo realmente ser necessário, surgindo assim motivações éticas voltadas para uma busca constante de substituição dessa prática a partir da exploração de novas possibilidades na ciência experimental.

ADVENTO DE MÉTODOS NÃO ANIMAIS NO BRASIL

Em 2008, após a introdução da Lei Arouca, grande esforço tem sido feito no Brasil para reforçar a importância do bem-estar animal e a promoção do princípio dos Três R's. A primeira chamada (nº 25/2012) de propostas de bolsas específicas para métodos alternativos no Brasil foi realizada em 2012 pelo então Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), hoje Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicação (MCTIC) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) para apoiar projetos relacionados à estruturação da Rede Nacional de Métodos Alternativos (Renama), a qual foi criada ainda em 2012 pelo MCTI, com o objetivo de otimizar o uso dos recursos públicos na ciência e promover o desenvolvimento, implementação e aceitação de métodos alternativos no Brasil. Nessa chamada, foram

selecionados dez projetos que assentaram em alguma das seguintes áreas de investigação: (I) implementação de métodos alternativos já validados e reconhecidos internacionalmente; e (II) o desenvolvimento e validação de um modelo de pele humana reconstituída pela *Organisation for the Economic Co-operation and Development Test Guideline* (OECD, TG 439), na forma de um kit, para testes de segurança e eficácia. Nessa época, o Brasil conquistou reconhecimento internacional por seu trabalho na formação e treinamento de pesquisadores no desenvolvimento e/ou implantação de métodos substitutivos, tendo sido reconhecido pelo prêmio global Lush Prize, criado em 2012 pela empresa britânica de cosméticos Lush, e pela organização não governamental *Ethical Consumer Research Association*.

Em 2016, o MCTIC implantou a Plataforma Regional de Métodos Alternativos ao Uso de Animais (PReMASUR), composta pelos países do Mercosul, a qual visa estabelecer uma infraestrutura laboratorial e prover recursos humanos especializados para promover métodos alternativos no Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai. Laboratórios com experiência em métodos alternativos, incluindo aqueles associados à Renama, realizam sessões anuais de treinamento teórico/prático em diferentes métodos *in vitro*, cobrindo vários parâmetros toxicológicos.

Embora tenha havido muitos avanços, o progresso em alternativas que não sejam animais ainda é restrito, dificultando o uso generalizado de muitas práticas livres de animais em Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (PD&I). Além disso, a pesquisa no Brasil é cara, muitos materiais de laboratório usados em PD&I são importados e, após os custos de transporte, desembaraço aduaneiro e tarifas brasileiras, seu custo original é, pelo menos, triplicado. O tempo necessário para a liberação dos trâmites aduaneiros burocráticos representa outro obstáculo, impossibilitando a importação de produtos de origem humana (tecidos e células) em um prazo viável (em média 3 dias). Por exemplo, modelos reconstruídos de tecidos vivos (como pele, córnea, membranas mucosas etc.) os quais são comercializados em vários países, não poderiam ser solicitados e tê-los entregues e disponíveis para uso no Brasil, dentro do prazo de validade, o que atrasa a pesquisa e a inovação e leva ao aumento dos custos.

Apesar das dificuldades, podem-se mencionar alguns avanços, como o fato do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) ter publicado, em 2018, a Resolução nº 38/2018, a qual prevê restrições ao uso de animais na educação e afirma que é proibida a utilização de animais em atividades didáticas demonstrativas e observacionais que não visem o desenvolvimento psicomotor e outras habilidades dos alunos envolvido. A resolução proíbe a morte de animais para dissecação anatômica e experimentos envolvendo o uso de animais vivos ou “preparações” clássicas feitas de tecidos de animais mortos recentemente. A referência à aquisição de habilidades significa que a proibição não se refere a aulas práticas para aquisição de habilidades clínicas e treinamento em cirurgia, nem qualquer treinamento na condução de experimentos com animais de laboratório para fins de pesquisa e teste. Também exclui estudos de pós-graduação e cursos vinculados à saúde e ao bem-estar dos animais de fazenda, relacionados à produção animal. A resolução exige a implementação de alternativas de substituição e afirma que, a partir de 2019, o uso de animais na educação deve ser totalmente substituído por vídeos, modelos de computador ou outros recursos com conteúdo e qualidade suficientes para manter ou melhorar as condições de aprendizagem.

