

CONCLUSÕES Urge uma extensa revisão das legislações pertinentes aos animais não-humanos, visando à integração das leis em um corpo jurídico robustamente embasado, coerente e inequívoco, assim como a definição de protocolos claros, viáveis (inclusive economicamente) e eticamente aceitáveis de procedimentos com animais em geral, incluindo não apenas os ditos de laboratório, mas também aqueles sujeitos a controle, exploração econômica e lazer, dentro de princípios gerais de bem-estar estabelecidos com base em estudos científicos.

É igualmente necessária uma profunda mudança na cultura da relação com os animais, racional, coerente e desvinculada de visões antropocêntricas. Isto pode ser implementado no âmbito da educação ambiental, dentro do objetivo de descartar, entre outros, a noção de que animais podem ser nocivos, feios, intrinsecamente perigosos, ou mesmo objetos para nosso prazer em atividades como a caça e pesca esportivas.

A defesa, manejo e conservação dos animais dependem fundamentalmente de decisões racionais, bem embasadas e despidas de qualquer viés emocional, e o respeito às diferentes formas de vida que compartilham esse tempo e espaços com o ser humano devem nortear essa relação. Dentro de sua grande diversidade de formas, os animais são, cada qual dentro de seu nível de organização, seres maravilhosos, complexos, sensíveis e, pelo menos entre os vertebrados, sencientes do bem-estar em todas suas manifestações.

Eleonora Trajano é professora titular do Departamento de Zoologia e coordenadora da Comissão de Ética em Uso de Animais Vertebrados em Experimentação, Instituto de Biociências da USP.

Luis Fábio Silveira é professor do Departamento de Zoologia do Instituto de Biociências da USP e curador associado da Coleção de Aves do Museu de Zoologia da USP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wanjtal, A. e Silveira, L. F. "A soltura de aves contribui para a sua conservação?" *Atualidades Ornitológicas*, Ivaiporã, PR, n.98, p.7. 2000.
2. Clutton-Brock, J. *A natural history of domesticated animals*. Cambridge University Press, Cambridge, p.238, 1999.
3. Trajano, E. "Ecologia de populações de morcegos cavernícolas em uma região cárstica do sudeste do Brasil". *Revista Brasileira de Zoologia*, v.2, n.5, p. 255-320. 1985.
4. Galhardo, L. & Oliveira, R. "Bem-estar animal: um conceito legítimo para peixes?" *Revista de Etologia*, v.8, n. 1, p. 51-61. 2006.
5. Singer, P. *Writings on an ethical life*. HarperCollins Pubs., New York, p. 361, 2000.
6. Marques, F. "Sem eles não há avanço". *Pesquisa Fapesp*, n. 144, p. 25-31. 2008.

MÉTODOS ALTERNATIVOS À UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS EM PESQUISA CIENTÍFICA: MITO OU REALIDADE?

Marcelo M. Morales

INTRODUÇÃO A utilização de animais em pesquisas científicas, principalmente de mamíferos, tem trazido discussões acaloradas por parte de ativistas que são simplesmente contra essa prática. Parte dos argumentos levantados por esse setor da sociedade é baseada no fato de que métodos alternativos são capazes de substituir a utilização desses animais em pesquisa, prática que consideram obsoleta. Será que esse argumento realmente procede? Até que ponto a sociedade está disposta a abrir mão do uso de animais em pesquisa com o risco de bloquear o avanço do conhecimento biológico, testes e desenvolvimento de novos medicamentos, vacinas e métodos cirúrgicos?

Diferente do que muitos imaginam, o interesse por métodos alternativos cresce dentro da própria comunidade científica na tentativa de diminuir o número de animais utilizados em experimentação e também reduzir o custo dos experimentos, pois animais utilizados em pesquisa precisam ser acondicionados, alimentados e mantidos nas melhores condições de saúde e higiene possível, caso contrário não podem ser utilizados para propósitos científicos (1).

É importante salientar que o termo "métodos alternativos" tem causado grande confusão, pois nos leva a acreditar que a ciência pode deixar de utilizar animais e substituí-los, em grande parte dos experimentos, por outros métodos. Na verdade, existem poucos casos onde simulações computacionais, experimentos *in vitro* e outros métodos são capazes de substituir completamente o uso de animais.

