

MODELOS ANIMAIS:

DA LEGISLAÇÃO À
EXPERIMENTAÇÃO CIENTÍFICA



Organizadoras

MIRELE DA SILVEIRA VASCONCELOS

DIRCE FERNANDES DE MELO

DIANA CÉLIA SOUSA NUNES-PINHEIRO

MARIA IZABEL FLORINDO GUEDES

ANA CLÁUDIA MARINHO DA SILVA

LUCIANA MAIA MOSER

u
Imprensa
Universitária
UFC


EDIÇÕES
UFC



Presidente da República
Jair Messias Bolsonaro

Ministro da Educação
Victor Godoy Veiga



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - UFC

Reitor
Prof. José Cândido Lustosa Bittencourt de Albuquerque

Vice-Reitor
Prof. José Glauco Lobo Filho

Pró-Reitor de Planejamento e Administração
Prof. Almir Bittencourt da Silva



IMPRENSA UNIVERSITÁRIA

Diretor
Joaquim Melo de Albuquerque

CONSELHO EDITORIAL DA UFC

Presidente
Prof. Paulo Elpídio de Menezes Neto

Conselheiros
Joaquim Melo de Albuquerque
Felipe Ferreira da Silva
Maria Pinheiro Pessoa de Andrade
José Edmar Ribeiro da Silva
Prof^ª. Ana Fátima Carvalho Fernandes
Prof. Guilherme Diniz Irffi
Prof. Paulo Rogério Faustino Matos
Prof^ª. Sueli Maria de Araújo Cavalcante

MODELOS ANIMAIS:

DA LEGISLAÇÃO À
EXPERIMENTAÇÃO CIENTÍFICA

Organizadoras

MIRELE DA SILVEIRA VASCONCELOS
DIRCE FERNANDES DE MELO
DIANA CÉLIA SOUSA NUNES-PINHEIRO
MARIA IZABEL FLORINDO GUEDES
ANA CLÁUDIA MARINHO DA SILVA
LUCIANA MAIA MOSER



FORTALEZA
2022

Modelos animais: da legislação à experimentação científica

© 2022 Copyright by Mirele da Silveira Vasconcelos, Dirce Fernandes de Melo, Diana Célia Sousa Nunes-Pinheiro, Maria Izabel Florindo Guedes, Ana Cláudia Marinho da Silva e Luciana Maia Moser

Impresso no Brasil / Printed in Brazil

Efetuada depósito legal na Biblioteca Nacional

Impresso no Brasil / Printed in Brasil

Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará (UFC)

Av. da Universidade, 2932, fundos – Benfica – Fortaleza – Ceará

Coordenação editorial

Ivanaldo Maciel de Lima

Foto da quarta capa

Biotério Central da Universidade Federal do Ceará.

Fotografia de Ribamar Neto

Revisão de texto

Yvantelmack Dantas

Normalização bibliográfica

Luciane Silva das Selvas

Programação visual, Diagramação e Capa

Valdiano Araújo Macêdo

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Imprensa Universitária – Universidade Federal do Ceará

M689 Modelos animais [livro eletrônico]: da legislação a experimentação científica / Organização: Mirele da Silveira Vasconcelos ... [et al.]. - Fortaleza: Imprensa Universitária, 2022.

3.690 kb : il. color. ; PDF

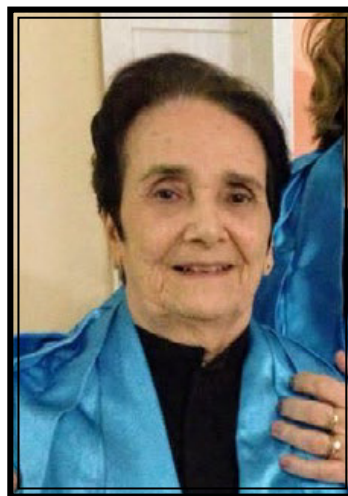
ISBN: 978-85-7485-399-4

DOI: <doi>10.51996/9788574853994</doi>

1. Animais - experimentação - Brasil. 2. Animais de laboratório - Brasil. 3. Animais de laboratório. I. Melo, Dirce Fernandes de Melo, org. II. Nunes - Pinheiro, Diana Célia Sousa, org. III. Guedes, Maria Isabel Florindo, org. IV. Silva, Ana Cláudia Marinho da, org. V. Silva, Luciana Maia Moser, org. VI. Título.

CDD 636.0885

DEDICATÓRIA



*À Profa. Dra. Maria da Guia Silva Lima
Universidade Federal do Ceará*

À Comunidade Científica Mundial que, ao longo do tempo, tem se voltado a compreender a vida diante de desafios. Particularmente, dedicamos este livro à Profa. Dra. Maria da Guia Silva Lima que, no início da década de 1980, vislumbrou a criação de um Biotério, no Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará (UFC). Mas somente em 1992, dez anos após o início desse projeto, é que esse sonho foi realizado.

A instalação do Biotério Central da UFC marcou um divisor de águas no tocante à criação de animais de experimentação e tornou-se o único centro produtor de animais de utilização apropriada.

da à pesquisa científica em Fortaleza. Contudo, a Profa. Maria da Guia projetava desenvolver um trabalho científico sobre o papel dos alérgenos vegetais na resposta imunológica e a criação do Biotério representava um meio para formação de pessoal. Seu trabalho continua vivo, através da ação das editoras desta publicação, bem como dos demais autores que a enriquecem com contribuições. A Profa. Maria da Guia Silva Lima tem, assim, sua marca impressa, por nos fazer acreditar na arte e na ciência de transformar sonhos em realidade, em prol do progresso científico.

PREFÁCIO

Com prazer, fui convidada para prefaciar o presente livro intitulado **Modelos animais: da legislação à experimentação científica**, organizado pela Profa. Dra. Mirele da Silveira Vasconcelos, professora efetiva do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Ceará (IFCE), *campus* Baturité. Mirele Vasconcelos é ex-aluna do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) da Universidade Federal do Ceará (UFC), onde passei 40 anos de minha vida profissional como professora.

No DBBM, Mirele da Silveira Vasconcelos concluiu seu mestrado, em 2011, cujo objeto de estudo foi a avaliação do potencial antioxidante, anti-inflamatório e cicatrizante do caju *in vitro* e *in vivo*; e seu doutorado, em 2017, com o objetivo de avaliar o efeito da fração proteica CpPII de *C. procera* na modulação do processo cicatricial em modelos experimentais de ferida. A formação profissional da Profa. Mirele Vasconcelos concentrou-se na aplicabilidade do conhecimento científico no âmbito da Ciência Biomédica, o que indiscutivelmente, justifica a utilização de animais de experimentação. Daí nasceu seu interesse pelo estudo do uso desses animais em práticas didáticas e pesquisa científica. Ela estabeleceu contato com colegas que exerciam, igualmente, atividade usando animais para a experimentação científica e concebeu a ideia de organizar o presente livro com capítulos sobre diferentes temas.

É um livro para pesquisadores médicos; farmacêuticos; bioquímicos; químicos; biólogos; biotecnologistas; veterinários; estudantes dos respectivos cursos de graduação e pós-graduação; e todos os demais interessados em conhecer o histórico e as normas que regulamentam a experimentação animal; os modelos de estudo com animais de experimentação, em vários aspectos, explorando, inclusive, a pesquisa do Coronavírus (Sars-COV 2), atualmente de grande interesse social.

Analisando todos os elementos apresentados no livro, volto ao ano de 1982, quando, na condição de professora pesquisadora do DBBM, quis trabalhar com animais de experimentação e a UFC não dispunha de Biotério. Assim, as dificuldades eram muitas, para a realização da pesquisa científica. Nasceu, então, a ideia de criar um Biotério para o Centro de Ciências da UFC.

O projeto levou 10 anos para ser concretizado e o Biotério foi inaugurado em 12 de março de 1992. Em prol de uma construção com uma organização correta, consultas foram feitas no Rio de Janeiro, em São Paulo e mesmo no Instituto Pasteur, em Paris, França. Nessa época, nosso conhecimento no âmbito de Biotério era incipiente e, convém salientar, anterior à Lei Arouca, que foi aprovada em 2008. A Lei Arouca, dessa maneira, elevou o país a outro patamar, aquele de nações que buscam proteger animais utilizados em pesquisa.

As matrizes de ratos e camundongos que deram início à produção desses animais no Biotério vieram do Centro Multinacional

de Bioterismo (Cemib) ligado à Universidade de São Paulo (USP). Portanto, é com emoção e gratidão que tenho a alegria de prefacear esta obra, que mostra ampla visão e sua utilidade nos mais diversos aspectos do uso de animais de experimentação científica. Vale, ainda, mencionar a associação da Profa. Mirele não somente a colegas brasileiros como também a pesquisadores em Portugal e no Irã.

Só me resta, pois, parabenizar e estimular a Profa. Mirele pela notável publicação que conduziu e pelo progresso que a edição representa na hora atual do avanço de uma pandemia na qual a Ciência tem mostrado, de modo tão importante, sua atuação para o bem-estar social.

Dra. Maria da Guia Silva Lima

Profa. Emérita da Universidade Federal do Ceará

FOREWORD

Animal models are used from ancient Greece to contribute to the advances in understanding human physiology and anatomy. Preclinical studies using animal models have significantly contributed to the current knowledge of human anatomy, disease pathophysiology, test novel drugs, and effective therapeutic targets.

The most common laboratory animals species used in biomedical research models are mice and rats. Although the importance of these models is recognized, in the last decades, there has been an effort to limit animal research studies and find new alternatives. Today, the scientific community and governmental bodies agree that research studies with animals shall be reduced as much as possible and the results shall be well interpreted.

