

ALTERNATIVAS AO USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

EKATERINA AKIMOVNA
BOTOVCHENCO RIVERA

CAL-grandes transformações

- Não é uma ciência estática
- Constantemente revista à luz dos mais recentes avanços :
 - tecnológicos
 - científicos
 - comportamentais
 - humano


ABOLIÇÃO TOTAL-LETÔNIA LIBERDADE TOTAL-SINGAPURA

- Respeito um pelo outro
- Liberdade de descobrir
- Andar pelo caminho do meio
- Procurar um ponto de equilíbrio

NEM UM

NEM OUTRO

Introducing The
Super Mouse



750 DESIGNED EXCLUSIVELY FOR MICE, BECAUSE WE KNOW THAT YOU WANT TO DEVOTE EVERY AVAILABLE MOMENT TO ADVANCING YOUR BIOMEDICAL RESEARCH.

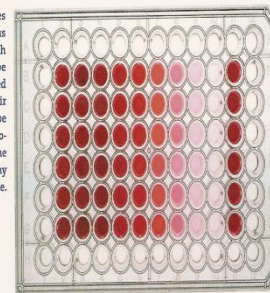
THIS REVOLUTIONARY CAGE IS TALLER INSIDE, ROOMIER, MORE FLEXIBLE AND HAS FEWER PARTS. THIS ADDS UP TO FASTER CAGE CHANGES, BETTER VISIBILITY AND GREATER CONVENIENCE FOR YOU.

© Bior-Medix Corporation 2000

5.1.4. Replacement and supplementary methods from a scientific point of view

The new method must repeatedly show comparable results under precisely defined conditions when identical procedures are used (reproducibility). The sensitivity of the parameters must at least be equal to the sensitivity of the animal experiments, and the findings must show sufficient specificity, which means they must show a close and unequivocal relationship to the biological question of interest, for example the toxicity of a substance. If this is the case, these experiments can in principle replace animal experiments.

Microtiter plates have numerous wells into which substances can be conveniently placed and where their reactions can be observed. This procedure has made the automation of many laboratories possible.



5.1.5 Putting research results into practice

The development of alternative methods to animal experiments is a lengthy process that consists of many steps. It cannot be imposed by government decree but can only result from free scientific research. The success of this kind of work cannot be predicted. Like all other scientific endeavour, it has inherent risks.

When a replacement method is developed, it goes through a phase of orientation, and then through standardisation and validation.

In the orientation phase, one single research laboratory initially tries to implement the experimental system as a routine procedure (e.g. cell cultures) and then its performance is assessed.

In the standardisation phase the external conditions, the technical specifications as well as the protocol of the procedural steps of the test, are improved and, as far as possible, recorded in the form of standard instructions. Then, in a series of experiments, more data are gathered to help evaluate the method. This could for example be done by testing a variety of substances whose effects are already known from animal experiments. It is only when there is enough data to show that the test is reliable, and basically suited as an alternative method, that the next phase is initiated.

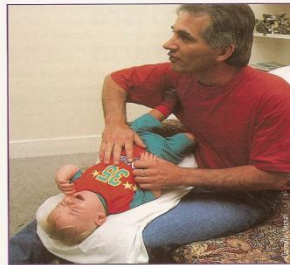
Pressão para que seja banida completamente a experimentação animal

- Medida tão extrema ou restrições legais-colocaria o animal acima :
- do nosso dever de **proteger o homem**(que também é um animal), os **outros animais** e o **meio ambiente**.

PARADOXO IMPLÍCITO

- na grande demanda feita pela sociedade em possuir drogas e outros produtos mais seguros
- a completa extinção de testes com animais.

VOCÊ PRIMEIRO A SER TESTADO? FALTA DE ESPERANÇAS?



Parents of children suffering from cystic fibrosis may well have different perceptions about the use of genetically modified animals in the search for a cure, than will those with no personal experience of the condition. But how ethically relevant is this?