O conceito de "métodos alternativos" deveria ser compreendido em um contexto mais amplo considerando, inclusive, os esforços que são realizados pela comunidade científica mundial para diminuir o uso de animais para um número mínimo possível. Além disso, o refinamento das técnicas utilizadas com animais, que proporcionariam a minimização do possível sofrimento ou dor, também deveriam contribuir para ampliar esse conceito (2, 3). Na mesma linha poderíamos considerar como "método alternativo" a substituição de mamíferos por outras espécies (anfíbios, répteis, bactérias, leveduras, vírus, etc).

Todavia, o que está na verdade em questão é se as técnicas *in vitro* e simulações computacionais realmente podem substituir o uso de animais em pesquisa e prover resultados relevantes e efetivos para melhoria da saúde humana e de outros animais. Estudos de moléculas e células certamente trazem novos conhecimentos, mas, isoladamente, estão longe de trazer a compreensão do funcionamento de organismos complexos como o dos mamíferos, onde está incluída a espécie humana.

É natural que semelhanças entre o funcionamento do organismo dos mamíferos os façam candidatos para as pesquisas aplicadas à saúde humana. Roedores (ratos, camundongos, cobaias, e hamsters) têm sido priorizados devido ao seu pequeno tamanho e também pelo fato de se reproduzirem rapidamente, mas sua utilização é o alvo principal de ativistas, apesar de terem sido, e continuarem sendo, fundamentais para o avanço da ciência (4). Analisemos os 135 ganhadores do Prêmio Nobel em fisiologia ou medicina entre 1901-1984, onde a maior parte dos organismos utilizados em suas pesquisas eram mamíferos. Dentre os trabalhos dos laureados desse período, 45 envolviam vertebrados de sangue quente, 17 trabalhos citavam a utilização de seres humanos, 25 combinavam vários organismos, incluindo mamíferos, invertebrados e cultura de células. Até mesmo plantas foram utilizadas como modelo mostrando, de forma clara, a contribuição de uma série de organismos para o desenvolvimento da pesquisa científica na área biológica. Em 2007, o Prêmio Nobel de medicina e fisiologia foi entregue a três cientistas (Mario R. Capecchi, Martin J. Evans e Oliver Smithies) que revolucionaram as pesquisas com doenças genéticas ao contribuírem para o desenvolvimento de animais com modificações em genes específicos que são capazes de apresentar as mesmas doenças genéticas encontradas em seres humanos (animais nocaute). Essa metodologia possibilitou o desenvolvimento de animais que são utilizados para o estudo de diversas patologias, incluindo arteriosclerose, fibrose cística, doenças cardiovasculares e câncer.

Diferentes técnicas e a utilização de várias espécies de animais são importantes para a construção do conhecimento biológico que leva à melhoria da saúde humana e de outros animais. Um exemplo disso está na história de como os pesquisadores entenderam as bases da doença miastenia grave (uma doença neuromuscular que causa fraqueza, fadiga e paralisia dos músculos voluntários, podendo ameaçar a vida quando atinge, principalmente, os músculos da deglutição e da respiração) (5). Talvez o primeiro estudo relacionado com essa doença tenha vindo dos estudos de Claude Bernard que estudou, em sapos, a ação do curare (que causa a paralisia dos músculos) (6). Em estudos posteriores, pesquisadores mostraram que pacientes com miastenia grave, quando tinham seus nervos estimulados, não respondiam. Nesse momento foi cogitada a possibilidade de terem sido envenenados pelo curare, a mesma substância estudada por Claude Bernard. Quinze anos mais tarde, todavia, pesquisadores demonstraram, em vários modelos animais, que a transmissão de sinais entre o nervo e o músculo era realizada por uma substância denominada acetilcolina. Também foi descoberto que a acetilcolina agia em moléculas receptoras (receptores) localizadas no músculo, mais precisamente no local onde o nervo terminava (7). Estudos mostraram, logo em seguida, que o curare bloqueava a ação da acetilcolina e diminuía a sua efetividade. Mais tarde, em Taiwan, dois químicos isolaram uma poderosa toxina provinda de veneno de serpentes que tem o poder de paralisar um animal, ligando-se fortemente aos receptores de acetilcolina. Com a

