

Especial Experimentação Animal

Métodos inovadores

Validação de novo
método alternativo
será feita pela
primeira vez no Brasil



Pamela Lang



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) aprovou a validação de um método alternativo para o uso de coelhos em testes de irritação ocular, conhecido como HET-CAM (membrana corioalontóide de ovo embrionado). A validação deste método será coordenada pelo Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM), o primeiro da América Latina a validar e coordenar estudos de substituição, redução ou refinamento do emprego de cobaias em testes de laboratório, conhecida como a teoria dos 3R (em inglês, *reduction, replacement e refinement*)

“O HET-CAM é um método que já vem sendo trabalhado internacionalmente, como um teste inicial, em países como França e Alemanha, mas ainda não havia estudos suficientes para sua validação. Esta é a primeira vez em que será conduzida a validação de um novo método alternativo no Brasil”, afirmou o pesquisador do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/Fiocruz) e coordenador do BraCVAM, Octavio Presgrave. A iniciativa contará com o apoio de laboratórios nacionais e internacionais, do Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos (ECVAM) e da Universidade de Johns Hopkins.

Embora o coelho ainda não possa ser totalmente substituído nesse tipo de pesquisa, Presgrave acredita que a validação do HET-CAM seja um passo importante para que isso ocorra. “No caso da irritação ocular é muito difícil uma substituição completa por um único método, já que o olho é composto por várias estruturas, morfológica, histológica e funcionalmente diferentes. Para isso acontecer, seria necessária uma combinação de métodos alternativos. Já existe um método validado internacionalmente para estudos de irritação ocular, o BCOP (opacidade e permeabilidade de córnea bovina), mas ele substitui apenas o uso de parte da córnea. Com o HET-CAM,

conseguiríamos substituir também a parte vascularizada da conjuntiva”, ponderou o coordenador.

Outra novidade no campo foi o reconhecimento oficial, em agosto deste ano, pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (Concea), de 17 métodos alternativos recomendados pelo Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM) com a finalidade de reduzir, substituir ou refinar o uso de animais em atividades de pesquisa. Embora esses métodos já tenham sido validados internacionalmente, no Brasil, é a primeira vez que métodos alternativos são legal e nacionalmente reconhecidos. Segundo a Resolução Normativa nº 17, publicada em julho deste ano pelo Concea, isso significa que laboratórios e instituições de pesquisa têm agora o prazo de cinco anos para a substituição obrigatória dos métodos originais pelos novos.

Nos últimos 20 anos, grupos de pesquisadores em todo o mundo têm criado diversos métodos alternativos para o uso de animais em experimentos. Mas o desafio de encontrar métodos alternativos eficazes ainda é considerável. A maior parte das alternativas encontradas substituem um procedimento ou etapa da pesquisa e não a metodologia como um todo, o que faz com que os pesquisadores sejam capazes de reduzir o número de animais utilizados nos estudos, mas não o eliminarem por completo. Presgrave argumenta que uma das grandes limitações atuais é o fato de que ainda não há como substituir a interação de um produto com o organismo como um todo, pois não é possível reproduzir os efeitos que determinadas substâncias teriam no conjunto que forma o corpo do animal. Igualmente não seria possível reproduzir em testes *in vitro* situações em que um paciente se encontra coinfectado por dois agentes causadores de doenças, avaliando como determinado medicamento age e os efeitos deste no organismo frente ambas as enfermidades.

No entanto, em alguns procedimentos, como teste de permeabilidade

Teoria dos 3R

REDUÇÃO (*reduction*) apresenta a ideia de usar sempre o menor número de animais possível para o objeto de investigação. Isso pode ser conseguido com o desenvolvimento de técnicas genéticas ou de aparelhagem que permitam a geração de animais com menor variabilidade de respostas, reduzindo a necessidade de mais animais para se conseguir resultados confiáveis.

SUBSTITUIÇÃO (*replacement*) remete ao uso de modelos alternativos de investigação. Como utilizar gatos ou ratos em vez de macacos, cultura de células em vez de modelos animais e, após longos períodos de experimentação e aquisição de dados, modelos computacionais. A reposição do modelo acaba por reduzir o uso de animais, dependendo do objetivo experimental.