In this line, **Animal models: from legislation to scientific experimentation** a great book that allows the reader, including researchers, health professionals, and students, to up-to-date information regarding all the aspects of animal models in a systematic format, including animal care and ethical aspects.

It is not easy to find the information on animal studies structured and up-to-date as in this book. Therefore, I congratulate and welcome the great idea of the editors of this book, the very esteemed colleagues Dr. Mirele Vasconcelos, Dirce Fernandes de Melo, Diana Célia Sousa Nunes-Pinheiro, Maria Izabel Florindo Guedes, Ana Cláudia Silva Marinho, and Luciana Maia Moser.

The book is composed of 14 chapters. The first chapter briefly addresses the history of animal experimentation, the resolutions that regulate animal experimentation in Brazil, and the guidelines on submitting projects. The second chapter overviews the legal instruments implemented by different countries at a global level.

The third chapter presents new approaches on topics related to science in laboratory animals. The fourth chapter addresses an emerging issue, the leading animal models for studying Covid-19, a disease caused by SARS-CoV-2 infection, and the aspects related to legislation and biosafety. Chapters five to eleven address animal models with different dysfunctions and diseases, including sepsis, metabolic diseases, hepatic lesions, cancer, wound healing, gastric lesions, and allergies.

Chapter 12 focuses on the main animal models with genetic modifications of biomedical and biotechnological interest, cardiovascular diseases and viral diseases, and studies to produce antibodies and vaccines.

Chapter 13 emphasizes cellular models valuable for discovering molecules with anti-cancer, anti-metastatic, healing, pro-inflammatory, anti-inflammatory, and anti-SARS-CoV-2 potential. Finally, chapter 14 compiles the perception on animal experimentation of professors and students of the Biological Sciences course of the Federal University of Ceara in Brazil regarding the Arouca Law after ten years of being effective.

This book is a precious tool that embraces all the aspects of animal models. These are critically and comprehensively discussed, giving the readers essential and additional information on animal models. Therefore, we are pleased and overwhelmed to present and support this book, representing a milestone for all those interested in animal studies.

Dr. Seyed Mohammad Nabavi

*Advanced Medical Pharma (AMP-Biotec),
Biopharmaceutical Innovation Centre, Via Cortenocera, 82030,
San Salvatore Telesino, (BN), Italy;
Nutringredientes Research Center, Federal Institute
of Education, Science and Technology (IFCE), Brazil.*

Dr. Ana Sanches Silva

*National Institute for Agricultural and Veterinary Research
(INIAV), I.P., Vairão, Vila do Conde, Portugal; Center for Study in
Animal Science (CECA), University of Oporto, Oporto, Portugal.*

APRESENTAÇÃO

A ideia da elaboração deste livro surgiu da necessidade de divulgar modelos animais que mimetizam aspectos fisiológicos e patológicos e proporcionam conhecimentos do organismo animal na saúde e na doença. É um trabalho de divulgação científica que tem a contribuição de vários pesquisadores, brasileiros e estrangeiros, vinculados a instituições brasileiras e internacionais, que mostram a importância da Ciência aplicada a animais de laboratório e de seus aspectos éticos na construção do conhecimento.

Os resultados obtidos com esses modelos proporcionaram relevantes contribuições sobre doenças que afligem a humanidade, como problemas gástricos, hepáticos, cânceres, cicatrização e, inclusive, doenças virais. Os modelos animais constituem ferramentas poderosas para o desenvolvimento de protocolos experimentais que dão suporte a diversos estudos, principalmente ensaios pré-clínicos, e garantem a qualidade dos dados obtidos. Vale ressaltar que, em tempo recorde, modelos animais foram desenvolvidos com o auxílio da biologia molecular para o entendimento da gravíssima infecção viral que acometeu a população humana no final de 2019 e continua em propagação em 2021, a pandemia do Sars-CoV-2, que provocou a Covid-19, doença que vem dizimando milhares de pessoas no globo terrestre. A profundidade desses conhecimentos obtidos repercute em tratamentos adequados; des-

coberta de novas drogas; e até o surgimento de novas vacinas, no caso da Covid-19, métodos de detecção etc.

A interdisciplinaridade dos pesquisadores envolvidos na elaboração de cada capítulo mostra o diálogo que existe entre os cientistas para solucionar problemas. Todos os capítulos tiveram a colaboração de pesquisadores que se utilizaram de modelos animais ou de células obtidas de animais em suas investigações, que resultaram em dissertações, teses e artigos científicos. Espera-se que esta sucinta obra desperte o interesse e o entusiasmo de jovens desbravadores na Ciência; alunos de iniciação científica; mestrandos e doutorandos; bem como docentes do ensino superior.

Agradecemos a todos os pesquisadores envolvidos e às instituições às quais estão vinculados. Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE), agradecimento especial, pelo apoio ao desenvolvimento do projeto do livro através do Edital – Chamada Interna Conjunta IFCE 01/2020, por meio de proposta encaminhada e aprovada em 31 de agosto de 2020.

As organizadoras

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	5
PREFÁCIO	7
FOREWORD	11
APRESENTAÇÃO	15
CAPÍTULO 1 <doi>10.51996/9788574853994.cap1</doi>	19
Ética em pesquisa no Brasil com animais de laboratório	
CAPÍTULO 2 <doi>10.51996/9788574853994.cap2</doi>	59
Instrumentos legais utilizados em diferentes países em escala global para harmonizar o uso de animais para fins científicos	
CAPÍTULO 3 <doi>10.51996/9788574853994.cap3</doi>	107
Tópicos especiais sobre ciência em animais de laboratório	
CAPÍTULO 4 <doi>10.51996/9788574853994.cap4</doi>	155
Panorama atual da pesquisa com animais e coronavírus (Sars-CoV2): Modelos, aspectos de legislação e biossegurança	
CAPÍTULO 5 <doi>10.51996/9788574853994.cap5</doi>	191
Modelos animais para o estudo da seps	
CAPÍTULO 6 <doi>10.51996/9788574853994.cap6</doi>	217
Modelos animais de investigação com doenças metabólicas	
CAPÍTULO 7 <doi>10.51996/9788574853994.cap7</doi>	247
Modelos animais com lesão hepática	
CAPÍTULO 8 <doi>10.51996/9788574853994.cap8</doi>	271
Modelos animais no estudo do câncer	

CAPÍTULO 9 <doi>10.51996/9788574853994.cap9</doi>	303
Modelos animais de investigação em cicatrização cutânea	
CAPÍTULO 10 <doi>10.51996/9788574853994.cap10</doi>	325
Modelos animais com lesão gástrica	
CAPÍTULO 11 <doi>10.51996/9788574853994.cap11</doi>	357
Modelos animais em alergenicidade	
CAPÍTULO 12 <doi>10.51996/9788574853994.cap12</doi>	397
Uso de animais geneticamente modificados para aplicações biotecnológicas: da bancada ao leito	
CAPÍTULO 13 <doi>10.51996/9788574853994.cap13</doi>	425
Modelos celulares para prospecção de moléculas com potencial farmacológico	
CAPÍTULO 14 <doi>10.51996/9788574853994.cap14</doi>	461
Experimentação animal na Universidade Federal do Ceará: Percepção de professores e estudantes do curso de ciências biológicas	

CAPÍTULO 1 [<doi>10.51996/9788574853994.cap1</doi>](https://doi.org/10.51996/9788574853994.cap1)

ÉTICA EM PESQUISA NO BRASIL COM ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Mirna Marques Bezerra Brayner¹

Laís Lacerda Brasil de Oliveira

João Alison de Moraes Silveira

Manoel Odorico de Moraes

Maria Elisabete Amaral de Moraes

Luina Benevides Lima

Gabriela Mariângela Farias de Oliveira

Manuel Carlos Serra Azul Monteiro

Roberta Jeane Bezerra Jorge

Resumo: Embora o uso de animais em ensino e pesquisa represente prática histórica, a legislação brasileira sobre esse tema é recente. De fato, a regulamentação só foi formalizada pela Lei Arouca – 11.794/2008 –, que estabelece regras, como a criação do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (Concea), responsável pelas diretrizes para questões éticas e legais relacionadas ao uso de animais de laboratório; e a obrigatoriedade

¹ Curso de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC), *campus* Sobral, Sobral, Ceará, Brasil. *E-mail* para correspondência: mirna@ufc.br. Todos os autores são vinculados ao Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM-UFC) – *campus* do Porangabuçu, Fortaleza, Ceará, Brasil

de as instituições de pesquisa constituírem as Comissões de Ética no Uso de Animais (Ceua). As Ceua orientam os pesquisadores e avaliam os projetos de pesquisa, à luz da legislação vigente, para eliminar ou minimizar a dor e o distresse dos animais, indicando métodos alternativos, sempre que possível. Assim, consta, neste capítulo, breve histórico da experimentação animal, seguido das normas e resoluções que a regulamentam no Brasil, além de orientações sobre a submissão de projetos à Ceua.

Palavras-Chave: Ética. Experimentação animal. Animais de laboratório. Lei Arouca.

ETHICS IN RESEARCH WITH LAB ANIMALS IN BRAZIL

Abstract: Although the use of animals in scientific research and teaching represents a historical practice, the Brazilian legislation on this topic is recent. The Arouca Law only formalized the regulation in 2008. It establishes rules such as the creation of the National Council for the Control of Animal Experimentation (Concea), which elaborates guidelines to deal with the ethical and legal issues related to the use of laboratory animals, and the requirement for the research institutions to install the Ethics Commissions on the Use of Animals (Ceua). The Ceua are responsible for guiding researchers and evaluating research projects, examining the compliance of scientific projects involving the use of animals to applicable law, eliminating or minimizing the pain and distress

of such animals, and recommending their replacement by alternative methods, whenever possible. This chapter describes a brief history of animal experimentation, followed by the resolutions that regulate animal experimentation in Brazil and the guidelines on submitting projects to Ceua.