To change the example, if we have to choose between trying to save a child or a dog from drowning in a river, we would normally feel a moral obligation to favour the child, but the justification for this could not (morally) be that human beings are more powerful than dogs as a species, and that therefore this dog's interests do not matter. A dog's sentience and capacity for suffering are ethically relevant factors, to be taken into account whenever it is appropriate and possible to do so, but this does not mean that its interests are necessarily to be treated as being on a par with those of a human being, whatever the circumstances. By no means all philosophers would accept that all species are of equal moral standing. Are not chimpanzees, for example, worthy of greater moral respect than mosquitoes? Some would argue that, while it may be arbitrary and wrong to show moral respect (or disrespect) for members of a particular species **purely** because they are members of that species, it does not necessarily follow that all species are deserving of equal moral respect. However, it is generally agreed that the sentience of any species requires some kind of moral respect.

But how exactly should one species take account of the sentience of another? There is not space here to delve deeply into the philosophical complexities of this question, but two main approaches need to be briefly mentioned at this point.

a) Utilitarianism

The utilitarian approach which represents an important philosophical tradition, argues that here, as in other ethical decisions, a calculation has to be made of what is likely to maximise pleasure and minimise pain. The best course of action, ethically speaking, is that which produces the most overall satisfaction.

The main problems with this approach are concerned with how exactly to do this calculation, particularly when we are talking about **animal** experiences of pleasure and pain, which are likely to be different from our own. Also, if we are aiming at the maximum **overall** satisfaction, how are animal pains and pleasures to be weighed against human ones? Are human interests to be given a heavier weighting than animal ones and, if so, how is this to be ethically justified in view of the objections to speciesism noted above?

Cystic fibrosis is the most common "single gene" genetic disease in Caucasians. One in 25 of us carries the recessive gene responsible and 1 in 2,500 babies suffer from the disease. For sufferers, life expectancy is only in the twenties or thirties, and constant treatment is needed to maintain a reasonable quality of life.



Cystic fibrosis (CF) mice and wild type and heterozygote littermates. The cystic fibrosis mice were created by using embryonic stem cells (see page 24). The mutant mice cannot be distinguished from their littermates visually but their cells display electrophysiological properties characteristic of CF. These mice have been successfully used to validate gene therapy approaches to disease treatment.

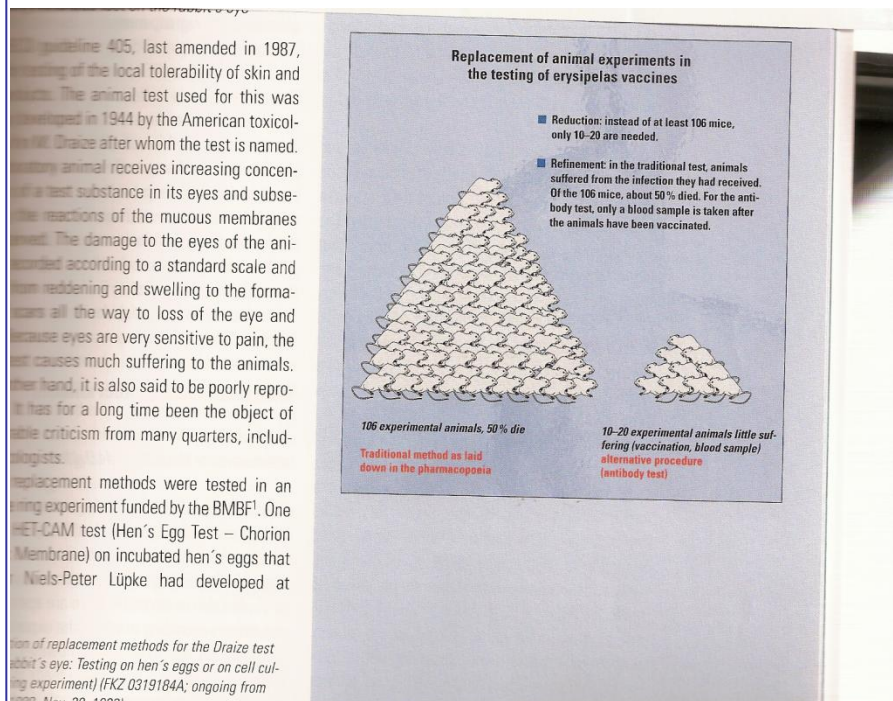
Discussions about how justifiable it is to use animals for food production or for medical research will need to weigh different levels of human benefit against different levels of animal suffering. Peter Singer, for example, argues that the pleasures and benefits human beings derive from eating meat are unlikely to outweigh the discomfort and pain of farm animals reared under modern intensive conditions.