Por fim, **REFINAMENTO** (*refinement*) traz o aperfeiçoamento de todos os processos envolvidos na experimentação visando, no fim, a redução do uso de animais ou redução do seu sofrimento. Como exemplo, o aperfeiçoamento da aparelhagem dos biotérios (de criação, manutenção etc) e de desenhos experimentais em si, das técnicas que possam proporcionar o menor nível de aversão (dor, estresse e afins) possível.

de ou irritação cutânea (que determina o quanto uma substância passa ou não pela pele), já não há mais a necessidade do uso de animais, optando-se pelo uso de pele sintética. Em outros casos, também já houve um grande avanço, havendo a possibilidade de se realizar pesquisas *in vitro*, como, por exemplo, em testes para verificar a reação a certas substâncias: aplica-se o produto no sangue humano, dentro de um tubo de ensaio, e verifica-se se houve ou não a liberação de mediadores inflamatórios.

O BraCVAM

Desde 2005, a busca por métodos alternativos que dispensem o uso de animais em pesquisas laboratoriais tem sido prioridade para um grupo de pesquisadores do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/Fiocruz). A partir uma parceria da instituição com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), esse esforço conjunto originou, em setembro de 2012, o Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM), o primeiro da América Latina a validar e coordenar estudos de substituição, redução ou refinamento do emprego de cobaias em testes de laboratório.

“No Brasil, existem cerca de 20 grupos de pesquisadores que trabalham com a elaboração de métodos alternativos para o uso de animais e que realizavam seus estudos isoladamente, tendo a oportunidade de se encontrar apenas em congressos internacionais. Isso porque faltava um espaço que reunisse esses estudos e organizasse o potencial de pesquisa brasileiro”, explicou Octavio Presgrave, pesquisador do INCQS e coordenador do novo centro de validação. “O BraCVAM surge para preencher a lacuna e, junto com o Conselho Nacional de Experimentação Animal (Concea) e a Rede Nacional de Métodos Alternativos (Renama), organizar o *expertise* e a demanda nacional por métodos que substituíam ou reduzam o uso de animais em pesquisas”.



Caminhos alternativos

Fiocruz investe em criopreservação como técnica de redução do número de animais em pesquisas



Foto: Peter Illiciev (CCS/Fiocruz)

Nelly Kruczan e Renata Frota

No contexto da teoria dos 3Rs, uma técnica de redução que se insere cada vez mais no sistema produtivo de animais de laboratório e que contribui para diminuir a produção de algumas linhagens é a criopreservação de embriões e sêmens. O Serviço de Biotecnologia e Desenvolvimento Animal (SBDA) do Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fiocruz (Cecal) realiza esse trabalho desde 2007 e observa inúmeras vantagens. “O congelamento permite salvaguardar o patrimônio genético dos modelos experimentais, mantendo altos padrões de qualidade

para a pesquisa científica da instituição. O procedimento permite ainda que animais pouco demandados não precisem ser mantidos na colônia, reduzindo o número de indivíduos no biotério”, afirmou o biólogo Cristiano Sobrinho, chefe do serviço.

O Cecal congela, em média, seis linhagens por ano, o que significa que aproximadamente 1.290 animais deixam de ser produzidos no período. Thais Veronez, bióloga do Centro, explica que, tradicionalmente, mesmo as linhagens que não tenham sido demandadas em anos recentes, necessitam de no mínimo oito casais de matrizes na colônia de fundação. Do contrário, há a extinção da cepa e do

seu patrimônio genético.

Com o congelamento dos embriões, esse procedimento não precisa ser adotado e, com isso, o tamanho da criação é reduzido. Cristiano lembra que, além disso, o custo de manutenção do material congelado é baixo, o que possibilita uma economia de recursos em torno de R\$ 34 mil a cada ano. No Cecal, o critério adotado para o armazenamento das linhagens é a priorização daquelas com maior valor agregado ou as raramente encontradas em biotérios do país.