Keywords: Ethic. Animal experimentation. Laboratory animals. Arouca Law.

1 INTRODUÇÃO

Neste capítulo são abordados, além de um breve histórico da experimentação animal, aspectos das normas e resoluções que regulamentam a experimentação animal no Brasil, seguidos das orientações sobre a submissão de projetos à Ceua.

1.1 Um Panorama da Experimentação Animal: da Grécia Antiga à Lei Arouca

Ao longo da história, os seres humanos têm usado outras espécies vertebradas (aqui denominados “animais”) como modelos de estudos anatômicos e fisiológicos. Devido aos tabus relacionados à dissecação de seres humanos, a utilização de animais com o objetivo de experimentação médica inicia-se na Grécia Antiga, visto que o uso de animais vivos em experimentos não levantava questões morais relevantes, devido à vigente crença na *scala naturae* (“cadeia dos seres”) (VON STADEN, 1989).

Médicos proeminentes desse período praticavam a “vivisseção” (ou “cirurgia exploratória de animais vivos”), para estudos de natureza anatomofisiológica. As obras *Historia Animalium* e *Corpus Hippocraticum*, de autoria de Aristóteles (384-322 a.C.) e Hipócrates (460-370 a.C.), respectivamente, já demonstravam os conhecimentos sobre o corpo humano obtidos por meio da dissecação animal (GOMEZ; TOMAZ, 2007).

Com o declínio do Império Romano e o início da Alta Idade Média, os experimentos fisiológicos, bem como a atividade científica em geral, caíram quase inteiramente em desuso, e o conhecimento médico tornou-se dogmático. Em uma Europa cada vez mais cristianizada, havia pouca motivação para buscar o avanço científico do conhecimento médico (PRIORESCHI, 1994; PRIORESCHI, 1996).

Na Baixa Idade Média, na fase de transição conhecida como Renascimento (1300-1600), o médico anatomista flamengo Andreas Vesalius (1514-1564) quebrou regras civis e religiosas ao praticar a dissecação de cadáveres humanos obtidos ilegalmente. Sua obra *De Humanis Corporis Fabrica* (1540), traz descrições precisas da anatomia humana; esboça mecanismos fisiológicos do corpo humano; descreve semelhanças e diferenças entre a estrutura interna de humanos e de outros animais, estabelecendo, assim, os fundamentos da anatomia comparativa moderna (O'MALLEY, 1964; VON STADEN, 1989).

William Harvey (1578-1657), por sua vez, demonstrou o funcionamento do sistema cardiovascular em seu inovador *Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis, em Animalibus* (1628) (SHACKELFORD, 2003). A partir dos resultados de experimentos meticulosamente planejados em animais vivos, bem como a interpretação por meio da Matemática e da Física, refutou muitas das ideias de Galeno, vigentes a mais de 1.500 anos (COHEN, 1994). Nessa época, Francis Bacon (1561-1626), um dos fundadores do método indutivo de investigação científica, também aprovaria a relevância científica da vivissecção (BACON, 1605).

No século XVII, a fisiologia marcaria o início da investigação científica moderna nas Ciências da vida. A maioria dos fisiologistas, entretanto, não esperava que aplicações terapêuticas diretas resultassem de seus experimentos (WOOTTON, 2006). Nesse século, o matemático, físico e filósofo francês, René Descartes (1596-1650), legitimou a utilização de animais em pesquisas científicas, ao postular que o pensamento e a sensibilidade faziam parte da alma.

Como os animais eram considerados “semelhantes a uma máquina”, não possuíam alma e, portanto, não eram capazes de sentir dor (DESCARTES, 1637). Esse maquinismo cartesiano seria evocado recorrentemente em defesa da vivissecção, nos séculos XVII e XVIII (RUPKE, 1987).

No século XVIII, destacaram-se os polímatas Stephen Hales (1677-1761), por suas contribuições para a fisiologia cardiovascular e respiratória, e responsável pela primeira medida da pressão

nos vasos sanguíneos (WEST, 1984); e Albrecht von Haller (1708-1777), conhecido por seu trabalho inovador em neurofisiologia, função cardíaca, hemodinâmica e inflamação (FRIXIONE, 2006).

Ambos tinham consciência do horror dos seus próprios experimentos e se preocupavam com sua justificativa moral. Entretanto, não os interromperam, certos da necessidade do uso de animais vivos para a compreensão de processos fisiológicos básicos ainda não entendidos (MAEHLE; TRÖHLER, 1987).

Outros marcos relevantes da Ciência Biomédica do século XVIII, baseados em estudos com animais, incluíram os fundamentos da Embriologia moderna (ROE, 1981), da Farmacologia experimental (MAEHLE, 1999) e da Eletrofisiologia – esta última, encabeçada pelo notório italiano Luigi Galvani (1737-1798), que demonstrou o acoplamento elétrico do sistema neuromuscular (CAJAVILCA; VARON; STERNBACH, 2009). Apesar desses avanços no conhecimento biológico, a relevância clínica dos estudos em animais continuou sendo questionada (FESTING, 1989).

Entretanto, várias mudanças viriam a ocorrer na pesquisa, no século XIX. Charles Darwin (1809-1882) publicou seu livro *A Origem das Espécies* (1859) e estabeleceu as premissas do vínculo entre as diferentes espécies, por meio de ancestrais comuns, durante o processo evolutivo (DARWIN, 1936). Com as descobertas de Charles Darwin, deixando clara a ancestralidade comum entre homens e animais não humanos, pôde ser criado o embasamento

para a extrapolação dos resultados obtidos em experimentos com modelos animais para seres humanos.

Além disso, adicionada às evidências em estudos comportamentais e à similaridade anatomofisiológica em relação aos seres humanos, a teoria da evolução de Darwin passou a representar um forte embasamento para a aceitação da *senciência* dos animais, que é definida como a capacidade de sentir, de estar consciente de si próprio ou apenas do ambiente que o cerca (LUNA, 2006; SINGER, 2002). Nesse aspecto, para promover o bem-estar animal, os pesquisadores devem sempre considerar a evidência de que os animais sentem dor, que pode ser prevenida, ou tratada com terapia apropriada (LUNA, 2008).

Na França, na Académie Royale de Médecine, a experimentação animal passou a ser cada vez mais motivada pelos problemas clínicos surgidos e realizada com o objetivo final de desenvolver novas abordagens terapêuticas para resolver esses problemas. A integração de veterinários na Académie foi considerada valiosa, por sua compreensão de tais experimentos a partir dessa época (LESCH, 1988). Entre muitos outros cientistas proeminentes, dois médicos-fisiologistas destacaram-se por suas contribuições: François Magendie (1783-1855) e, principalmente, seu discípulo, Claude Bernard (1813-1878) (TUBBS *et al.*, 2008; LAFOLLETTE; SHANKS, 1994).

Claude Bernard, em *Introduction à l'Étude de la Médecine Expérimentale/Introdução ao Estudo da Medicina Experimental*, jus-

tificou a utilização de animais em pesquisas sob o argumento de servirem como força de trabalho, ou fonte de alimento, mas terem seu uso proibido para a instrução de uma das ciências mais úteis da humanidade (GOLDIM; RAYMUNDO, 1997). Todavia, ao contrário de seu tutor, defendia que apenas experimentos com animais rigorosamente controlados e conduzidos adequadamente poderiam fornecer informações de relevância médica sobre Fisiologia e Patologia, estabelecendo o marco da Medicina Experimental (NORMANDIN, 2007).

Nesse século, também surge, na Inglaterra, a lei mais antiga acerca do uso de animais na pesquisa. Em 1822, Richard Martin (1754-1834) apresentou, na Câmara dos Comuns, um projeto de lei para abolir a isca de urso, que se tornaria o *Cruel Treatment of Cattle Act*, uma das primeiras leis de proteção que proibia a crueldade contra grandes animais. Ao longo dos anos, novas leis foram adicionadas e, em 1876, é criado o *Cruelty to Animals Act*, a primeira legislação a regulamentar pesquisas científicas com animais (BERKOWITZ, 2006). Outros países a seguiram na elaboração de leis sobre a proteção aos animais utilizados em experimentos (GUIMARÃES; MÁZARO, 2004).

Louis Pasteur (1822-1895) foi outro notório cientista do século XIX, cujo trabalho exigia a infecção experimental de vários animais, além de feridas cirúrgicas, para testar técnicas antissépticas e produtos desinfetantes, o que o tornava o principal alvo dos antiviviseccionistas (DEBRÉ, 2000). Pasteur era, no entanto, mais

sensível ao sofrimento dos animais do que a maioria de seus colegas franceses. Pasteur não apenas se sentia desconfortável com os experimentos realizados – apesar da convicção na necessidade deles –, como insistia para que os animais fossem anestesiados sempre que possível e assim evitar sofrimento desnecessário. Pasteur foi o primeiro a utilizar os atualmente denominados “pontos finais humanitários” (MORTON, 1999).

Com base no pensamento científico dos séculos XVII, XVIII XIX e XX, desenvolveu-se a Medicina do século XXI, cujos avanços surpreendentes salvaram, e certamente continuarão salvando, milhões de vidas – humanas e não humanas. A descoberta de vitaminas; hormônios (como a insulina); antibióticos; vacinas; a transfusão de sangue segura; hemodiálise; quimioterapia e radioterapia; a erradicação da varíola (e quase a erradicação da poliomielite); meios inovadores de diagnóstico; e novas técnicas cirúrgicas; são alguns exemplos desses avanços (FRANCO, 2013).