EXEMPLOS DE MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS ATUALMENTE UTILIZADOS

Atualmente, há muitos testes em uso ou em etapas de verificação avançadas, na tentativa de substituição ao uso de animais em pesquisas focadas principalmente na avaliação toxicológica. Há alguns anos, os testes de irritabilidade de substâncias eram frequentemente realizados aplicando determinados produtos diretamente sobre a córnea de coelhos, os quais ficaram conhecidos como teste de irritação ocular de Draize. Vários testes foram desenvolvidos para substituir essa prática, tais como o teste do ovo de galinha ou teste da membrana corioalantóide, o qual utiliza ovos de galinha fertilizados para avaliar a irritabilidade da membrana corioalantóide, que possui uma grande quantidade de vasos sanguíneos, assim esses testes podem ser usados para classificar

o nível de irritação de uma substância-teste avaliando episódios hemorrágicos, de lise ou coagulação. Outro exemplo de substituição do ensaio de Draize é o teste de opacidade/permeabilidade da córnea bovina (OECD TG 437), no qual são testadas a opacidade (quantidade de transmissão de luz pela córnea) e permeabilidade (quantidade de passagem do corante de fluoresceína de sódio) de córneas providas de olhos de bovinos recém-abatidos obtidos em um matadouro local. Olhos de galinha (OECD TG 438) e de coelho isolados de animais mortos (que seriam descartados), bem como o modelo de monocamada de células renais caninas Madin-Darby (OECD TG 460) são também utilizados como modelos para teste de irritação ocular.

Além disso, existem também modelos epiteliais 3D disponíveis comercialmente, como o EpiOcular™, que é um preparado com queratinócitos epidérmicos derivados da pele humana e o SkinEthic™ com células epiteliais da córnea humana imortalizadas (HCE), os quais foram desenvolvidos para testes de irritação de pele *in vitro* (OECD TG 492). Outra alternativa para o teste de irritação da pele de animais *in vivo* é o ensaio de captação de vermelho neutro (NRU), que representa um teste de viabilidade de queratinócitos humanos, que têm sido usados para prever toxicidade sistêmica aguda e predição de foto toxicidade aguda. O ensaio Corrositex™ (OECD TG 435) é um método *in vitro* também validado para avaliar o potencial corrosivo da pele, esse teste apresenta o potencial de substituir experimentos dolorosos com animais, medindo o tempo necessário para passar por uma barreira biológica, contendo corantes indicadores de pH (OECD, 2014). Como métodos de teste de irritação cutânea *in vitro*, muitos modelos de epitélio humano reconstruído (RhE) feitos de queratinócitos humanos primários não transformados estão sendo estudados (OECD TG 439), dentre eles podem-se citar como já validados o EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ RhE e LabCyte EPI MODEL (OECD, 2013) e o modelo Keraskin™ (Biosolution Co., Seul, Coreia do Sul) que tem se mostrado em estágio de pré-validação.

A penetração de produtos químicos, através do estrato córneo para os queratinócitos subjacentes pode causar lesão e induzir inflamação, dilatação das células endoteliais e subsequente irritação da pele, eritema e edema. Em 2016, Wufuer e colaboradores relataram o desenvolvimento da tecnologia *skin-on-a-chip* para testar a toxicidade cutânea de cosméticos ou medicamentos. O modelo de Wufuer e colaboradores consiste em células HaCaT, fibroblastos HS27 e células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) como substitutos de células epiteliais, fibroblastos e células endoteliais de vasos sanguíneos, respectivamente, e permite avaliar informações precisas sobre viabilidade celular e inflamação da pele, mensurando, inclusive, perfis de citocinas inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e IL-8.

O celenterado de água doce *Hydra vulgaris* também representa uma alternativa de substituição ao uso de mamíferos em pesquisa científica, esta espécie apresenta potencial para uso em testes de toxicidade aguda, subaguda e crônica com desfechos de sobrevivência/mortalidade e mudanças morfológicas na estrutura.

Outra espécie animal menos evoluída que tem sido utilizada na tentativa de reduzir o número de mamíferos em testes de laboratório e que se tornou um importante modelo para estudar a biologia do desenvolvimento, desde a década de 1970, é a *Caenorhabditis elegans*, uma espécie de nematódeo da família Rhabditidae que mede cerca de 1 milímetro de comprimento, e vive em ambientes temperados. *C. elegans* trata-se de um organismo de teste toxicológico popular para vários desfechos de toxicidade, incluindo reprodução e dano/reparo de DNA. Uma forma de avaliar a interferência de determinadas substâncias testadas no desenvolvimento desses animais é analisando o número de ovos não eclodidos de *C. elegans* expostos a compostos, por exemplo.

