

# ESTUDOS DE INDUÇÃO DE CÂNCER

*Data de aceite: 03/07/2023*

### **Tays Freitas Martins Bento**

Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, RJ  
ORCID 0000-0003-2864-701X

### **Renata Batista da Silva**

Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, RJ  
ORCID 0009-0002-9915-5733

## **1 | ESTUDOS DE INDUÇÃO DE CÂNCER EM ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

A utilização de animais em experimentos contribui notoriamente para o avanço do conhecimento acerca do mecanismo de doenças e respectivos tratamentos. Novas descobertas permitem o aprimoramento de intervenções clínicas, com vistas a preservar a saúde do ser humano.

Um dos grandes desafios atuais para que experimentos utilizando animais sejam bem-sucedidos envolve a necessidade de planejamento rigoroso, que se inicia com a escolha correta do modelo

animal, passando pelos cuidados para que o experimento transcorra em respeito aos princípios éticos e de bem-estar animal, além de um desenho experimental adequado. Dessa forma, aumentam-se as chances de que os dados gerados com os experimentos sejam fidedignos e reprodutíveis, e que a vida dos animais utilizados não seja desperdiçada (SINGH *et al.*, 2016).

A inoculação de células tumorais em roedores, principalmente camundongos, é um procedimento experimental amplamente utilizado com os objetivos de propagar uma linhagem tumoral e estudar diferentes tipos de câncer, assim como seus respectivos tratamentos. Apesar dos conflitos éticos envolvidos na utilização de animais em pesquisas, uma das grandes desvantagens do cultivo celular, frente aos modelos animais, é que no primeiro não é possível reproduzir situações de metástase e angiogênese tumoral (DE-SOUZA, 2018).

Tumores podem ser induzidos experimentalmente de forma ortotópica,

ou seja, no tecido ou local de sua formação, ou de forma ectópica, geralmente por via subcutânea, intravenosa ou intraperitoneal. Em alguns casos, é necessário alterar o estado imunológico ou fisiológico do animal para realizar o enxerto de algumas linhagens tumorais, por meio de técnicas como a irradiação a baixo nível ou a utilização de agentes imunossupressores. Sendo assim, os camundongos imunodeficientes são os mais utilizados para esses experimentos. Também é possível utilizar linhagens de camundongos geneticamente modificadas, desenvolvidas por meio do conhecimento a respeito dos fatores genéticos envolvidos no desenvolvimento da doença. Outra possibilidade é a indução química de tumores, através da inoculação de substâncias potencialmente carcinogênicas.

Outro fator a ser considerado é o de que camundongos podem desenvolver de forma espontânea alguns tumores, tornando necessário o conhecimento prévio sobre a incidência destes, a fim de que o bem-estar animal seja assegurado.

## 2 | PLANEJAMENTO DO EXPERIMENTO

Experimentos envolvendo animais causam dor e distresse, sendo de extrema importância minimizá-los, pois esses fatores influenciam diretamente o bem-estar animal, que deve ser assegurado em todas as fases dos experimentos, de acordo com os princípios dos 3Rs (redução, refinamento e substituição), introduzidos por Russel & Burch em 1959. Além disso, dor e distresse também podem afetar de forma negativa os resultados experimentais (SILVA-REIS *et al.*, 2021).

Estudo publicado revelou que apenas 29% dos artigos analisados que relatavam procedimentos cirúrgicos em animais mencionavam o uso de anestésicos, subestimando a dor nos animais. Existe um certo medo, não racionalizado, por parte dos pesquisadores, em utilizar analgésicos durante os experimentos, com a ideia de que eles podem confundir ou interferir na interpretação dos resultados. Entretanto, o não tratamento da dor leva à imunossupressão e, conseqüentemente, à interpretação equivocada de resultados (PETERSON; NUNAMAKER; TURNER, 2017).

Vale ressaltar que a não previsão de analgesia nos procedimentos considerados invasivos deve ser fundamentada em projeto, e previamente analisada e aprovada pela CEUA.

A fim de minimizar dor e distresse experimentais, um planejamento analgésico e anestésico deve ser estabelecido, bem como a oferta de condições que favoreçam o bem-estar animal.