A prática consiste no congelamento de células ou tecidos dentro de tanques de nitrogênio líquido a 196 graus negativos. Nessa temperatura, os embriões ficam em estado de dormência e

as propriedades das estruturas não são comprometidas. Após o descongelamento, a atividade de divisão celular retorna normalmente. Uma vez que o cientista precise da linhagem, basta solicitar a reimplantação do embrião em uma fêmea, que vai gerar o novo animal.

Rede latino-americana

Em 2010, foi criada a Rede Latino-americana de Criopreservação de Animais de Laboratório e tem como representantes brasileiros o Cecal/Fiocruz, o Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório da Universidade Estadual de Campinas (Cemib/Unicamp), a Universidade de São Paulo (USP), a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e a Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). Essas instituições seguem o modelo do European Mouse Mutant Archive (Emma, o Arquivo Europeu de Ratos Mutantes), um repositório sem fins lucrativos para coleta, arquivamento e distribuição de cepas.

O Emma é considerado hoje uma referência mundial no assunto. Ele funciona como uma rede de parcerias entre vários laboratórios e instituições em toda a Europa. O material é depositado gratuitamente em reservatórios, aos quais todos os participantes têm acesso. O banco de dados classifica e descreve o conteúdo, incluindo as suas propriedades genéticas e fenotípicas.


A rede latino-americana pretende tornar-se um repositório semelhante ao Emma, mas ainda necessita de investimentos. Um dos grandes desafios é aprimorar a eficiência dos métodos utilizados. No Brasil, a pecuária lidera os estudos em criopreservação. No que se refere aos animais de laboratório, o país ainda está estabelecendo seus protocolos. 



Foto: Peter Illiciev (CCS/Fiocruz)

► Cientistas reclamam da burocracia e da morosidade dos serviços alfandegários, que criam um obstáculo adicional

Especial Experimentação Animal

Não tão fácil quanto parece

Entenda os entraves burocráticos e legislativos para a utilização de métodos alternativos no Brasil

Pamela Lang e Renata Moehlecke

Em prol dos direitos dos animais, o debate sobre a necessidade do uso de métodos alternativos em pesquisas tem sido intenso, mas os desafios são inúmeros para que essas novas formas se estabeleçam de fato no país. “O Brasil tem uma das leis mais completas do ponto de vista dos cuidados com os animais, plenamente baseada na chamada teoria dos 3R: *reduction, replacement e refinement* ou, em português, redução, substituição e refinamento”, explicou o vice-presidente de Pesquisa e Laboratórios de Referência da Fio-

cruz, Rodrigo Stabeli. “No entanto, muitos cientistas reclamam dos entraves burocráticos e da morosidade dos serviços alfandegários, que criam um obstáculo adicional”.

Segundo Stabeli, um dos maiores exemplos atuais da problemática que esses entraves pode causar é o debate em torno do uso de pele sintética, que pode substituir animais em algumas etapas de pesquisa. “A entrada de produtos, kits e reagentes no país é regulada e fiscalizada pela Anvisa [Agência Nacional de Vigilância em saúde] e segue todo um protocolo de importação para estes materiais. No caso da pele sintética, a duração de todo o processo faz com que o material se torne inu-

tilizável, já que tem validade de apenas uma semana”, esclareceu.

Atualmente, o Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BracVam) da Fiocruz tem realizado um trabalho junto a Anvisa, o Ministério da Saúde, a Polícia Federal, a Receita Federal e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) para colocar na agenda de discussão esses entraves burocráticos, a fim de obter maior agilidade em determinados processos.

Além da agenda política para facilitar a importação da pele sintética, uma alternativa que pretendesse eliminar essa dependência externa seria uma solução para o uso desses materiais a médio prazo. É o que o

Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) visa incentivar com a abertura de um edital do *CNPq* que contempla uma linha de pesquisa para o desenvolvimento de modelo de pele sintética brasileiro. “Esse edital é extremamente relevante”, destacou Stabeli.