The utilitarian calculation suggests that the justification for some degree of animal suffering is much stronger if the objective is a cure for life-threatening diseases rather than a leaner pork chop.

Problema de ordem econômica

- Também as companhias que buscam introduzir novos produtos no mercado se deparam com leis, exigências e regulamentações que variam de país para país, e que incluem os testes com animais

Por estas razões, sabemos que:



- Apesar dos avanços científicos que reduziram o número de animais usados e do crescimento das pesquisas que buscam alternativas ao uso dos animais

O uso dos mesmos continua sendo necessário

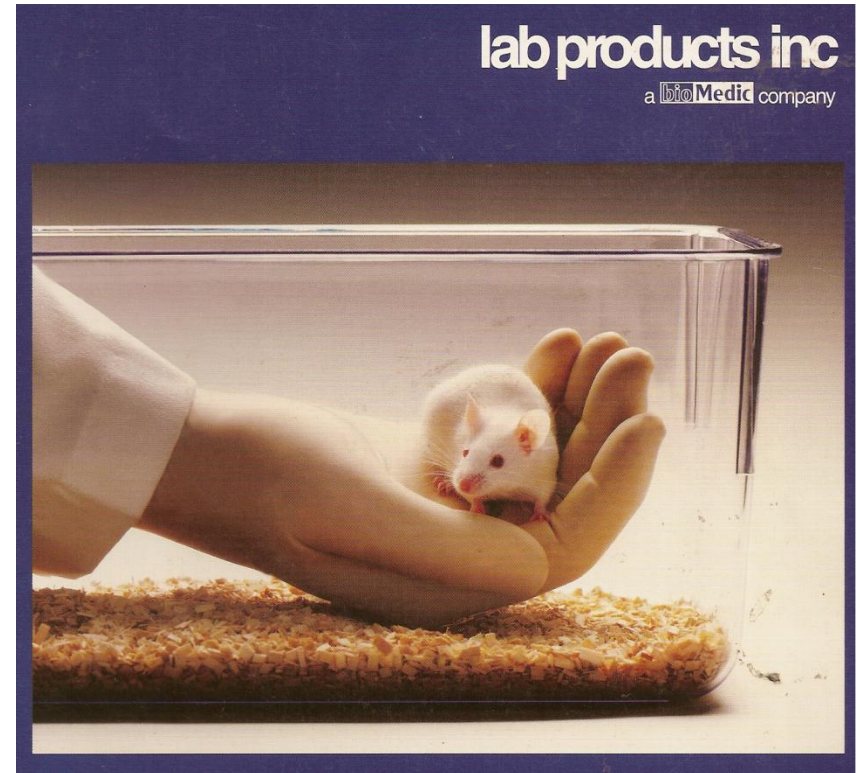
- comportamento animal, farmacologia, segurança da saúde pública, etc..
- Não dar relevância somente a modelos não sensíveis e não vivos já que o principal problema dos mesmos é o de **super simplificar** o que é uma cadeia de reações.