Alguns pontos devem ser levados em consideração, como:

- O preparo e a aclimação dos animais antes do início dos experimentos;
- a oferta, em sistema de rodízio, de itens de enriquecimento ambiental com o objetivo de reduzir o distresse experimental;
- os procedimentos prévios à inoculação de células tumorais como, por exemplo,

a necessidade de depleção medular por meio de irradiação, para casos de cirurgia de enxerto tumoral;

- a via selecionada para inoculação das células tumorais, a fim de verificar a necessidade de anestesia prévia, com seleção de anestésico e dosagens adequadas, obtidos na literatura de referência ou por meio de guias para cuidados com animais em experimentação;
- o constante monitoramento dos animais com o objetivo de atestar se há a observação de algum comportamento que denote mal-estar – uma vez que experimentos com células tumorais podem levar à dor e morte – e qual conduta deve ser aplicada;
- a avaliação da necessidade de uso de analgésicos, principalmente durante a fase de crescimento tumoral, de forma a minimizar a dor;
- o *endpoint* experimental, isto é, o conjunto de parâmetros que definem o ponto estabelecido como final do experimento, no qual o animal deve ser eutanasiado. Ele pode se dar antes mesmo de atingido o objetivo do estudo, a fim de cessar a dor e o mal-estar animal.

### 3 | AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS EM EXPERIMENTAÇÃO PARA ESTUDOS EM CÂNCER

Modelos animais são importantes ferramentas para estudos do desenvolvimento e patogênese de diferentes tipos de tumores, bem como para a avaliação de possíveis fatores de risco, agentes preventivos e tratamentos. Visto que o aparecimento de muitos tumores se deve à associação de fatores genéticos e ambientais, faz-se necessário avaliar as vantagens e desvantagens do uso de cada modelo animal, a fim de que os resultados obtidos sejam representativos daqueles encontrados em humanos (DE-SOUZA; COSTA-CASAGRANDE, 2018).

Em concordância com os princípios éticos, recomenda-se que animais sejam utilizados em estudos apenas após esgotados os ensaios utilizando linhagens celulares *in vitro*, e sob cuidados permanentes que apoiem o bem-estar animal.

A avaliação dos animais utilizados nos estudos de câncer se dá pelo constante monitoramento de sinais que indiquem dor e sofrimento, e esses sinais podem variar de acordo com o tipo de câncer estudado.

Conforme dito anteriormente, a dor e o sofrimento infligidos a animais de laboratório, além de serem eticamente inaceitáveis, podem constituir uma fonte potencial de erros nos resultados do experimento, uma vez que são capazes de alterar vários parâmetros fisiológicos, dentre eles concentrações séricas ou plasmáticas de corticosteroides, glicose, hormônios de crescimento ou prolactina, frequência cardíaca ou pressão arterial (FAUSTINO-ROCHA *et al.*, 2019). Portanto, um monitoramento frequente dos animais em estudo possibilita não somente que os princípios éticos e o bem-estar animal sejam

respeitados, como favorece a obtenção de resultados fidedignos para o estudo proposto.

### 3.1 Tipos de tumores

Há três tipos de tumores que são estudados na experimentação animal:

- Tumores não visíveis: a perda de peso, geralmente considerada entre 10 e 20%, é utilizada como parâmetro para definir o *endpoint* em estudos com animais, apesar de não ser considerada como ideal para monitorar o bem-estar animal em pesquisas que envolvam o crescimento de tumores internos, não mensuráveis, já que o aumento da massa tumoral, assim como a desidratação, podem mascarar o déficit no estado geral – e, conseqüentemente, do peso – no animal em experimentação (PASTER; VILLINES; RICKMAN, 2009).
- Tumores cavitários e do sistema nervoso: tornam-se um desafio à parte, pois somente exames de imagem podem dimensioná-los, para que um *endpoint* adequado seja estabelecido. Nesses casos, a perda de peso e a aparência geral dos animais podem ser os únicos fatores prontamente disponíveis para se definir o *endpoint* experimental. As leucemias, mielomas, linfomas são exemplos de cânceres que não formam tumores sólidos e, portanto, o monitoramento do comportamento e da condição geral do animal deve ser realizado com frequência e de forma minuciosa, a fim de que o sofrimento animal não seja estendido.
- Tumores subcutâneos: os parâmetros para avaliação de *endpoint* incluem medição regular do tamanho do tumor, realizado geralmente por paquímetro, avaliação de presença de ulceração/necrose do tumor, perda de peso e inapetência, alterações na mobilidade e no comportamento fisiológico considerado normal para a espécie.