Outro modelo bem conhecido, já utilizado há vários anos e que vem sendo cada vez mais aplicado atualmente é a espécie *Danio rerio*, conhecido pela terminologia inglesa *Zebrafish*, ou peixe-zebra em português. Trata-se de um peixe tropical teleosteo, da família dos Ciprinídeos. É um importante organismo modelo, frequentemente utilizado em pesquisas genéticas e análises voltadas para a biologia do desenvolvimento. Sua notável capacidade de regeneração tem sido importante para a criação de linhagens transgênicas. O embrião de peixe-zebra também surgiu como modelo alternativo, para monitorar a toxicidade do desenvolvimento, neurotoxicidade e toxicidade cardiovascular, além de estar sendo investigado atualmente em pesquisas envolvendo a busca de novas terapias para o câncer.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E O QUE SE ESPERA PARA O FUTURO

O uso de animais, tanto no ensino quanto na pesquisa, ainda gera muitas polêmicas. Ainda assim, não se pode negar que a obtenção de conhecimento, bem como várias substâncias essenciais à saúde humana, como medicamentos e vacinas foram e continuarão a ser desenvolvidas graças a esses experimentos. Embora vários métodos *in vitro* tenham sido sugeridos para minimizar o uso de modelos animais para testes de drogas e produtos químicos, eles têm várias limitações e desvantagens, como, por exemplo, a falta de metabolismo sistêmico em condições de cultura. Consequentemente, as reações de longo prazo e sistêmicas não podem ser simuladas *in vitro* devido à falta de interações entre os diferentes tipos de células. No entanto, apesar de não ser capaz de substituir totalmente o uso de animais de experimentação, tais testes têm sido propostos para reduzir o número de animais necessários e mitigar seu uso indiscriminado. As vantagens desses testes alternativos incluem experimentos rápidos, condições controladas, redução subsequente da variabilidade entre os testes e resultados relativos acurados associados às células de origem humana.

Dessa forma, é possível inferir que, na atual conjuntura, a total exclusão do uso de animais na pesquisa experimental ainda representa uma realidade difícil de ser alcançada, pois apesar de todas as novas possibilidades que têm surgido através de métodos alternativos, nenhuma dessas medidas apresenta-se eficaz na substituição total e completa do uso animal, sendo necessária ainda a utilização deles em pelo menos uma das fases da pesquisa. Assim, apesar do consenso de utilização de métodos alternativos ao uso animal sempre que possível, o mais sensato seria admitir que há métodos complementares, mas que as limitações das ferramentas atualmente disponíveis mostram que tais modelos ainda não podem ser considerados totalmente substitutivos, o que faz prevalecer a ideia de minimização, sempre que possível, da quantidade de animais utilizados em propósitos científicos, principalmente mamíferos e outras espécies com a percepção de sentiência mais aguçada, associando diferentes técnicas às alternativas já existentes, além da constante busca pelo refinamento das metodologias utilizadas, para que o desconforto animal seja reduzido ao mínimo.

REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, M. L.; WINTER, L. M.F. Animal models in biological and biomedical research - experimental and ethical concerns. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 91, supl. 1, e20170238, 2019.
- ANGELO C. Brazil freezes science spending. **Nature.**, v. 568, p. 155-156, 2019.
- ARORA, T. et al. Substitute of animals in drug research: an approach towards fulfillment of 4R's. **Indian J Pharm Sci.**, v. 73, p. 1-6, 2011.
- BEKOFF, M.; Are You Feeling What I'm Feeling? **New Scientist**, v. 123, p. 42-47, 2007.
- BENNETT, A. J.; RINGACH, D. L. Animal research in neuroscience: a duty to engage. **Neuron.**, v. 92, p. 653-657, 2016.
- DE ÁVILA, R. I.; VALADARES, M. C. Brazil Moves Toward the Replacement of Animal Experimentation. **Altern Lab Anim.**, v. 47, p. 71-81, 2019.
- DEMUYSER, L.; VAN DIJCK, P. Can *Saccharomyces cerevisiae* keep up as a model system in fungal azole susceptibility research? **Drug Resist Updat.**, v. 42, p. 22-34, 2019.
- DINESH K. B.; CHETNA D. Animal use in pharmacology education and research: The changing scenario. **Indian J Pharmacol.**, v. 46, p. 257-265, 2014.
- DE VECCHI, R.; DAKIC, V.; MATTOS, G. Implementation, availability and regulatory status of an OECD accepted reconstructed human epidermis model in Brazil. **Vigil Sanit Debate**, v. 6, p. 64-71, 2018.
- FAZIO, M. et al. Zebrafish patient avatars in cancer biology and precision cancer therapy. **Nat Rev Cancer**. v. 20, p. 263-273, 2020.

GIBBS, C. J. et al. Chemical and pathological features and laboratory confirmation of Creutzfeld-Jakob disease in a recipient of pituitary-derived human growth hormone. **N. Engl. J. Med.** v. 313, p. 731, 1985.