SONHO DE QUALQUER CIENTISTA : TRABALHAR COM SERES INSENSÍVEIS E NÃO ANIMAIS

- O dilema ético de usar animais seria atenuado com a introdução de métodos alternativos.
- Assim o cientista não teria que justificar ética e cientificamente o uso de animais.
- Para tanto há uma busca exaustiva e incessante no sentido de eliminar o uso de animais em nossas pesquisas

SEM LUGAR A DÚVIDAS:

- **ALTERNATIVAS
SÃO O FUTURO**



MAS, ALTERNATIVAS NÃO SÃO A SOLUÇÃO PERFEITA

- Cuidado com as expectativas:
- **Protetoras**- expectativas não realistas
- **Cientistas**- pouca prioridade ao assunto
pouco financiamento
- **Agências regulamentadoras**- não creem em alternativas

Estes diferentes pontos de vista: **entraves** nas soluções que trariam benefícios para todos

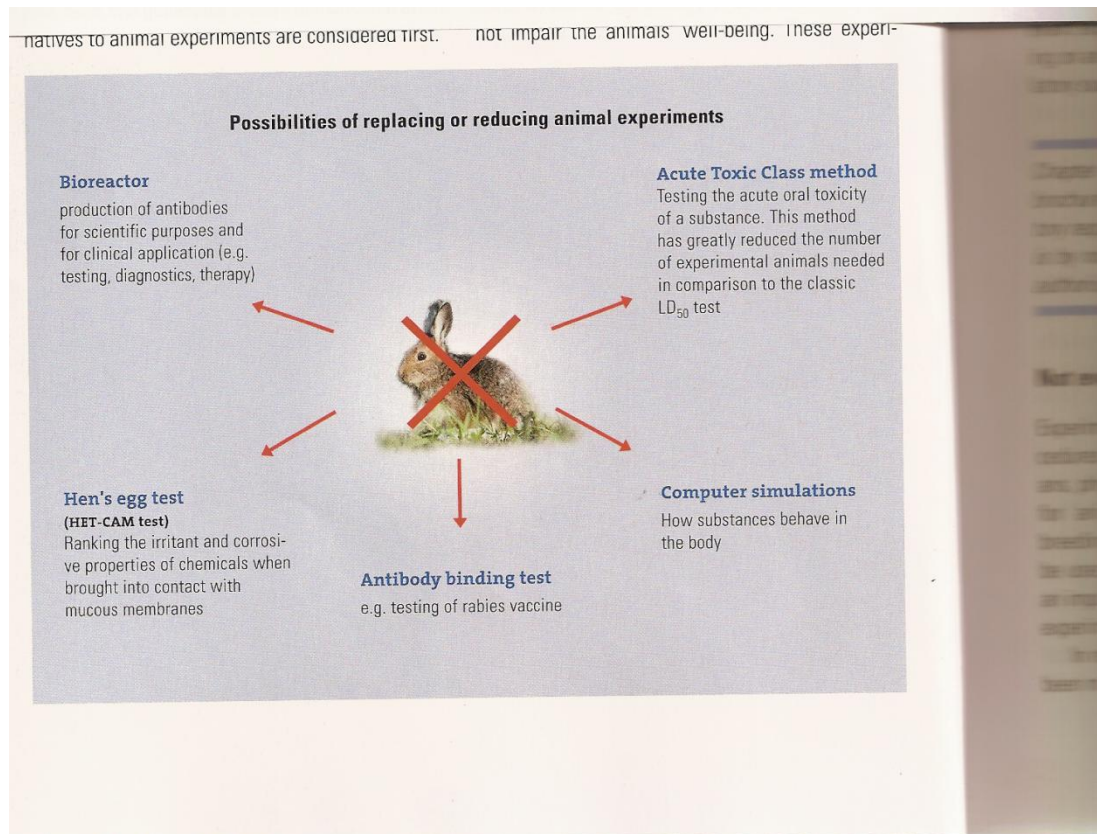
Próprios Russell and Burch- 3R's

- ***Desenvolvimento de métodos alternativos é parte da evolução científica***
- A abolição do uso de animais em testes virá gradualmente, passo a passo.
- Por outro lado: ciência sozinha não consegue atingir seus fins , necessita de apoio político e financeiro

O QUE SIGNIFICA ALTERNATIVA ?