### 3.2 Checklist para observação de sinais clínicos e comportamento animal

A maioria dos parâmetros analisados para se constatar dor ou mal-estar em um animal são os mesmos para diferentes tipos de estudos, e englobam aspectos de aparência geral, do comportamento e de sinais clínicos.

No que concerne à aparência geral do animal, avaliam-se, durante o período de experimento (adaptado de FAUSTINO-ROCHA *et al.*, 2019):

1. Peso;
2. condição (ou escore) corporal;
3. ingestão de água e alimentos;
4. postura;
5. avaliação de mucosas, pele e pelos;

6. aspecto dos olhos;
7. posicionamento de orelhas e vibrissas;
8. aspecto das fezes.

A avaliação comportamental do animal envolve:

1. Resposta a estímulos sonoros;
2. atividade do animal, como movimento de exploração dentro da gaiola, de pular e se pendurar, além do hábito de lamber pelos.

Os sinais clínicos analisados abrangem:

1. Aferição da temperatura corporal;
2. medição de batimentos cardíacos;
3. medição da frequência respiratória;
4. grau de hidratação;
5. valor de hematócrito e densidade urinária.

Nem todo biotério de experimentação possui os instrumentos e equipamentos necessários a uma avaliação criteriosa de todos os parâmetros elencados acima. Portanto, é necessário um profundo conhecimento sobre o comportamento e a fisiologia considerados normais para a espécie envolvida, e que o monitoramento abranja o máximo possível de parâmetros que avaliem dor e sofrimento, dentro da realidade da instituição, e seja executado com frequência - podendo esta ser diária para estudos em câncer.

Como fonte de referência para identificação de sinais de sofrimento, é recomendável a utilização de escalas de dor, como a *Grimace Scales*, do Centro de Referência para Substituição, Refinamento e Redução de Animais em Pesquisa (NC3R, Londres), além de Guias e Diretrizes internacionais com informações sobre parâmetros fisiológicos e comportamentais. Alguns desses Guias apresentam parâmetros específicos para avaliação de tumores, como será visto adiante.

## **4 | ORIENTAÇÕES PARA TOMADA DE DECISÃO EM EXPERIMENTOS COM CÂNCER**

Os experimentos com câncer em animais de laboratório exigem o acompanhamento frequente para avaliação clínica e de desconforto e/ou dor que comprometem o bem-estar animal. Dessa forma, parâmetros comportamentais e fisiológicos, além do tamanho e aspecto do tumor, devem ser monitorados e classificados quanto ao grau de comprometimento para a tomada de decisão, seja para a administração de analgésicos ou realização da eutanásia, a fim de interromper o mal-estar. Alguns países elaboraram guias para auxiliar na avaliação e classificação dos tumores, como é o caso do Guia do Conselho Canadense de Cuidados Animais (CCAC, 1998).

Esse guia recomenda que o *endpoint* seja estabelecido antes de o animal estar em estado moribundo, o qual ocorre após o mal-estar e antecede a morte, não respondendo a estímulos, apresentando problemas respiratórios e prostração. Para isso, a observação do animal deve considerar cinco aspectos, utilizando classificação de 0 (normal) a 3 (grave) para cada uma delas:

- Mudanças no peso corporal (redução na ingestão de água e alimento);
- aparência física externa;
- sinais clínicos mensuráveis (frequências cardíaca e respiratória);
- mudanças de comportamento;
- resposta comportamental a estímulos externos.

Os *endpoints* para câncer são:

- O tamanho da massa do tumor começa a comprometer a mobilidade, as funções normais ou causar dor devido à sua localização;
- perda de peso superior a 20% do peso corporal de um animal normal;
- presença de ulceração ou infecção no local do tumor;
- invasão dos tecidos vizinhos por um tumor localizado;
- ocorrência de trauma autoinduzido no local;
- tumor com 5% do peso corporal para experimento de rotina e tumor com 10% do peso corporal para experimentos terapêuticos;
- perda de peso por 6 dias consecutivos.