descoberta de uma substância que se ligava fortemente aos receptores de acetilcolina, outros pesquisadores puderam obter grandes quantidades desse receptor a partir do peixe elétrico, o que permitiu que fosse estudada a sua seqüência de aminoácidos, a sua estrutura molecular, bem como a forma que esse receptor responde a ação da acetilcolina (5). Em seguida, na tentativa de fazer anticorpos contra o receptor de acetilcolina, pesquisadores injetaram essa proteína em coelhos. Inesperadamente, esses coelhos desenvolveram um quadro parecido com a miastenia grave, o que levou ao entendimento de que essa é uma doença auto-imune (onde o organismo forma anticorpos contra proteína do seu próprio corpo).

Assim, para o entendimento da miastenia grave humana houve o envolvimento de músculos de sapos, sinapses de roedores, toxina de serpente, receptor de peixe elétrico e anticorpos de coelhos. Certamente, para que possamos chegar à cura dessa doença, muitos outros obstáculos deverão ser ultrapassados e, necessariamente, necessitaremos do auxílio de mamíferos em experimentações.

Certamente métodos alternativos devem ser utilizados sempre que possível e a busca dessas metodologias precisa ser um dos alvos da ciência moderna. Abaixo, relacionaremos algumas das principais alternativas à utilização de mamíferos em pesquisas científicas e como elas puderam e podem contribuir para o avanço científico.

MÉTODOS ALTERNATIVOS DEVEM SER UTILIZADOS SEMPRE QUE POSSÍVEL

EXEMPLOS DE MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE MAMÍFEROS EM PESQUISA CIENTÍFICA

VERTEBRADOS

Peixes, anfíbios, répteis e pássaros são bastante próximos aos mamíferos. A maioria das propriedades das transmissões químicas em células nervosas foi obtida através do estudo das junções neuro-musculares

(a sinapse entre o nervo e o músculo esquelético) de sapos. O desenvolvimento embrionário também mantém muitas similaridades entre a classe vertebrada. Assim sendo, esses animais podem servir de modelos para entender o que ocorre em mamíferos.

INVERTEBRADOS

Entre os invertebrados, os insetos são os representantes majoritários. O grande número de pesquisas realizadas a partir do uso dessas espécies culminou, e ainda contribui, no entendimento de mecanismos biológicos existentes em quase todos os seres vivos. Por exemplo, estudos sobre a pigmentação dos olhos da *Drosophila* (mosca da banana) levaram à hipótese de que cada gene controla uma única enzima, um conceito fundamental da biologia molecular (8). Outro exemplo é o caso dos estudos realizados em axônios de lulas que proporcionaram as bases do conceito da participação de íons durante o potencial de ação na transmissão dos impulsos elétricos nervosos (9).

MICROORGANISMOS

Geralmente os microorganismos, tais como bactérias e leveduras, são aceitos como modelos para estudo de metabolismo, genética e bioquímica. Como exemplo mais comum da utilização desse

recurso podemos citar os fundamentos dos mecanismos de expressão gênica desses organismos que são aplicáveis para compreensão do desenvolvimento normal e patológico de embriões humanos. Alguns estudos mostram que algumas semelhanças são preservadas entre esses microorganismos e mamíferos. Leveduras, por exemplo, possuem receptores de estrogênio que apresentam afinidade idêntica aos encontrados no útero de ratas. Esses dados mostram que esses seres podem ser utilizados como modelos, mas não substituem totalmente os mamíferos (10).

Por outro lado, o entendimento do mecanismo de funcionamento de outro microorganismo, o vírus, pode ser utilizado em benefício da saúde humana. A terapia gênica utiliza o vírus como veículo para transportar genes normais para células de tecidos acometidos por doenças genéticas. Quando o vírus (modificado para que não cause doença) infecta a célula hospedeira transfere o gene que os pesquisadores inseriram no seu genoma, fazendo com que a célula do hospedeiro expresse o gene de interesse.