- No contexto da pesquisa com animais , significa mais do que **somente não usar animais**
- Significa também :
 - usar procedimentos que **reduzam** a quantidade de animais usados
 - e o **sofrimento** pelos quais passam estes animais.

SUBSTITUIR SEMPRE?



O valor das alternativas pode ser usado abarcando os 3 Rs : reduzir o número de animais/aprimorar seu uso/substituir

- A consideração de alternativas não elimina o uso de animais, mas sim exige que sua utilização seja minuciosamente planejada para que a dor, sofrimento , desconforto sejam eliminados ou pelo menos evitados sempre que possível.

Ao pensar e, antes de usar, alternativas devem ser ponderadas as seguintes questões de ordem :

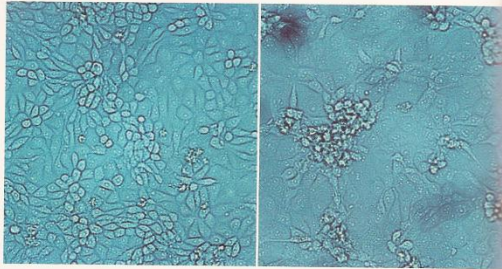
- Ética
- Econômica,
- Regulamentadora
- Segurança
- Científica
- Humanitária

Ética:

- Os potenciais resultados do projeto justificam os efeitos esperados que seriam obtidos caso fossem usados animais?
- A espécie a ser usada está em perigo ou em extinção?

Científica

In cell cultures the basic characteristics of cell components can often be investigated more readily than in the body, although they cannot replace the organ. It is an advantage for the scientist to be able to exactly control and standardise external factors such as temperature or supply of nutritive factors. The pictures show a cell culture of dog kidney cells, untreated (left) and then after treatment with a damaging substance. The changes can be recognized easily.



ism. On the other hand, basic characteristics of cellular components can often be better investigated in culture, partly because researchers can then accurately control external influences such as temperature or nutrients.

In addition, cell fractionation can be used to isolate individual components of the cells (cell organelles such as mitochondria or ribosomes), biomolecular fractions or individual cell molecules (proteins such as enzymes or receptors). This can be used, for example, to test the effects of toxins but it may also provide important information for basic research. For example, the fundamental mechanisms by which chemicals can transform healthy cells into cancer cells can be studied by investigating the molecular basis of these changes.

Cell culture technology has received new impulses from gene technology. It has made it possible to develop genetically altered (transgenic) cell-lines in which a special gene function is for instance enhanced or eliminated. Advances in embryonic stem cell research hold much promise for cell culture models. These young cells are not yet specialised and therefore basically still omnipotent. That means that they can develop into numerous cell types within the body. One future use of stem cell cultures could for example be to study the embryotoxic and teratogenic effect of chemicals.

Cell culture procedures will continue to play a central role in the development of replacement and supplementary methods to animal experiments.

Horseshoe crabs are live fossils. The substance Limulus amoebocyte lysate LAL which is gained from the blood cells of the American horseshoe crab *Limulus polyphemus* is very sensitive to pyrogens, substances produced by bacteria, that are known to cause fever. In this way the Limulus test can replace the more conscious pyrogen test on rabbits (see also Chapter 5.2.1)

Eggs, fish roe and others

Parts of vertebrates or products from vertebrates are not sensitive to pain because they lack nervous tracts. Fertilised chicken eggs and fish roe are examples for this. They are suitable materials for replacement methods (see Chapter 5.2). Waste products from animals which have been slaughtered such as cow udders or teeth from cattle can also be used. However testing procedures that make use of such waste products face the problems of standardisation because differences between the animals in terms of sex, age, origin, health and nutritional status may be impossible to determine at this stage. Similar problems may arise when products from human surgery are used. For example, it may not be clear if the tissue of the operated patient has been affected by the patient's disease. Ethical considerations may also make use of this material inadvisable.