As recomendações acerca do monitoramento dos animais preconizam que a avaliação seja realizada por pessoa com conhecimento sobre o comportamento animal da espécie estudada, que a avaliação tenha duração e frequência suficientes para detectar o quanto antes sinais de dor e mal-estar e que o registro do monitoramento e avaliação dos animais seja acessível a todas as pessoas envolvidas com o experimento e com o cuidado animal. Segundo o Guia australiano para Cuidados de Animais com Fins Científicos (2021), deve-se considerar:

1. Os impactos adversos do desenvolvimento e biologia do tumor (taxa de crescimento, capacidade de invasão, potencial para ulceração e/ou metástases e caquexia), efeitos de agentes terapêuticos, imunoterapia e complicações cirúrgicas.
2. O local de implantação ou método de indução do tumor, evitando a planta do pé, cauda, cérebro e olhos, exceto na ausência de alternativa válida.
3. A morte por tumor nunca deve ser um *endpoint*.
4. Sinais de dor, redução do *score* corporal, crescimento do tumor, ulceração do tumor, invasão, metástases e efeitos tóxicos de agentes terapêuticos.

A Avaliação do escore corporal deve ser sempre um indicador de bem-estar nos experimentos, conforme já mencionado no capítulo 5. Porém, além da condição corporal, deve-se considerar:

- A velocidade da perda de peso e se ela é progressiva;
- anorexia, falta de ingestão hídrica;
- desidratação;
- diarreia;
- pelo áspero;
- postura encurvada ou perda de reflexo de endireitamento;
- dificuldade respiratória (dispneia);
- paresia ou paralisia;
- condições que comprometam a locomoção e atividades normais do animal;
- tumor superior a 10% do peso corporal;
- tumor com 20 mm em qualquer dimensão;
- tumor ulcerado;
- tumores que prejudicam a alimentação ou a locomoção.

#### 4.1 Diretrizes para o bem-estar e uso de animais na pesquisa do câncer

O Guia britânico *Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research* (2010) é específico para estudos de câncer, sendo o mais completo em informações sobre o tema. Dentre as recomendações, o *endpoint* para estudos de tumorigenicidade pode ser o momento em que o crescimento progressivo do tumor é detectado. Já para o estudo da fase maligna de papilomas cutâneos, necessita-se de técnicas de imagem para a definição de *endpoints*.

O Guia faz as seguintes proposições:

- Não deve ser aceita a condição de moribundo do animal;
- as vias de inoculações como coxim plantar, cauda, via retro orbital ou intraóssea requerem uma justificativa plausível para a indução de tumores;
- o limite da carga tumoral deve ser o mínimo necessário para confirmar um resultado científico;
- nos estudos terapêuticos, deve-se evitar que os tumores de controle se tornem excessivamente grandes.

Os seguintes pontos finais podem ser estabelecidos:

- Limite do tamanho do tumor: 12 mm para camundongo e 25 mm para rato (estudos terapêuticos: 15 mm para camundongo e 28 mm para rato);
- impossibilidade de ingestão alimentar ou hídrica - comer ou beber água por 24 horas;
- perda de peso de 20% do peso corporal inicial;
- perda de peso de 15% em 72 horas;
- hipotermia persistente;
- secreções com sangue ou mucopurulentas;
- dificuldade respiratória (dispneia) ou cianose;
- nódulos linfáticos ou baço aumentados;
- paresia ou paralisia;
- distensão abdominal significativa ou ascite (limite: 20% acima da circunferência abdominal de um camundongo controle);
- diarreia por período superior a 48 horas;
- tumores que comprometem a locomoção e outras atividades ou causam vocalização anormal.