CULTURA DE CÉLULAS E TECIDOS

Cultura de células e também de tecidos são utilizados, principalmente, em pesquisa básica aplicada. Como exemplo podemos citar estudos sobre a ação de quimioterápicos sobre a viabilidade de células cancerígenas. Esses experimentos são a base para saber se uma droga tem o potencial de eliminar células cancerígenas. Testes de toxicidade de algumas substâncias também podem ser realizados em cultivo de células. Esses ensaios dão suporte, por exemplo, para o conhecimento se uma droga ou substância recém descoberta é tóxica para células de nosso organismo (11). 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. Todavia, essa mesma substância testada nas células deve ter seu comportamento estudado quando aplicada em um organismo vivo (em animais de experimentação – principalmente mamíferos), pois, *in vivo*, vários fatores do próprio organismo podem interferir nos resultados. De qualquer forma, os estudos prévios *in vitro* auxiliam na redução do número de animais utilizados nas pesquisas. Um exemplo concreto da utilização de tecidos humanos na pesquisa é a glândula hipófise (pituitária). Essas glândulas, 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. Essa prática caiu em desuso após a constatação de contaminação de algumas crianças com doenças infecciosas provenientes do doador (12). A bioengenharia utilizando a bactéria *Escherichia coli* tornou a produção desse hormônio mais eficiente sem o risco de contaminações provindas dos doadores. Tecidos coletados de biópsias de mama, por outro lado, podem ser utilizados, por exemplo para estudar o desenvolvimento de câncer desse órgão. Células derivadas de tecidos de outros órgãos podem ser utilizadas para os mais diferentes propósitos científicos.

SISTEMAS *IN VITRO* E MODELOS MATEMÁTICOS

Experimentos *in vitro* são apropriados para algumas áreas da ciência biológica. Por exemplo, vários estudos sobre o metabolismo inter-

mediário utilizam a bioquímica para o estudar a dinâmica de reações enzimáticas que ocorrem em nosso sistema biológico.

Já 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. Um exemplo disso é a predição, através de modelos matemáticos, da estrutura de proteínas, que poderiam prever suas propriedades físicas e químicas (13). Testes de irritabilidade poderiam 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). É sempre preciso lembrar que computadores processam e armazenam conhecimentos já existentes e muitos deles foram adquiridos com a utilização de animais na pesquisa.

EXEMPLOS DE MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS EM TESTE OU EM USO

1) TESTE DE IRRITABILIDADE

No passado, os testes de irritabilidade de substâncias eram comumente realizados diretamente aplicando a substância sobre a córnea de coelho (ensaio de Draize) (14). Vários testes foram desenvolvidos para substituir essa prática e alguns são indicados abaixo (15).

Teste da membrana corio alantóide: utiliza ovos de galinha fertilizados para avaliar a irritabilidade da membrana corion alantóide, que possui uma grande quantidade de vasos sanguíneos (16).

Teste de hemólise: nesse teste são avaliados os fenômenos de hemólise e desnaturação protéica, decorrentes da ação da substância-teste (17).

Teste de opacidade de córnea bovina: onde são testadas a opacidade e permeabilidade de córnea provinda de olhos de bovinos (que seriam descartados), após a exposição à substância a ser testada.

Teste em olhos isolados de coelhos ou galinha: em olhos isolados de animais mortos (que seriam descartados) são testadas, após a exposição à substância teste, o edema e opacidade da córnea bem como a retenção de fluorescência.

Teste de viabilidade celular: substâncias são adicionadas aos meios de cultura de células específicas (MDCK, 3T3-L1, SIRC) e são testados alguns parâmetros de sua viabilidade (danos em suas membranas ou em suas junções, por exemplo).

2) TESTE DE TOXICIDADE

Culturas de células de diversos tecidos podem ser utilizadas e nelas podem ser realizados testes de toxicidade de várias substâncias. A viabilidade celular bem como danos em sua estrutura são utilizados como parâmetros de análise dessa toxicidade. O teste de toxicidade durante o desenvolvimento e reprodução podem ser realizados em embriões de galinha, peixe e anfíbios e essa metodologia mostrou ser bastante importante (11). Todavia, como podemos concluir, nenhum teste *in vitro* pode ainda substituir, nesse caso o teste em animais.