E diante de todos esses avanços uma constatação: o conhecimento humano não teria chegado tão longe sem a ajuda dos animais de laboratório. De fato, a maioria dessas descobertas passou, em algum estágio do seu desenvolvimento, pela experimentação animal. Nessa lógica, não é de se surpreender que, dos 216 prêmios Nobel de Fisiologia ou Medicina concedidos desde 1901, 180 contemplaram trabalhos realizados em espécies vertebradas (exceto humanos) (FOUNDATION FOR BIOMEDICAL RESEARCH, 2020).

Nas primeiras décadas do século XX, os roedores tornaram-se as ferramentas animais preferenciais de pesquisa. O camundongo (*Mus musculus*) já era usado desde o século XIX – inclusive por Gregor Mendel, (1822-1884) em seus estudos de 1850 sobre a hereditariedade da cor do pelo (HENIG, 2001).

O rato domesticado (*Rattus norvegicus*), por sua vez, foi a primeira espécie de roedor utilizada para fins científicos, com registros na pesquisa fisiológica, desde 1828. Seu uso preferencial ocorre a partir de 1909, com a criação da primeira linhagem padrão de ratos, a Wistar, da qual se estima que descenda metade de todos os ratos usados hoje em laboratório (HEDRICH, 2000).

Ainda no século XX surgiu a maior referência conceitual relativa à experimentação animal adotada pela comunidade científica. Após a primeira edição do *Universities Federation for Animal Welfare's Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals* (1954), um estudo geral sobre técnicas humanas em experimentação animal, foi encomendado, no mesmo ano, ao zoólogo William Russell (1925–2006), e ao microbiologista Rex Burch (1926–1996), sob um projeto presidido pelo imunologista Peter Medawar (1915–1987), laureado com o Prêmio Nobel, em 1960 (RUSSELL, 2005).

Assim, a obra *The Principles of Humane Experimental Technique* (1959), proposta pelos dois pesquisadores, estabeleceu a adoção dos conceitos de *reduction* (redução), *refinement* (refinamento) e *replacement* (substituição) e ficou conhecido como Princípio dos 3Rs (RUSSEL; BURCH, 1959).

A redução indicava que se deveria tentar minimizar a quantidade de animais utilizados em pesquisa. O refinamento orientava a utilização de formas de aprimoramento da pesquisa, a fim de diminuir o desconforto e a dor causada aos animais. Já a substituição postulava que se deveria, em vez de vertebrados, utilizar outros animais, ou materiais que não sentissem dor, como plantas, microrganismos, ou simulações computacionais (ROLLIN, 2006). Assim, desafiaram a crença comum de que os animais vertebrados – e os mamíferos em particular – são sempre os modelos mais adequados à pesquisa biomédica; um raciocínio que chamaram de “falácia de alta fidelidade”.

Após a Segunda Guerra Mundial e seguindo o Princípio dos 3Rs, o uso dos animais em pesquisa passa a ser orientado por documentos internacionais. O Código de Nuremberg, editado pelo Tribunal de Nuremberg, em 1947, por exemplo, determina que os resultados de experimentos com animais sejam utilizados como base para os estudos com seres humanos (LOPES, 2014).

Essa orientação também é encontrada na Declaração de Helsinque (XVIII Assembleia Médica Mundial, de 1964, com a última revisão em outubro de 2013), que afirma: “a pesquisa clínica deve ser baseada em experiências de laboratório e com animais ou em outros fatos cientificamente determinados” (DINIZ; GUILHEM; SCHÜKLENK, 2005).

Em acordo com as diretrizes internacionais, o Conselho Nacional de Saúde regulamentou a Resolução 196/1996, segundo a qual:

as pesquisas que utilizam metodologias experimentais na área biomédica, envolvendo seres humanos, devem estar fundamentadas na experimentação prévia, realizada em laboratórios, utilizando-se animais ou outros modelos experimentais.

A Resolução 196/1996 foi revogada pela Resolução 466/2012, que manteve a necessidade de ensaios pré-clínicos com animais de laboratório (BRASIL, 2012a).

Considerando que a pesquisa clínica necessita de ensaios prévios com animais de laboratório, ressalta-se que devem ser respeitadas as regras de bons tratos e do bem-estar dos espécimes utilizados (WORLD MEDICAL ASSOCIATION, 2008). Nesse sentido, em 1978, a *Declaração Universal dos Direitos dos Animais*, de autoria da Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (Unesco), foi adotada, e tornou-se o documento internacional mais importante para a proteção animal. Essa declaração garante aos animais o direito de não sofrerem maus-tratos, além de proibir experimentos que causem deliberadamente dor física, bem como orienta sobre a substituição desses procedimentos por outros métodos de teste.

Mesmo com todas essas orientações internacionais sobre a experimentação animal, o Brasil, até o final do século XX, ainda não dispunha de legislação específica sobre o tema. De fato, embora, no Brasil, a Constituição Federal de 1988 aborde a temática sobre cuidados com animais de forma muito generalista, não

havia, em território nacional, nenhum amparo legal para animais utilizados no ensino e na pesquisa.

Passados 13 anos de tramitação na Câmara Federal e no Senado, em 8 de outubro de 2008, foi sancionada a Lei 11.794, de autoria do deputado Sérgio Arouca. Conhecida como Lei Arouca, que estabelece critérios para “a criação e a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica, em todo o território nacional” (BRASIL, 2008).

2 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL NO BRASIL – NORMAS E REGULAMENTOS

A Lei Arouca foi regulamentada pelo Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, que dispõe, dentre outras providências, sobre: (1) composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea), órgão integrante da estrutura do Ministério da Ciência e Tecnologia; (2) constituição de Comissões de Ética no Uso de Animais (Ceuas); e (3) criação do Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais (Ciuca).

Considerando o desafio que representa esse marco regulatório, uma vez que pretende criar uma política nacional do uso de animais não humanos em pesquisa, é inerente ao novo a necessidade constante de ajustes em busca de um melhor produto. Diante desse cenário, além do Decreto 6.899/2009, a Lei Arouca foi regulamentada por Resoluções Normativas e Orientações Técnicas

editadas pelo CONCEA, no âmbito da sua competência institucional. Para que o leitor possa situar-se plenamente quanto à legislação nacional vigente, apresenta-se a seguir breve relato contextualizado das 34 Resoluções Normativas (RNs) em vigor e editadas pelo CONCEA, até abril de 2020.

Segundo as RNs que tratam da Instalação e Funcionamento das Comissões de Ética no Uso de Animais (Ceuas) e que incluem diretamente as RNs 1, 2, 6 e 20, qualquer instituição legalmente estabelecida em território nacional que realize criação ou utilização de animais experimentais para pesquisa e ensino, deverá ter pelo menos uma Ceua credenciada no CONCEA (BRASIL, 2010; BRASIL, 2012c; BRASIL 2012e; BRASIL, 2014c).

As Ceuas são componentes essenciais para aprovação, controle e vigilância das atividades de criação, ensino e pesquisa científica com animais, bem como para garantir o cumprimento das normas de controle da experimentação animal editadas pelo CONCEA. Segundo a RN 24, caso a Ceua identifique qualquer discordância com as normas legais e regulamentares vigentes, relacionadas à utilização de animais em ensino ou pesquisa, a comissão deverá abrir processo administrativo dirigido à Secretaria-Executiva do CONCEA para apuração de infração administrativa (BRASIL, 2015d).

A criação das Ceuas representou um grande avanço para a pesquisa nacional, uma vez que, após a aprovação da Lei Arouca, a execução de “todo projeto de pesquisa científica ou atividade de ensino será supervisionado por profissional de nível superior, gra-

duado ou pós-graduado na área biomédica, vinculado à entidade de ensino ou pesquisa credenciada pelo Conceca” (Art. 16 da Lei Arouca). Além disso, tem início a exigência da qualificação da equipe de pesquisadores, pois, anteriormente, não existia a supervisão das equipes de trabalho nem a necessidade de comprovar sua capacitação legal, ética e técnica para procedimentos com animais de laboratório.

Essas resoluções ainda orientam sobre a constituição das Ceuas que devem ser integradas por médicos veterinários, biólogos, docentes e pesquisadores com formação multidisciplinar na área específica e um representante de sociedades protetoras de animais legalmente constituídas e estabelecidas no País. No entanto, na falta da indicação formal desse representante, as Ceuas deverão convidar consultor *ad hoc*, com notório saber e experiência em uso ético de animais.

As instituições interessadas em realizar atividades ou projetos que envolvam animais (filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, exceto humanos), deverão requerer o Credenciamento Institucional para Atividades com Animais para Ensino ou Pesquisa (Ciaep) ao Conceca, por meio do Cadastro de Instituições de Uso Científico de Animais (Ciuca). Para que o cadastro possa ser atendido e renovado a cada cinco anos, a instituição deve comprovar ter adequada estrutura física e pessoal qualificado para produção, manutenção, ou utilização, de animais para atividades de ensino ou pesquisa científica, além de ter Ceua em funcionamento. Para obter mais

detalhes sobre esse cadastro, consultar as RNs 21 e 26 (BRASIL, 2015a; BRASIL, 2015f).

Ao final de cada ano, as Ceuas e os Biotérios deverão submeter relatório, por meio do Ciuca, com informações relativas aos projetos aprovados (RNs 7 e 8), observando os procedimentos de sua elaboração e envio, contidos na Orientação Técnica Conceia 1 (27 de setembro de 2012), e estão sujeitas à suspensão de suas atividades em caso de inadimplência (BRASIL, 2012f; BRASIL, 2012g; BRASIL, 2012b).