## 4.2 A avaliação do monitoramento do bem-estar animal em pesquisas com indução de tumor

Recomenda-se a avaliação clínica e o monitoramento do bem-estar animal em pesquisas com indução de tumor, através da verificação de: expressão facial, perda de peso corporal e crescimento progressivo do tumor. As pesquisas também discorrem sobre a necessidade da utilização de técnicas de imagem para monitorar o crescimento e a disseminação de metástases. Além disso, deve-se considerar o local de implante ou método de indução do tumor, sua biologia, o potencial para lesões e desenvolvimento de metástases, sendo imprescindível o estabelecimento do *endpoint* mais antecipado possível.

Apesar da Resolução Normativa nº 33, de 18/11/2016, que versava sobre o tema e possuía proposições para essa avaliação, essa foi revogada pela RN 57 de 06/12/2022, no entanto a nova resolução não menciona nenhum tipo de orientação a respeito.

### 1. Classificação do tamanho e aspecto do tumor





Figura 1: Tumor pequeno sem lesão.

Fonte: Acervo INCA, 2021.

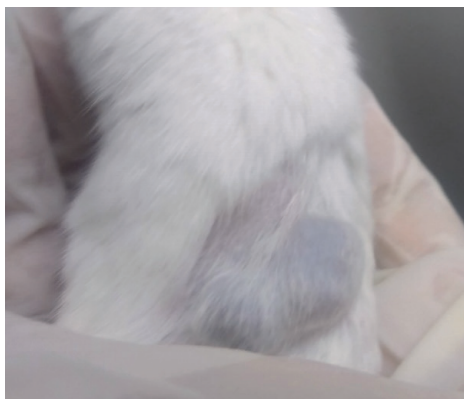


Figura 2: Tumor médio sem lesão.

Fonte: Acervo INCA, 2021.



Figura 3: Tumor médio com ulceração.

Fonte: Acervo INCA, 2021.



Figura 4: Tumor grande inflamado.

Fonte: Acervo INCA, 2021.



Figura 5: Tumor grande muito inflamado, ulcerado e com pontos de necrose. Fonte: arquivo pessoal.

Fonte: Acervo INCA, 2021.



Figura 6: Tumor necrosado.

Fonte: Acervo INCA, 2021.

Aspecto do tumor	Escore
Sem lesão	0
Inflamado	1
Lesões cutâneas superficiais	2
Ulceração sem necrose	3
Ulceração com necrose	4
Grandes ulcerações com ou sem necrose	5

Quadro 1: Classificação de aspecto do tumor subcutâneo

Fonte: Adaptado do procedimento operacional padrão (POP) n. 415.3 – Pontos finais humanitários para roedores utilizados como modelos de câncer – McGill University, 2018.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de o modelo animal ser essencial para os estudos em câncer, existe ainda um grande déficit em traduzir os efeitos da doença em animais, devido ao complexo processo desencadeado na carcinogênese, além de diferenças na fisiologia e progressão da doença como se apresenta em humanos. Tais diferenças, bem como variações na homologia de alvos moleculares entre camundongos e humanos, podem levar a limitações de tradução. Mesmo que os modelos animais continuem sendo uma fonte única de informações *in vivo*, métodos alternativos podem eventualmente substituir a ligação entre os estudos *in vitro* e as aplicações clínicas (MAK; EVANIEW; GHERT, 2014).

Em algumas circunstâncias, ensaios-piloto utilizando um pequeno número de animais podem ser necessários para determinar o início e o progresso dos efeitos adversos que denotem dor e mal-estar aos animais e para identificar os critérios de desfecho humano (NC3RS, 2021).

Há de se considerar que o uso de animais é fruto de discussões éticas há muitos anos e que, apesar de continuar sendo realizado, existe uma preocupação pública com o bem-estar e a validação científica das pesquisas conduzidas com animais. Portanto, a definição de *endpoints* com o objetivo de que os princípios dos 3Rs de Russel & Burch sejam implementados é essencial e, sempre que possível, diretrizes específicas para modelos toxicológicos, de câncer, doenças infecciosas, entre outros, devem ser aplicadas aos modelos utilizados (SILVA-REIS *et al.*, 2021).

## REFERÊNCIAS

BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). **Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica**: fascículo 2: roedores e lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações, 2019. Capítulo 10, p. 111-115.