- O modelo alternativo reproduz com fidelidade o processo ou a característica a ser estudada?
- O modelo encontra-se disponível para outros pesquisadores?
- O modelo está bem descrito na literatura?

Alguns países já tem em sua legislação artigos específicos que dizem respeito ao uso de alternativas aos animais

- O pesquisador principal, antes de usar animais, deve considerar todas as alternativas existentes, e preencher um formulário dizendo que está usando animais por não haver alternativas para o seu trabalho.
- Este formulário será analisado pelo C.E. da Instituição para posterior confirmação

RAZÕES PARA QUE SE QUEIRA USAR ALTERNATIVAS E NÃO TESTES COM ANIMAIS

- **Científica:** baseados em biotecnologia moderna
- **Econômica:** testes com animais são muito caros
- **Logística:** testes alternativos dão resultados mais rapidamente e necessitam de instalações menos complexas
- **Ética :** testes com animais inevitavelmente causam sofrimento
- **Legal:** leis nacionais e internacionais exigem os 3 R's
- **Política:** testes com animais não são populares.

Implicações éticas

- Como não é ético usar animais havendo alternativas, não é ético usar alternativas que não tenham sido cientificamente avaliadas e validadas
- Após terem sido avaliadas e validadas o pesquisador tem obrigação moral (e legal) de usá-las.

PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

- Pode ser usada a fim de evitar duplicação desnecessária de pesquisas
- Pode prover dados, com base científica, para escolha do modelo
- Testes toxicológicos repetidos em cada país- necessidade de harmonização dos regulamentos/ Troca de informações entre empresas/ melhor arquivamento dos dados
- **Problema ético** : pode ser que a empresa tenha gastado milhões de dólares para gerar os dados, este direito é protegido por lei. Talvez possa assumir o compromisso de liberar os dados após algum tempo.

PESQUISA EPIDEMIOLÓGICA

Pode ser usada para aprender freqüência, distribuição e causa de doenças infecciosas ou não, numa determinada população

Estudos epidemiológicos/vitais para identificar perigos/vários carcinógenos através de associações ocupacionais/efeitos colaterais também

- **Questão ética:**

Como os voluntários são selecionados? Serão pagos? Qual o tipo e o nível de risco, será que entenderam exatamente o que vai ser feito? Perguntas constrangedoras?

CULTURA DE CÉLULAS, TECIDOS E ÓRGÃOS

Frações sub-celulares, suspensão de células e órgãos perfusados, incluindo cultura de tecidos humanos

Alguns tecidos humanos e animais permanecem vivos quando retirados do organismo original e mantidos in vitro

Gama grande: frações sub celulares, pedaços de tecidos, órgão completo, cultura de tecidos

- **Questão ética** :também não fogem da preocupação ética, por exemplo, cérebro de fetos de rato usados para teratogênese exige a morte da mãe prenhe. A morte pode não implicar em dor, mas encurta a vida do animal. Alguns animais recebem tratamentos antes de sua morte para obtenção de órgãos. De humanos há o sério risco de contaminação , hepatite e AIDS.

-
- **Células:** não mais organizadas em tecidos / mantidas em meio onde possam se reproduzir e multiplicar
 - **Órgãos:** manter a arquitetura e função do tecido e não o crescimento
 - curta duração.
 - **Vantagens:** maior sensibilidade, menor custo, condições experimentais mais controladas, relativamente simples, possível ausência de variáveis.
 - **Desvantagens:** ausência de mecanismos sistêmicos de absorção, distribuição e excreção, controles nervosos, hormonais e imunológicos e o fato de que o organismo é mais do que uma soma de todas as suas partes

USO DE TÉCNICAS FÍSICAS E QUÍMICAS

Com previsão baseadas nestas propriedades e das moléculas. Cromatografia a gás e espectrometria de massa podem substituir ou reduzir o número de animais para alguns tipos de estudos como os testes para a Vitamina D.