KEHINDE, E. O. They see a rat, we seek a cure for diseases: the current status of animal experimentation in medical practice. **Med Princ Pract.**, v. 22, p. 52-61, 2013.

KIRK, R.G.W. Recovering the principles of humane experimental technique: The 3Rs and the human essence of animal research. **Science, Technology and Human Values**, v. 43, p. 603-29, 2018.

LIEBSCH, M. et al. Alternatives to animal testing: current status and future perspectives. **Arch Toxicol.**, v. 85, p. 841-858, 2011.

MARIA GARCIA, R. C. et al. Brazil starts to ban animal use in higher education: A positive and progressive development. **Altern Lab Anim.**, v. 46, p. 235-239, 2018.

MELLOR, D.J. Galloping colts, fetal feelings and reassuring regulations: Putting animal welfare science into practice. **J. Vet. Med. Educ.**, v. 37, p. 94-102, 2010,

MELLOR, D. J.; LENTLE, R. G. Survival implications of the development of behavioural responsiveness and awareness in different groups of mammalian young. **N. Z. Vet. J.**, v. 63, p. 131-140, 2015.

RUSSELL, W.M.S.; BURCH, R.L. The Principles of Humane Experimental Technique. **Methuen & Co Ltd.**, London, UK: 1959.

ŠPINKA, M. Animal agency, animal awareness and animal welfare. **Anim. Welf.**, v. 28, p. 11-20, 2019.

SNEDDON, L. U.; HALSEY, L. G.; BURY, N. R. Considering aspects of the 3Rs principles within experimental animal biology. **J Exp Biol.**, v. 220, p. 3007-3016, 2017.

TAYLOR, K.; ALVAREZ, L. R. An Estimate of the Number of Animals Used for Scientific Purposes Worldwide in 2015. **Altern Lab Anim.**, v. 47, p. 196-213, 2019.

TAYLOR, K. et al. Estimates for worldwide laboratory animal use in 2005. **Altern. Lab. Anim.**, v. 36, p. 327-342, 2008.

VANDEBRIEL, R. J.; VAN LOVEREN, H. Non-animal sensitization testing: State-of-the-art. **Cri Rev Toxicol.**; v. 40, p. 389-404, 2010.

WEARY, D.M.; DROEGE, P.; BRAITHWAITE, V.A. Behavioural evidence of felt emotions: Approaches, inferences and refinements. **Adv. Stud. Behav.**, v. 49, p. 27-48, 2017.

SOBRE OS ORGANIZADORES

EDITOR:

Eduardo Carvalho Lira

REVISÃO TÉCNICA:

Joel Majerowicz

AUTORES:

Glória Isolina Boente Pinto Duarte

José Jairo Teixeira da Silva

Eduardo Carvalho Lira

Dayane Aparecida Gomes

Leucio Duarte Vieira Filho

Valéria Nunes de Souza

Ismaela Maria Ferreira de Melo

Samara Rodrigues Bonfim Damasceno Oliveira

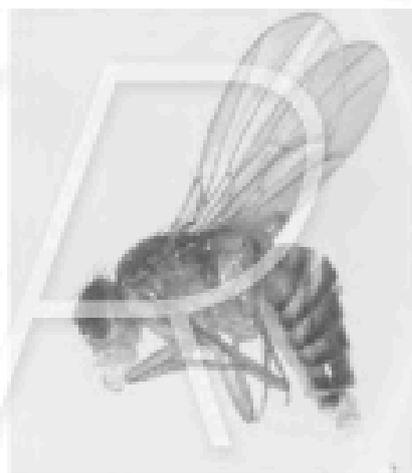
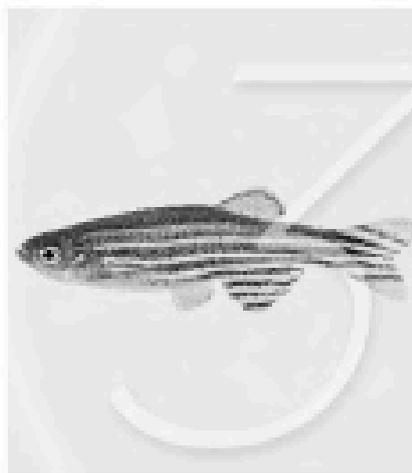
BIOÉTICA E MANEJO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO

www.atenaeditora.com.br 

contato@atenaeditora.com.br 

[@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora) 

www.facebook.com/atenaeditora.com.br 



BIOÉTICA E MANEJO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO

www.atenaeditora.com.br 

contato@atenaeditora.com.br 

[@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora) 

www.facebook.com/atenaeditora.com.br 