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. **Guidelines on:** Choosing an appropriate endpoint in experiments using animals for research, teaching and testing. Ottawa, Canadá, 1998. Disponível em: [http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Appropriate\\_endpoint.pdf](http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Appropriate_endpoint.pdf).

DE-SOUZA, A. S. C.; COSTA-CASAGRANDE, T. A. Modelos Animais de Carcinogênese Colorretal. **ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva** (Artigo de revisão) 2018;31(2): e1369.

FAUSTINO-ROCHA, A. I.; GINJA, M.; FERREIRA, R.; OLIVEIRA, P. A. Studying humane endpoints in a rat model of mammary carcinogenesis. **Iran J Basic Med Sci.** 2019; 22(6):643-649.

GRIMACE SCALES. NC3RS. **National Center for the Replacement, Refinement & Reduction for Animals in Research.** Disponível em <https://nc3rs.org.uk/grimacescales>. Acesso em 07 de dezembro de 2021.

HUMANE ENDPOINTS. NC3RS. **National Center for the Replacement, Refinement & Reduction for Animals in Research.** Disponível em: <https://nc3rs.org.uk/humane-endpoints>. Acesso em 08 de dezembro de 2021.

HUMANE INTERVENTION POINTS FOR RODENT CANCER MODELS. McGill University. Standard Operation Procedure #415. SOP 415.03. Canada, 2018. Disponível em: [https://www.mcgill.ca/research/files/research/415\\_humane\\_intervention\\_points\\_for\\_rodent\\_cancer\\_models\\_-\\_oct\\_2018.pdf](https://www.mcgill.ca/research/files/research/415_humane_intervention_points_for_rodent_cancer_models_-_oct_2018.pdf). Acesso em 01 de março de 2023.

MAK, I. W.; EVANIEW, N.; GHERT, M. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. **American Journal of Translational Research.** 2014;6(2):114-118.

NATIONAL HEALTH AND MEDICAL RESEARCH COUNCIL. 2021. **Australian code for the care and use of animals for scientific purposes.** 8. ed. Canberra: National Health and Medical Research Council.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **Animal Research Advisory Committee (ARAC) guidelines.** 2019. Guidelines for Endpoints in Animal Study Proposals. Disponível em: [https://oacu.oir.nih.gov/system/files/media/file/2021-02/b13\\_endpoints\\_guidelines.pdf](https://oacu.oir.nih.gov/system/files/media/file/2021-02/b13_endpoints_guidelines.pdf).

PASTER, E. V.; VILLINES, K. A.; HICKMAN, D. L. Endpoints for mouse abdominal tumor models: refinement of current criteria. **Comparative Medicine.** 2009; 59(3):234-241.

PETERSON, N. C.; NUNAMAKER, E. A.; TURNER, P. V. To Treat or Not to Treat: The Effects of Pain on Experimental Parameters. **Comp Med.** 2017; 67(6):469-482.

SILVA-REIS, R.; FAUSTINO-ROCHA, A. I.; GONÇALVES, M.; RIBEIRO, C. C.; FERREIRA, T.; RIBEIRO-SILVA, C.; GONÇALVES, L.; ANTUNES, L.; VENÂNCIO, C.; FERREIRA, R.; GAMA, A.; OLIVEIRA, P. A. Refinement of Animal Model of Colorectal Carcinogenesis through the Definition of Novel Humane Endpoints. **Animals** (Basel). 2021; 11(4):985.

SINGH, V. P.; PRATAP, K.; SINHA, J.; DESIRAJU, K.; BAHAL, D.; KUKRETI, R. Critical evaluation of challenges and future use of animals in experimentation for biomedical research. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology.** 2016;29(4):551-561.

WORKMAN, P.; ABOAGYE, E. O.; BALKWILL, F.; BALMAIN, A.; BRUDER, G.; CHAPLIN, D. J.; DOUBLE, J. A.; EVERITT, J.; FARNINGHAM, D. A. H.; GLENNIE, M. J.; KELLAND, L. R.; ROBINSON, V.; STRATFORD, I. J.; TOZER, G. M.; WATSON SWEDGE, S. R.; ECCLES, S. A. & An ad hoc committee of the National Cancer Research Institute. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. **British Journal of Cancer.** 2010; 102, 1555–1577.