CONCLUSÕES Como pudemos observar nesta discussão, apesar dos esforços despendidos para encontrar métodos alternativos ao uso de animais, poucos avanços foram obtidos para que fosse possível excluir essa prática na pesquisa científica. Apesar de continuarmos perseguindo esse objetivo, em um futuro mais próximo, a meta mais realista seria reduzir o número de animais utilizados em propósitos científicos associando diferentes técnicas às alternativas já existentes e, sempre que possível, refinar as técnicas para que o desconforto seja reduzido ao mínimo. O mais sensato, portanto, é admitir que existem métodos complementares, mas que não podem ser considerados substitutivos.

Marcelo M. Morales é professor associado do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e presidente da Sociedade Brasileira de Biofísica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Office of Technology Assessment. "Alternatives to animal use in research, testing and education". *Ota Publ.* Nº OTA-BA-273. Washington DC. US. Government Printing Office. 1986.
- Russel, W. M.S. e Burch, R.L. *The principles of humane experimentation techniques*. London: Methuen. 1959.
- Balls, M.; Zeller, A. M.; Halder, M. "Progress in the reduction, refinement and replacement of animal experimentation". Proceedings of the 3rd World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, 31A, 1ed, Netherlands, Elsevier, 886p. 2000.
- National Research Council. "Models for bromedical research: a new perspective. A report of board on basic biology committee on models for bromedical research". Washington D.C. National Academy Press. 1985.
- Morowitz, H.J. "Myasthenia gravis and arraws of fortune". *Hosp. Proct.* 21:179-194. 1986.
- Kandel, E.R.; Schwartz, J.H.; Thanos, M. J. *Principles of neural science*. 4th Ed. New York. Elsevier. 2000.
- Mc Grew, R.E. *Encyclopedia of medical history*. New York. Macgraw Hill. 1985.
- Ephrussi, B. "Chemistry of eye color hormones of *Drosophila*". *Q.Rev.Biol.* 17: 327-338. 1942.
- Hodgkin, A.L.; Huxley, A. F. "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve". *J.-Physiol.* 117: 500-544. 1952.
- Nawaz, Z.; Tsai, M. J.; McDonnell, D. P.; O'Malley, B. W. "Identification of novel steroid-response elements". *Gene Expr.* 2(1): 39-47. 1992.
- Goldberg, A.; Mcculley, J. P. *Alternative methods in toxicology*. 1st Ed, New York, Mary Ann Liesbert, vol.4. il. 1987.
- Gibbs, C. J. ; Joy, A.; Heffner, R.; Franko, M.; Miyasaki, M.; Asher, P.M.; Parisi, J.E.; Brown, P.W.; Gadjusek, D.C. "Chemical and pathological features and laboratory confirmation of Creutzfeld-Jakob disease in a recipient of pituitary-derived human growth hormone". *N.Engl.J.Med.* 313:731. 1985.
- Ramos, O. H.; Selistre-de-Araujo, H. S. "Comparative analysis of the catalytic domain of hemorrhagic and non-hemorrhagic snake venom metallopeptidases using bioinformatic tools". *Toxicon.* Oct. 44(5):529-38. 2004.
- Draize, J. H.; Woodard, G.; Calvery, O. H. "Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes". *J. Pharm. Expt. Ther.*, v. 83, pp. 377-390. 1944.
- Bradlaw, J. A.; Wilcox, N. L. "Workshop on eye irritation testing: practical applications of non-whole animal alternatives". *Food Chemical Toxicology*, v. 35: 1-11. 1997.
- Luepke, N.P. "Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential". *Food Chemical Toxicology*, vol. 23: 287-291. 1985.
- Wolfgang, J. W. P.; Pfannenbecker, U.; Hoppe, U. "Validation of red blood cell test system as *in vitro* assay for the rapid screening of irritation potential of surfactants". *Molecular Toxicology*, v. 1, pp. 525-536, 1987.