A partir de julho de 2014, o Conceia estabeleceu as RNs que tratam dos métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. Em harmonia com o princípio dos 3Rs, os métodos alternativos à experimentação animal podem ser definidos como aqueles que possam ser empregados para substituir, reduzir ou refinar o uso de animais na pesquisa ou ensino. Por meio das RNs 17, 18, 31, 32 e 45, o Conceia reconhece 25 métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. Esses métodos são desenvolvidos, validados e certificados pela Rede Nacional de Métodos Alternativos (Renama) (BRASIL, 2014a; BRASIL, 2014b; BRASIL, 2016c; BRASIL, 2016d; BRASIL, 2019d).

A Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) é um documento que trata dos princípios a serem seguidos sobre os cuidados com animais e a conduta ética relativa à sua utilização, além das instituições, dos Ceuas, dos pesquisadores e dos

professores. A DBCA pode ser consultada na RN 30 (BRASIL, 2016a; BRASIL, 2016b).

Em relação às atividades didáticas, em abril de 2018, foram estabelecidas restrições ao uso de animais em atividades de ensino demonstrativas e observacionais que não tenham como objetivo desenvolver habilidades e competências (RN 38). Em harmonia com o princípio dos 3Rs, a RN 38 determina a substituição dessas atividades por recursos que garantam qualidade suficiente para manter ou aprimorar as condições de aprendizado (BRASIL, 2018c).

As RNs 39 e 43 trouxeram avanços à legislação brasileira, ao dispor sobre restrições ao uso de animais em procedimentos classificados com Grau de Invasividade (**GI**) 3 e 4, em complemento à DBCA (BRASIL, 2018d; BRASIL, 2018e; BRASIL, 2019a). Segundo a RN 27, esses procedimentos são classificados em quatro níveis, a saber: **GI1** = Experimentos que causam pouco ou nenhum desconforto ou estresse; **GI2** = Experimentos que causam estresse, desconforto ou dor, de leve intensidade; **GI3** = Experimentos que causam estresse, desconforto ou dor, de intensidade intermediária; e **GI4** = Experimentos que causam dor de alta intensidade (BRASIL, 2015g). Ainda, de acordo com a RN 39, a capacitação da equipe (legal, ética e técnica) deverá ser avaliada e reconhecida pela Ceua.

Com a finalidade de nortear pesquisadores quanto ao uso de animais para ensino e pesquisa, o Concea elaborou o *Guia Brasi-*

leiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica, um documento disponibilizado na forma de *e-book*, revisado periodicamente, que contempla as informações necessárias para garantir boas condições de produção, manutenção ou utilização dos animais.

O Guia aplica-se aos animais do filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, utilizados em atividades de ensino e pesquisa, conforme prevê a Lei 11.794/2008. Cada capítulo desse Guia, que é atualizado após as publicações das RNs correlacionadas, apresenta informações independentes e aborda assuntos sobre a “Estrutura física e ambiente” e os “Procedimentos” de determinado táxon animal. A RN 25 trata do Capítulo Introdução Geral desse Guia, em que são abordados: Bem-estar animal; Métodos alternativos ao uso de animais; Planejamento de novos projetos; e Obtenção de aprovação para novos protocolos de pesquisa (BRASIL, 2015e).

Apesar de a maioria dos protocolos de pesquisa se concentrar com roedores e lagomorfos, existem legislações que envolvem estudos com outros animais, como espécies silvestres, exóticas ou domésticas, em vida livre ou em cativeiro, ou, ainda, mantidos fora das instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica. As seguintes legislações referem-se a esses animais: RN 22 (animais domésticos); RN 28 (primatas não humanos); RN 29 (anfíbios e serpentes); RNs 34 e 44 (peixes); RN 40 (animais silvestres); RN 41 (cães e gatos domésticos); e RN 42 (equídeos) (BRASIL, 2015b; BRASIL, 2015c; BRASIL, 2015h; BRASIL, 2015i; BRASIL,

2017a; BRASIL, 2017b; BRASIL, 2018f; BRASIL, 2018g; BRASIL, 2018h, BRASIL, 2018i; BRASIL, 2018j, BRASIL, 2018i; BRASIL, 2019b; BRASIL, 2019c).

Além disso, está em andamento a escrita dos capítulos que tratam de pesquisas com pequenos e grandes ruminantes; suínos; aves; répteis (exceto serpentes); e animais silvestres de vida livre. No entanto, quando se planeja um protocolo experimental, independentemente da espécie animal, a RN 37 (Diretriz da Prática de Eutanásia) precisa ser consultada, a fim de se definirem os procedimentos de eutanásia a serem adotados (BRASIL, 2018a; BRASIL, 2018b).

Por último, mas não menos importante, todos os itens e etapas a serem consideradas pelo pesquisador, quando submete um projeto de pesquisa ou ensino à Ceua, devem estar de acordo com a RN 27 (BRASIL, 2015g). Essa resolução dispõe sobre a utilização dos “Formulários Unificados de Solicitação de Autorização para Uso de Animais em Ensino ou Pesquisa Científica” a serem analisados pela Ceua. Orientações sobre como completar esse formulário serão tratadas no próximo tópico, tendo em vista que muitas dúvidas são percebidas durante o preenchimento desses documentos.

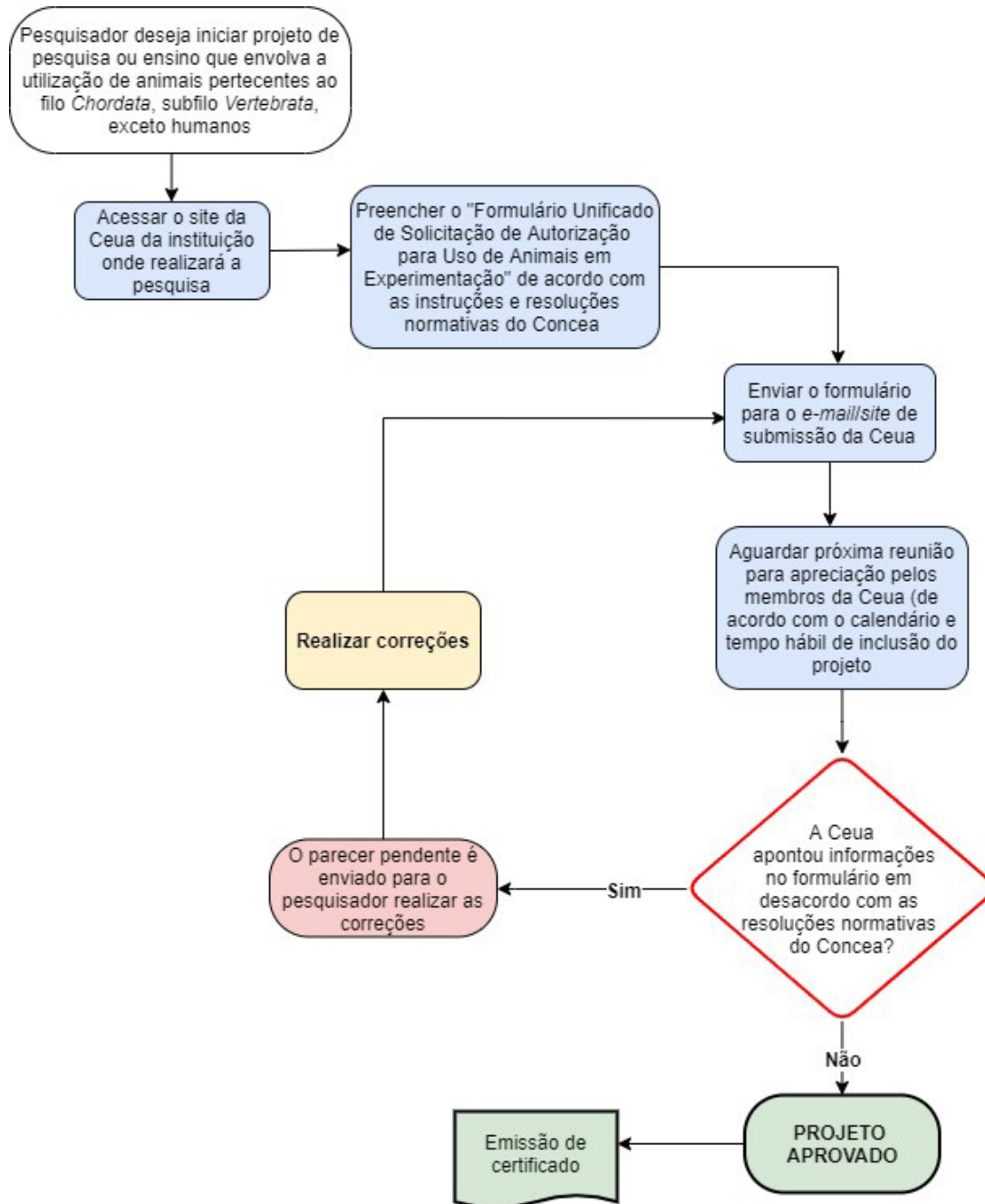
3 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

A seguir são apresentadas as principais orientações a serem seguidas na elaboração e submissão de projetos de pesquisa à Ceua.

3.1 Principais Documentos para a Submissão de Projeto de Pesquisa ou Ensino à Ceua

Para iniciar um projeto de pesquisa ou ensino que envolva a utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, exceto humanos, o pesquisador precisa, inicialmente, submeter o Formulário Unificado de Solicitação de Autorização para Uso de Animais em Experimentação à Ceua da sua instituição, seguindo as resoluções normativas do Concea apresentadas anteriormente, conforme fluxograma contido na Figura 1.

Figura 1 – Fluxograma de submissão do Formulário Unificado de Solicitação de Autorização para Uso de Animais em Experimentação à Ceua



Fonte: Elaborada pelos autores.

3.2 Cuidados na Elaboração de Projetos de Pesquisa ou Ensino para submissão à Ceua

A elaboração de um projeto para submissão à Ceua envolve diversas normas e regulamentos relativos à experimentação animal, de forma a garantir a ética e o bem-estar dos espécimes.