- **Problema ético:** em geral não envolve problemas éticos, a menos que os laboratórios corram risco antes que a segurança do produto tenha sido devidamente determinada. Mesmo caso quando se usa animais.

SISTEMAS MICROBIOLÓGICOS

Excelentes como pré-testes

- Ames: carcinogênese e teratogênese- Salmonella typhimurium
- Estudos de DNA recombinante - Escherichia coli
- Daphnia species pode ser usada para avaliar a influência da temperatura nos batimentos cardíacos -difícil extrapolação para o homem.
- .
- Incluem bactérias, algas, protozoários, celenterados, fungos, plantas, insetos , equinodermas e moluscos.
- Testes bacteriológicos como o de Ames, que causa alterações genéticas, já estão bem estabelecidos e estão sendo usados para a tomada de decisões preliminares em testes toxicológicos. Similaridade entre o material genético nas bactérias e nas células humanas-câncer

Questão ética: não sabemos se os invertebrados sofrem

- Atenção: não há diferenças éticas entre causar dor e sofrimento a um vertebrado sensível e um invertebrado sensível
- No caso de bactérias , no teste de mutagênese se necessita de um sistema metabolisante, sob a forma de enzima: obtida do fígado de ratos e antes de matá-los é necessário injetar fenobarbitone para promover a atividade das enzimas metabolizantes.

SISTEMAS MATEMÁTICOS SIMULAÇÃO EM COMPUTADORES

- Modelo das relações estrutura/atividade, correlação entre a estrutura molecular e a atividade biológica na previsão de efeitos químicos desejáveis e não desejáveis;
- Modelo molecular e o uso gráfico de computadores
- Modelo de sistemas e processos bioquímicos, fisiológicos, toxicológicos, farmacológicos e comportamentais
- Quando se conhece a natureza e formato dos locais receptores é possível projetar moléculas de drogas que se acoplem aos mesmos, ou saber quais podem interagir
- **Questão ética:** em geral não envolve problemas éticos

PLANTAS:

- Principalmente fungos-estudo de mecanismos moleculares básicos

HOMEM:

- Alguns métodos não invasivos são moral e legalmente aceitos.
- O homem é o último animal experimental a ser usado
- Homem-não há variação interespécie/fica reação individual
- Muito usado em testes de cosméticos/já se sabe da baixa ou média toxicidade do composto
- Devem ser observados os controles éticos e de segurança
- **Questão ética:** passar antes pelo Comitê de ética

Melhor delineamento dos experimentos

- Perda de animais-projetos toscos, mal controlados, resultados inválidos----pesquisa imoral
- Uso do estatístico no início do projeto

QUANTO AO R DE REFINEMENT- APRIMORAMENTO-

- Um dos meios mais efetivos de minimizar a dor e o sofrimento causados aos animais é sem lugar a dúvidas- **treinamento do pessoal** que irá trabalhar com os animais . E como consequência deste treinamento iremos abraçar o R de redução pois poderemos ter menor número de animais evitando erros ou maus tratos.

REFLEXÃO

- A mudança de atitudes com relação aos animais que permeia nossa sociedade nos levou à introdução de procedimentos que não usem animais
- Introdução de novos procedimentos alternativos que nos levou a reduzir o número de animais e ao aprimoramento no sentido de evitar a dor e o sofrimento dos animais?

Finalizando ;Dr.David Morton expandiu o conceito dos 3 Rs para 15 Rs

- **Reduce** number used
- **Refine** end points and procedures
- **Replace** with in vitro methods when possible
- **Respect** all animals regardless of species
- **Recognize** any adverse effects
- **Relieve** pain with analgesics, distress with anxiolitics
- **Refuse** to carry out some procedures if concerned
- **Reconsider** protocol if unsure
- **Read** about the science and ethical issues
- **Reflect** on the work you have carried out

Reason out why you are doing the research

- **Record** all your observations carefully
Reward rather than cause harm
- **Reappraise** technique for efficiency
- **Resolve** to learn new techniques