Outra possibilidade que vem sendo debatida no país é o desenvolvimento de modelos computacionais que poderão substituir animais em testes para verificar a toxicidade de uma substância ou de que maneira ela será metabolizada pelo organismo. Esses testes virtuais poderão ser feitos por meio da análise de moléculas por programas de computador, que permitem compará-las com dados referentes a outras moléculas.

“Se o governo busca, junto com a comunidade científica, a redução e a interrupção do uso dos animais para experimentação científica, é preciso

que ele financie essas iniciativas que estão acontecendo na ciência brasileira para o desenvolvimento de métodos alternativos. O investimento em pesquisa na área é bastante cara. Não podemos ter simplesmente uma lei que restrinja o uso sem dar alternativas, pois tal atitude pode ocasionar um retrocesso à pesquisa”, comentou o vice-presidente.

Mais um enorme avanço para a superação desses entraves é o Projeto de Lei, já em tramitação na Câmara, que permitiria a remoção de fragmentos de tecidos do corpo humano, ou seja, a pele, e sua multiplicação em cultura, para utilização em pesquisas e testes laboratoriais com substâncias para o desenvolvimento de produtos de uso cosmético em humanos. Atualmente, a Lei nº 9.434, que dispõe sobre o assunto, restringe-se apenas à remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano

para fins de transplantes e tratamentos, mas não aborda a possibilidade de seu uso científico.

“Na teoria, já temos uma alternativa para não precisarmos mais utilizar a pele de animais em diversos experimentos. Mas, para isso realmente fazer parte do cotidiano das pesquisas científicas, será necessário o desenvolvimento de um modelo de pele sintética brasileiro, a agilização da importação da pele sintética ou ainda a possibilidade de uso de fragmentos de tecido humano, por meio de uma legislação atualizada e coerente com os problemas hoje vividos pelos pesquisadores brasileiros. E a Fiocruz está diretamente envolvida em cada um desses processos, buscando elevar a legislação brasileira, no que tange os métodos alternativos ao uso de animais, ao patamar com que é tratada em países da Europa e Estados Unidos”, finalizou Stabeli. 

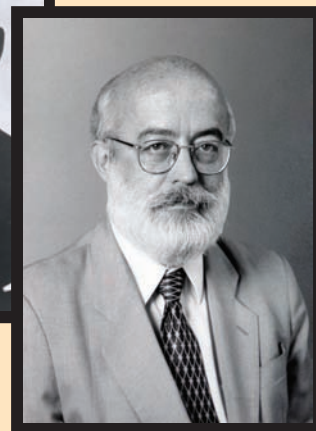
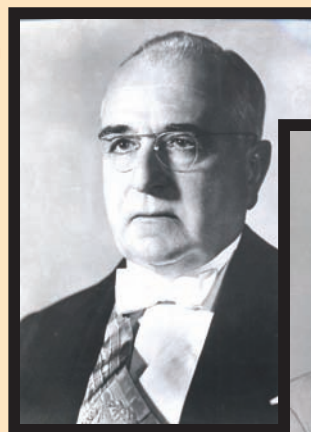
De Vargas a Arouca

As primeiras iniciativas para regulamentar a pesquisa com animais de laboratório no Brasil surgiram no governo de Getúlio Vargas, em julho de 1934, com o Decreto 24.645, e em 1941, quando foi publicado o Decreto-Lei 3.688, que tratava das leis de contravenções penais. Quase quatro décadas depois, em maio de 1979, foi publicada a Lei 6.638, que estabelecia “normas para a prática didático-científica da vivisseccção de animais”, que não teve eficácia prática, pois não foi regulamentada pelo Executivo após aprovação pelo Congresso, caindo no esquecimento.

Depois de 13 anos de tramitação no Congresso Nacional, a Lei 11.794, mais conhecida como Lei Arouca, que regulamenta o uso de animais em pesquisa, foi finalmente sancionada pelo presidente Luiz Inácio Lula da Silva em outubro de 2008. A legislação ficou conhecida assim como homenagem ao médico, sanitarista e ex-presidente da Fiocruz Sergio Arouca, autor do projeto de lei.