De acordo com a RN 30 do CONCEA, antes da submissão de um projeto à Ceua, o pesquisador deve considerar as seguintes questões (BRASIL, 2016a; BRASIL, 2016b):

- Os benefícios obtidos com o uso dos animais serão potencialmente maiores do que os impactos negativos sobre o seu bem-estar?
- Os objetivos do estudo podem ser atingidos sem a utilização dos animais?
- As espécies de animais selecionadas são as mais apropriadas?
- O estado biológico (incluindo genético, gestacional, nutricional, microbiológico e sanitário) dos animais está adequado?
- Podem ser considerados métodos alternativos?
- As instalações que abrigarão os animais, bem como os equipamentos e técnicas, são adequados?
- Todos os envolvidos foram informados sobre os procedimentos planejados?
- Os envolvidos em cada protocolo possuem treinamento, capacitação e competência para realizar os procedimentos propostos naquele protocolo?

- Os alunos envolvidos receberam treinamento e serão supervisionados adequadamente?
- As condições ambientais (incluindo o tipo de gaiola, ruídos, fotoperíodo, temperatura, umidade, ventilação, densidade de animais em relação ao espaço e estruturas sociais) são apropriadas?
- O projeto foi planejado de forma que resultados estatisticamente válidos possam ser obtidos ou que objetivos educacionais possam ser alcançados utilizando o número mínimo de animais?
- Caso o potencial impacto da manipulação sobre o animal seja desconhecido, a inclusão de um estudo piloto no planejamento do projeto poderá permitir avaliar o impacto sobre o bem-estar do animal?
- Algum aspecto do projeto impactará negativamente sobre o bem-estar dos animais? Em caso afirmativo, o que será feito para minimizar ou evitar esse impacto?
- Quais medidas serão tomadas para a avaliação regular do bem-estar dos animais?
- Algum dos estudos propostos já foi realizado anteriormente? Em caso afirmativo, por que ele deve ser repetido?
- Todas as permissões necessárias foram providenciadas (incluindo as de importação, captura, uso, tratamento, eutanásia ou liberação de animais)?
- Quais medidas serão tomadas quanto ao destino de animais saudáveis ao término do projeto ou protocolo?

Uma vez submetido o projeto, a Ceua o avalia por meio de um parecer, que contempla os seguintes itens:

1. Duração do projeto: o início da utilização dos animais deve levar em consideração o tempo necessário para que o projeto seja analisado pela Ceua. A data inicial deve ser posterior à análise/aprovação.
2. Experiência do pesquisador responsável: deve estar comprovada em seu currículo, especificamente com o modelo animal proposto. Com base nos projetos e publicações do pesquisador, o parecerista julgará a experiência como adequada ou não. Caso o pesquisador não tenha experiência prévia com o modelo animal proposto, um treinamento pode ser ofertado pelo biotério ao qual a Ceua esteja vinculada, para garantir cuidados e manejos adequados aos animais.
3. Título do projeto: a definição da espécie animal deve ser clara, quanto à finalidade do projeto.
4. Resumo do projeto: deve conter informações que embasem a problemática a ser abordada e descrevam em linhas gerais o desenho experimental.
5. Justificativa e relevância: o pesquisador deve justificar o projeto ou protocolo com base nos benefícios potenciais do estudo. Além disso, devem ser citadas referências de outros trabalhos que utilizem metodologia igual ou semelhante.

6. Métodos alternativos: as RNs (17, 18, 31, 32 e 45) que abordam os métodos alternativos ao uso de animais devem ser consultadas pelo pesquisador, para conferir se algum deles pode responder à sua pergunta de partida (BRASIL, 2014a; BRASIL, 2014b; BRASIL, 2016c; BRASIL, 2016d; BRASIL, 2019d).
7. Objetivos: devem estar claros e em consonância com o desenho experimental.
8. Metodologia: deve ser elaborada com base em ampla consulta à literatura sobre o modelo animal proposto. O “n” amostral deve ser o menor possível e é recomendado que seja estabelecido estatisticamente. O desenho experimental deve informar claramente se os animais estarão anestesiados durante a experimentação ou não, qual(is) o(s) anestésico(s) proposto(s) e suas respectivas doses e vias de administração, bem como o tempo de experimentação.
9. Grau de Invasividade (GI): é determinado de acordo com o proposto pelo CONCEA na RN 27 (BRASIL, 2015g). Caso o projeto se enquadre como GI3 ou GI4, o pesquisador deve, antes de submeter o projeto, consultar também a RN 39, que dispõe sobre restrições ao uso de animais em procedimentos classificados com GI3 e GI4 (BRASIL, 2018d; BRASIL, 2018e).
10. Cuidados animais durante a execução do protocolo experimental: para projetos com duração superior a 15 dias,

são maiores as chances de alguns animais adoecerem. Nesse caso, o pesquisador deve prever o procedimento a ser adotado nessa situação, definindo os pontos finais humanitários (RN 23 do CONCEA). Ainda, estratégias de enriquecimento ambiental são incentivadas, apesar de não serem pré-requisitos para a aprovação do projeto.

11. Eutanásia: o método proposto deve ser definido com base na RN 37 do CONCEA, que elenca todos os métodos aceitos/recomendados (BRASIL, 2018a; BRASIL, 2018b).
12. Destino dos animais após a execução do protocolo experimental: os animais utilizados na experimentação animal são considerados resíduos de serviço de saúde, portanto, estão sob a responsabilidade do Biotério. O projeto deve, portanto, descrever claramente como acontecerá o descarte das carcaças animais.
13. Referências bibliográficas: recomenda-se a utilização de referências atuais sobre o modelo animal escolhido; desenho experimental; fármacos analgésicos/anestésicos escolhidos; entre outros aspectos pertinentes.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A sanção da Lei Arouca foi um marco para a experimentação animal no Brasil, uma vez que representou o preenchimento de um vácuo legislativo nacional. No entanto, a regulamentação das práticas relativas ao uso de animais de laboratório no Brasil é um processo em construção. Nesse cenário, é fundamental a atuação do Concea, por meio de suas RNs, para assegurar o alinhamento contínuo da legislação nacional com documentos internacionais de normatização da experimentação animal.

Já existem RNs em processo de elaboração e avaliação, de maneira a abranger todas as espécies do subfilo *Vertebrata*. Além disso, as instituições devem adequar-se às normas de instalações, como também de métodos, e esse procedimento é um contínuo. Portanto, o conteúdo aqui abordado não se encerra, mas deve ser constantemente atualizado por parte de todos os que estão envolvidos na área de Ciência de Animais de Laboratório.

A despeito desses desafios inerentes ao novo, a Lei Arouca permite vislumbrar um equacionamento bioético, assegurando o avanço do conhecimento científico, mas protegendo os animais de laboratório, reconhecendo seus direitos e estatuto moral, além de proteger também o pesquisador, que estará agora salvaguardado de ameaças por leis municipais.

REFERÊNCIAS

BACON, F. The second book of Francis Bacon on the proficiency and advancement of learning, divine and human (originally published in 1605). *In*: MONTAGUE, B. *The Works of Francis Bacon Baron of Verulam*, Viscount St. Albans, and Lord High Chancellor of England. Philadelphia: Carey and Hart, 1842. 544p.

BERKOWITZ, C. Disputed discovery: vivisection and experiment in the 19th century. *Endeavour*, v. 30, p. 98-102, 2006.

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. *Resolução n. 466, de 12 de dezembro de 2012*. Aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. 2012a. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/2013/res0466_12_12_2012.html. Acesso em: 3 mar. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Orientação Técnica n. 1, de 27 de setembro de 2012*. Esclarece sobre os procedimentos de envio do Relatório de Atividades desenvolvidas pelas Comissões de Ética no Uso de Animais (Ceuas) e sobre a solicitação do Credenciamento Institucional para Atividades com Animais em Ensino ou Pesquisa – Ciaep. [2012b]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 22 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Lei n. 11.784, de 8 de outubro de 2008*. [2008]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 22 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Concea*. Resolução Normativa n. 1, Publicação consolidada em 05.09.2012. [2012c]. Dispõe sobre a instalação e o funcionamento das Comissões de Ética no Uso de Animais (Ceuas). Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Concea*. Resolução Normativa n. 2, de 30 de dezembro de 2010. Dispõe sobre a instalação e o funcionamento das Comissões de Ética no Uso de Animais (Ceuas). [2010]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>.