Com a aprovação da Lei Arouca, foi criado o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea), ligado ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. O Concea tem como competências “expedir e fazer cumprir normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica”; credenciar instituições brasileiras para criação ou utilização de animais em ensino e pesquisa científica; monitorar e avaliar a introdução de técnicas alternativas que substituam o uso de animais em ensino e pesquisa.

Hoje, o Conselho é presidido pelo ministro de C&T e Inovação. Também contam com representantes no Concea os ministérios da Educação, do Meio Ambiente, da Saúde e da Agricultura, o *CNPq*, o Conselho de Reitores das Universidades do Brasil (Crub),



a Academia Brasileira de Ciências (ABC), a Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Cobea), a Federação Nacional da Indústria Farmacêutica, a SBPC e dois representantes de sociedades protetoras dos animais legalmente estabelecidas no país.

Ricardo Valverde

Impactos de novas leis

Diretora do Cecal defende criação cautelosa de uma política brasileira para o uso de animais de laboratório

Renata Frota

Não é a primeira vez que a experimentação em animais é questionada. A diretora do Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fiocruz (Cecal), Carla Campos, lembra que, em 2005 e 2006, no Rio de Janeiro, o então vereador Claudio Cavalcanti propôs um projeto de lei que impedia o uso de animais em experimentos científicos na cidade. O político defendia que testes em animais não teriam valor científico.

“Esse conceito de que testes em animais não garantem a eficácia do que é produzido e equivocado. As etapas da pesquisa básica e dos exames pré-clínicos indicam a efetividade e a segurança dos medicamentos e são essenciais para o posterior teste em humanos”, afirmou Carla. Ela esclarece que o desenvolvimento de um novo fármaco passa por três grandes etapas: a pesquisa básica, os testes pré-clínicos e os ensaios clínicos. Apenas na última são realizados experimentos em seres humanos.

Na época em que o projeto de lei foi discutido, representantes do Cecal, da Fiocruz e da comunidade científica participaram de reuniões na Câmara Municipal para esclarecer dúvidas sobre o uso de animais em estudos científicos e o projeto acabou sendo vetado. Sebastião Enes, um dos participantes desses encontros, relata que a Fiocruz zela pelo bem-estar animal antes mesmo da aprovação da Lei Arouca em 2008. “Muitos conceitos que já eram praticados na Fiocruz foram usados posteriormente como base para a elaboração dessa lei”, contou. “A Comissão de Ética em Uso de Animais de Laboratório (Ceua) da



► Carla: “Se pudéssemos, não utilizaríamos animais na pesquisa, mas, infelizmente, se a prática fosse proibida hoje, as consequências seriam desastrosas para a saúde”. (Foto: Peter Illiciev (CCS/Fiocruz))

Fiocruz, criada em 1999, é um exemplo disso. Nós fomos uma das primeiras instituições brasileiras a ter uma Ceua, que passou a ser obrigatória em instituições de pesquisa.”

A invasão do Instituto Royal, em outubro de 2013, multiplicou as iniciativas da causa animal, que ganharam força nas diferentes instâncias legislativas do país. Apesar da regulamentação existente no âmbito federal, os municípios podem criar legislação própria. Dias depois do episódio em São Roque, foi sancionada uma lei proibindo totalmente experimentos científicos em animais no município de Jundiaí, localizado também no interior paulista.

A diretora do Cecal defende a criação de uma política brasileira para o uso de animais de laboratório, mas afirma que leis sobre o assunto de-

vem ser aprovadas com cautela. “Os impactos de algumas dessas decisões sobre a saúde da população ainda não são conhecidos. Uma política nacional contribuiria com a unificação do entendimento em relação à experimentação animal, proporcionando maior transparência e controle pela própria sociedade.”

Carla, que é médica veterinária, reafirma a impossibilidade da completa substituição de animais por métodos alternativos atualmente, mas ressalta que a legislação pode ser sempre aprimorada visando ao bem-estar animal. “Técnicas alternativas são utilizadas quando possível e devem ser incentivadas. Se pudéssemos, não utilizaríamos animais na pesquisa, mas, infelizmente, se a prática fosse proibida hoje, as consequências seriam desastrosas para a saúde”.

Animais: ciência em benefício da vida

* Paulo Gadelha e Wilson Savino

A percepção pública sobre as ciências e a capacidade de influenciar as políticas para seu desenvolvimento são condições essenciais da cidadania no mundo contemporâneo. Em especial, é no campo das implicações éticas que esse desafio se torna imperativo. A experimentação animal é, nesse sentido, um caso exemplar.

Nos anos recentes, temos convivido com rejeição de algumas parcelas da sociedade ao uso de animais na ciência. Muitas vezes, estes movimentos encontram ressonância também no ambiente jurídico. Existem grandes expectativas por um mundo em que o uso de animais para a experimentação científica não seja mais necessário. A comunidade científica também compartilha deste desejo. No entanto, nos argumentos que circulam, muita desinformação ainda vigora. Esclarecer o que é verdade e o que é mito se torna fundamental para que a sociedade possa se posicionar sobre o assunto.

No atual estágio da ciência mundial, e em particular no campo da saúde humana, o uso de animais permanece imprescindível para a elucidação de processos biológicos, a descoberta de novos medicamentos, vacinas e tratamentos para doenças. O aumento na expectativa e a melhoria na qualidade de vida que vemos na população se devem, em muito, às inovações médicas que dependeram e ainda dependem, em grande parte, do uso de animais.

Para o futuro, é impossível elucidar o funcionamento do cérebro, os mecanismos das doenças neurodegenerativas, a exemplo do Alzheimer, e garantir a eficácia e segurança de novos tratamentos para essas doenças



Paulo Gadelha



Wilson Savino

Fotos: Peter Illiciev (CCS/Fiocruz)

que estarão cada vez mais presentes com o envelhecimento da população, sem a utilização de animais. O mesmo se aplica a uma multiplicidade de casos, entre os quais o Ebola e outras doenças emergentes.

Um mito muito comum é a ideia de que todas as pesquisas poderiam abrir mão do uso de animais. Apesar dos grandes esforços neste sentido, esta afirmativa não é verdade. A ciência tem investido no desenvolvimento de métodos alternativos, como o cultivo de células e tecidos e os modelos virtuais que recorrem à bioinformática para prever as reações dos organismos.

No entanto, ainda estamos longe de uma solução que reproduza de forma precisa as complexas interações do organismo: estes métodos são aplicáveis apenas em determinadas etapas da pesquisa e em situações específicas. A ciência brasileira também integra este empenho. Um exemplo disso é a criação do Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM), que a Fiocruz lidera em parceria com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa).

Outro mito comum é a ideia de que os cientistas utilizam animais de forma indiscriminada. Além do im-

perativo ético, o uso responsável e o foco no bem-estar dos animais é uma exigência legal. A ciência está submetida a diversas instâncias de regulamentação e a rigoroso controle das atividades de pesquisa. A redução do sofrimento por meio do uso de anestésicos e analgésicos, a escolha de técnicas adequadas e a necessidade de acompanhamento por veterinários são protocolos obrigatórios. Com foco na tríade substituição-redução-refinamento, o uso só é permitido quando não há alternativa conhecida, autorizando-se o menor número de animais necessário para resultados válidos e buscando-se, sempre que possível, o refinamento de técnicas e procedimentos para resultados mais precisos.

A sociedade tem protagonismo fundamental em cobrar que as instituições científicas pautem sua atuação na ética no uso de animais e é saudável para a democracia que esta vigilância atenta seja exercida. No entanto, parar a experimentação animal em pesquisas, hoje, significaria um retrocesso para a ciência e uma perda para a saúde da população e para o próprio campo da veterinária. Cabe aos pesquisadores e às instituições manterem seu compromisso de responsabilidade e ética com os animais, firmes no propósito de beneficiar a sociedade.

* Paulo Gadelha é presidente da Fiocruz e Wilson Savino é diretor do Instituto Oswaldo Cruz