[br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html](https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html). Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Concea*. Resolução Normativa n. 5, de 14 de junho de 2012. Baixa recomendação às agências de amparo e fomento à pesquisa científica, na forma prevista no art. 23 da Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008. [2012d]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Concea*. Resolução Normativa n. 6, de 11 de julho de 2012. Altera a Resolução Normativa n. 1, de 9 de julho de 2010. Dispõe sobre a instalação e o funcionamento das Comissões de Éticas no Uso de Animais (Ceuas). [2012e]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Concea*. Resolução Normativa n. 7, de 13 de setembro de 2012. Dispõe sobre as informações relativas aos projetos submetidos às Comissões de Ética no Uso de Animais - Ceuas a serem remetidas por intermédio do Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais - Ciuca. [2012f]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Concea*. Resolução Normativa n. 8, de 27 de setembro de 2012. Dispõe sobre a prorrogação do prazo para envio do Relatório Anual de Atividades pelas Comissões de Ética no Uso de Animais - Ceuas. [2012g]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Concea*. Resolução Normativa n. 15, de 16 de dezembro de 2013. Baixa a Estrutura Física e Ambiente de Roedores e Lagomorfos do Guia Brasileiro de Criação e Utilização de Animais para Atividades de Ensino e Pesquisa Científica. [2013]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Conceia*. Resolução Normativa n. 17, de 3 de julho de 2014. Dispõe sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil e dá outras providências [2014a]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Conceia*. Resolução Normativa n. 18, de 24 de setembro de 2014. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil, nos termos da Resolução Normativa n. 17, de 03 de julho de 2014, e dá outras providências. [2014b]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Conceia*. Resolução Normativa n. 20, de 31 de dezembro de 2014. Acrescenta art. 1º-A e altera o art. 4º da Resolução Normativa n. 1, de 9 de julho de 2010, que dispõe sobre a instalação e o funcionamento das Comissões de Ética no Uso de Animais (Ceuas). [2014c]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Conceia*. Resolução Normativa n. 21, de 20 de março de 2015. Altera os critérios e procedimentos para requerimento, emissão, revisão, extensão, suspensão e cancelamento do Credenciamento Institucional para Atividades com Animais em Ensino ou Pesquisa - Ciaep das instituições que produzem, mantêm ou utilizam animais para ensino ou pesquisa científica; altera dispositivos da Resolução Normativa n. 1, de 9 de julho de 2010, e revoga as Resoluções Normativas n. 3, de 14 de dezembro de 2011, n. 10, de 27 de março de 2013, n. 14, de 2 de outubro de 2013, e n. 16, de 30 de abril de 2014; e dá outras providências. [2015a]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Conceia*. Resolução Normativa n. 22, de 25 de junho de 2015 (republicada dia 02.10). Baixa o Capítulo “Estudos conduzidos com ani-

mais domésticos mantidos fora de instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica” do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal - CONCEA. [2015b]. Disponível em <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do CONCEA*. Anexo da Resolução Normativa n. 22, de 25 de junho de 2015 (republicado dia 05.10). [2015c]. Disponível em <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do CONCEA*. Resolução Normativa n. 24, de 6 de agosto de 2015. Dispõe sobre os procedimentos para abertura de processo administrativo no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA para apuração de infração administrativa. [2015d]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do CONCEA*. Resolução normativa n. 25, de 29 de setembro de 2015. Baixa o Capítulo “Introdução Geral” do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais para Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal – CONCEA. [2015e]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do CONCEA*. Resolução normativa n. 26, de 29 de setembro de 2015. Disciplina quais estabelecimentos comerciais que produzem animais devem se credenciar junto ao CONCEA, quando comercializam seus produtos a instituições que realizam atividades de ensino ou de pesquisa científica e dá outras providências. [2015f]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do CONCEA*. Resolução normativa n. 27, de 23 de outubro

de 2015. Dispõe sobre a utilização dos Formulários Unificados de Solicitação de Autorização para Uso de Animais em Experimentação (Anexo I) e de Solicitação de Autorização para Uso de Animais em Ensino ou Desenvolvimento de Recursos Didáticos (Anexo II), para solicitação de autorização para uso de animais em ensino ou pesquisa científica pelas Comissões de Ética no Uso de Animais - Ceuas, bem como sobre o Roteiro para Elaboração do Relatório Anual (Anexo III), e dá outras providências. [2015g]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Concea*. Resolução normativa n. 28, de 13 de novembro de 2015. Baixa o Capítulo “Primatas não humanos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica” do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica. [2015h]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Concea*. Resolução normativa n. 29, de 13 de novembro de 2015. Baixa o Capítulo “Anfíbios e serpentes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica” do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica. [2015i]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Concea*. Resolução normativa n. 30, de 02 de fevereiro de 2016. Baixa a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica - DBCA. [2016a]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Concea*. Anexo da resolução normativa n. 30, de 02 de fevereiro de 2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica - DBCA. [2016b]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Conceia*. Resolução normativa n. 31, de 18 de agosto de 2016. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. [2016c]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Conceia*. Resolução Normativa n. 32, de 06 de setembro de 2016. [2016d]. Baixa as Diretrizes de Integridade e de Boas Práticas para Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Conceia*. Resolução normativa n. 33, de 18 de novembro de 2016. Baixa o Capítulo “Procedimentos - Roedores e Lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica” do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica. [2016e]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Conceia*. Resolução Normativa n. 34, de 27 de julho de 2017. Institui o Capítulo “Peixes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica para fins de estudo biológico ou biomédico I - Lambari (*Astyanax*), Tilápia (*Tilapia*, *Sarotherodon* e *Oreochromis*) e Zebrafish (*Danio rerio*)” do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica. [2017a]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Conceia*. Anexo da Resolução Normativa n. 34, de 27 de julho de 2017. Guia de Peixes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica para fins de estudo biológico ou biomédico I - Lambari (*Astyanax*), Tilápia (*Tilapia*, *Sarotherodon* e *Oreochromis*) e Zebrafish (*Danio rerio*) do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica. [2017b].

Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Concea*. Resolução Normativa n. 35, de 11 de agosto de 2017. Dá nova redação ao 2º§ do item VI e ao 1º§ do item VII do Anexo da Resolução Normativa n. 33, de 18 de novembro de 2016, que baixou o Capítulo «Procedimentos - Roedores e Lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica», do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica. [2017c]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Concea*. Resolução Normativa n. 36, de 05 de outubro de 2017. Estabelece o prazo de 120 (cento e vinte) dias para as instituições que produzem, mantêm ou utilizam animais em ensino ou pesquisa científica, já credenciadas ou não junto ao Concea, preencherem o cadastro na nova plataforma do Ciuca. [2017d]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Concea*. Resolução Normativa n. 37, de 15 de fevereiro de 2018. Baixa a Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - Concea. [2018a]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Concea*. Anexo da Resolução Normativa n. 37, de 15 de fevereiro de 2018. Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - Concea. [2018b]. Disponível em <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Concea*. Resolução Normativa n. 38, de 17 de abril de 2018. Dispõe sobre restrições ao uso de animais em ensino, em complemento à Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades

de Ensino ou de Pesquisa Científica - DBCA. [2018c]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Concea*. Resolução Normativa n. 39, de 20 de junho de 2018. Dispõe sobre restrições ao uso de animais em procedimentos classificados com grau de invasividade 3 e 4, em complemento à Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica - DBCA. [2018d]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Concea*. Anexos da Resolução Normativa n. 39, de 20 de junho de 2018. Guia para elaboração de curso de capacitação técnica em manejo de animais de experimentação, Qualificação para execução de procedimento cirúrgico em pesquisa com uso de animais, Qualificação de membro de equipe de projeto de pesquisa com uso de animais envolvendo procedimentos não cirúrgicos com grau de invasividade 3 e 4, ou protocolos que produzam dor intencional e Avaliação do projeto de pesquisa com uso de animais pelo consultor *ad-hoc*. [2018e]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Concea*. Resolução Normativa n. 40, de 24 de julho de 2018. Baixa o Capítulo Estudos conduzidos com animais silvestres mantidos fora de instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica. [2018f]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Concea*. Anexo da Resolução Normativa n. 40, de 24 de julho de 2018. Capítulo Estudos conduzidos com animais silvestres mantidos fora de instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica. [2018g]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>.

[br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html](https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html). Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Conceia*. Resolução Normativa n. 41, de 25 de julho de 2018. Baixa o Capítulo Cães e Gatos domésticos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica. [2018h]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Conceia*. Anexo da Resolução Normativa n. 41, de 25 de julho de 2018. Capítulo Cães e Gatos domésticos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica. [2018i]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Conceia*. Resolução Normativa n. 42, de 25 de julho de 2018. Baixa o Capítulo Equídeos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica. [2018j]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Conceia*. Anexo da Resolução Normativa n. 42, de 25 de julho de 2018. Capítulo Equídeos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica. [2018l]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Conceia*. Resolução Normativa n. 43, de 8 de abril 2019. Estabelece novo prazo para entrada em vigor da Resolução Normativa n. 39, de 20 de junho de 2018, do Conselho Nacional de Controle de Experimenta-

ção Animal, que dispõe sobre restrições ao uso de animais em procedimentos classificados com grau de invasividade 3 e 4. [2019a]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Concea*. Resolução Normativa n. 44, de 1º de agosto de 2019. Baixa o Capítulo Peixes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica - II do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica. [2019b]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Concea*. Anexo da Resolução Normativa n. 44, de 1º de agosto de 2019. Capítulo Peixes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica - II do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica. [2019c]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. *Resoluções Normativas do Concea*. Resolução Normativa n. 45, de 22 de outubro de 2019. Reconhece método alternativo ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. [2019d]. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 16 abr. 2020.

CAJAVILCA, C.; VARON, J.; STERNBACH, G. L. Luigi Galvani and the foundations of electrophysiology. *Resuscitation*, v. 80, p. 159-162, 2009.

COHEN, I. B. Scientific revolution. *Interactions: Some contacts between the natural sciences and social sciences*. Cambridge: MIT Press, 1994.

DARWIN, C. *The origin of species by means of natural selection or the preservation of favoured races in the struggle for life*. New York: Modern Library, 1936.

DEBRÉ, P. *Louis Pasteur*. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1637.

DESCARTES, R. *Discours de la méthode*. Leiden: Ian Maire, 1637.

DINIZ, D.; GUILHEM, D.; SCHÜKLENK, U. (org.). *Ética na pesquisa: experiência de treinamento em países sul-africanos*. Brasília: Letras Livres, 2005.

FEIJÓ, A. G. S. *Utilização de animais na investigação e docência: uma reflexão ética necessária*. Porto Alegre: Edipucrs, 2005.

FESTING, S. Animal experiments: The long debate. *New Scientist*, v. 121, p. 51-54, 1989.

FRANCO, N. H. Animal experiments in biomedical research: A historical perspective. *Animals*, v. 3, p. 238-273, 2013. DOI 10.3390/ani3010238.

FOUNDATION FOR BIOMEDICAL RESEARCH. *Nobel prizes in medicine*. [2020]. Disponível em: <http://www.fbresearch.org/nobelprize/>. Acesso em: 16 abr. 2020.

FRIXIONE, E. Albrecht Von Haller (1708-1777). *Journal of Neurology*, v. 253, p. 265-266, 2006.

GOLDIM, J. R.; RAYMUNDO, M. M. *Pesquisa em saúde e os direitos dos animais*. 2. ed. Porto Alegre: HCPA, 1997.

GOMEZ, R. G. G.; TOMAZ, C. A. B. Aspectos éticos da experimentação com animais não humanos. In: GUILHEM, D.; ZICKER, F. (org.). *Ética na pesquisa em saúde: avanços e desafios*. Brasília: Letras Livres, 2007. p. 195-216.

GUIMARÃES, M. A.; MÁZARO, R. *Princípios éticos e práticos do uso de animais em experimentação*. São Paulo: Unifesp, 2004.

HEDRICH, H. J. The history and development of the rat as a laboratory animal model. In: KRINKE, G. *The laboratory rat*. Waltham: Academic, 2000. p. 3-16.

HENIG, R. M. *The monk in the garden: The lost and found genius of Gregor Mendel, the father of genetics*. Boston: Houghton Mifflin, 2001.

LAFOLLETTE, H.; SHANKS, N. Animal experimentation: The legacy of Claude Bernard. *International Studies in the Philosophy of Science*, v. 8, p. 195-210, 1994.

LESCH, J. E. The Paris Academy of Medicine and Experimental Science. In: COLEMAN, W.; HOLMES, F. L. *The investigative enterprise: experimental physiology in nineteenth-century medicine*. Berkeley: University of California Press, 1988.

LOPES, J. A. Bioética: uma breve história: de Nuremberg (1947) a Belmont (1979). *Revista de Médica*, v. 24, n. 2, p. 253-264, 2014.

LUNA, S. P. L. Dor e sofrimento animal. *In*: RIVERA, E. A. B.; AMARAL, M. H.; NASCIMENTO, V. P. *Ética e bioética*, Goiânia, p. 131-158, 2006.

LUNA, S. P. L. Dor, senciência e bem-estar em animais: Senciência e dor. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, v. 11, p. 17-21, 2008. suplemento 1.

MAEHLE, A. H. *Drugs on trial: experimental pharmacology and therapeutic innovation in the eighteenth century*. Amsterdam: Editions Rodopi, 1999.

MAEHLE, A. H.; TRÖHLER, U. Animal experimentation from antiquity to the end of the eighteenth century: Attitudes and arguments. *In*: RUPKE, N. A. *Vivisection in historical perspective*. London: Croom Helm, 1987.

MORTON, D. B. Humane endpoints in animal experimentation for biomedical research. *In*: HENDRIKSEN, C. F. M., MORTON, D. B. (org.). *Humane endpoints in animals experiments for biomedical research*. London: Royal Society of Medicine Press, London, 1999.

NORMANDIN, S. Claude Bernard and an introduction to the study of experimental medicine: “Physical vitalism”, dialectic, and epistemology. *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences*, v. 62, p.495-528, 2007.

O’MALLEY, C. D. *Andreas Vesalius of Brussels*. Berkeley: University of California Press, 1964.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A EDUCAÇÃO, A CIÊNCIA E A CULTURA. Declaração universal dos direitos dos animais. 1978. Disponível em: <http://www.urca.br/ceua/arquivos/Os%20direitos%20dos%20animais%20UNESCO.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2020.

PAIXÃO, R. L. Aspectos éticos na regulamentação das pesquisas em animais. *In*: SCHRAMM, F. R; REGO, S.; BRAZ, M.; PALÁCIOS M. (org.). *Bioética: riscos e proteção*. Rio de Janeiro: UFRJ, 2005. p. 229-40

PONTES REGIS, A. H.; CORNELLI, G. Experimentação animal: panorama histórico e perspectivas. *Revista Bioética*, v. 20, n. 2, p. 232-243, 2012.

PRIORESCHI, P. A. *History of medicine*. Medieval medicine. 2. ed. Lewiston: Edwin Mellen Press, 1996. v. 5.

PRIORESCHI, P. Experimentation and scientific method in the classical world: Their rise and decline. *Medical Hypotheses*, v. 42, p.135-148, 1994. DOI 10.1016/0306-9877(94)90091-4.

ROE, S. A. *Matter, life, and generation: eighteenth-century embryology and the haller-wolff debate*. Cambridge: Cambridge University Press, 1981.

ROLLIN, B. E. The regulation of animal research and the emergence of animal ethics: A conceptual history. *Theoretical Medicine and Bioethics*, v. 27, n.4, p. 285-304, 2006.

RUPKE, N. A. *Vivisection in historical perspective*. London: Croom Helm, 1987.

RUSSELL, W. M. The three Rs: Past, present and future. *Animal Welfare*, v. 4, p.279-286, 2005.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. *The principles of humane experimental technique*. London: Methuen & Co. Ltd, 1959.

SHACKELFORD, J. *William Harvey and the mechanics of the heart*. New York: Oxford University Press, 2003.

SINGER, P. *Vida ética*. Rio de Janeiro: Ediouro, 2002.

TUBBS, R. S.; LOUKAS, M.; SHOJA, M. M.; SHOKOUHI, G.; OAKES, W. J. François Magendie (1783-1855) and his contributions to the foundations of neuroscience and neurosurgery. *Journal of Neurosurgery*, v. 108, n. 5, p. 1038-1042, 2008. DOI 10.3171/JNS/2008/108/5/1038.

VON STADEN, H. *Herophilus: the art of medicine in early Alexandria*. Cambridge: Cambridge University Press, 1989.

WEST, J. B. Stephen Hales: neglected respiratory physiologist. *Journal of Applied Physiology*, v. 57, p. 635-639, 1984.

WORLD MEDICAL ASSOCIATION. Declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects. 2008. Disponível em: <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>. Acesso em: 13 mar. 2020.

WOOTTON, D. *Bad medicine: doctors doing harm since Hippocrates*. New York: Oxford University Press, 2006.

CAPÍTULO 2 <doi>10.51996/9788574853994.cap2</doi>

INSTRUMENTOS LEGAIS UTILIZADOS EM DIFERENTES PAÍSES EM ESCALA GLOBAL PARA HARMONIZAR O USO DE ANIMAIS PARA FINS CIENTÍFICOS

*Ana Sanches Silva*¹

*Roberta Jeane Bezerra Jorge*²

*João Alison de Moraes Silveira*³

*Mirna Marques Bezerra Brayner*⁴

*Augusto César Aragão Oliveira*⁵

*Ana Carolina Fonseca Lindoso Melo*⁶

*Weibson Paz Pinheiro André*⁷

*Wesley Lyevertton Correia Ribeiro*⁸

*Mirele da Silveira Vasconcelos*⁹

-
- 1 Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), Vairão, Vila do Conde, Portugal. Centro de Estudos em Ciência Animal (CECA), ICETA Universidade do Porto, Porto, Portugal. *E-mail* para correspondência: anateress@gmail.com ou ana.silva@iniav.pt
 - 2 Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC) - Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM- UFC), *Campus* do Porangabuçu, Fortaleza, Ceará, Brasil
 - 3 Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC) - Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM- UFC), *Campus* do Porangabuçu, Fortaleza, Ceará, Brasil
 - 4 Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC) - Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM- UFC), *Campus* do Porangabuçu, Fortaleza, Ceará, Brasil
 - 5 Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará, Brasil
 - 6 Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará, Brasil
 - 7 Centro Universitário Leão Sampaio (Unileão), Juazeiro do Norte, Ceará, Brasil
 - 8 Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC) - Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM- UFC), *Campus* do Porangabuçu, Fortaleza, Ceará, Brasil
 - 9 Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, *campus* Baturité, Ceará, Brasil.

Resumo: A Medicina deve avanços significativos, nos campos da anatomia e fisiologia, ao uso de animais para fins científicos. Nas últimas décadas, tem havido um esforço mundial dos órgãos governamentais para desenvolver uma legislação que limite o uso de animais em investigação científica, para definir condições de garantia do bem-estar dos animais e para encontrar alternativas ao seu uso, sempre que possível. Atualmente, é reconhecido que os animais nunca devem ser submetidos a estudos científicos desnecessariamente e os dados obtidos nos estudos não devem ser mal interpretados. Neste capítulo, é fornecida uma visão geral dos instrumentos jurídicos adotados por diferentes países ou grupos de países no âmbito mundial.

Palavras-Chave: Modelo animal. Revisão. 3Rs. Legislação. Regulamentação. Estudos científicos.

LEGAL INSTRUMENTS USED IN DIFFERENT COUNTRIES AT A GLOBAL SCALE TO HARMONIZE THE USE OF ANIMALS FOR SCIENTIFIC PURPOSES

Abstract: Medicine owes significant advances in the fields of anatomy, physiology to the use of animals in research studies. In the last decades, there has been a worldwide effort of governmental bodies to develop legislation to limit the usage of animals in research studies, define conditions to guarantee animals' welfare, and find alternatives to their use whenever possible. Currently, it is recognized that

animals shall never be subjected to research studies unnecessarily, and the data obtained from the studies shall not be misinterpreted. This chapter presents an overview of the legal instruments adopted by different countries or groups of countries at a pan level.

Keywords: Animal model. Review. 3R's. Legislation. Regulation. Scientific studies.

1 INTRODUÇÃO

O conhecimento da anatomia humana e da fisiopatologia das doenças é basicamente atribuído a estudos pré-clínicos em modelos animais. Os animais mais usados como modelo de estudo são os camundongos e ratos (ROBINSON *et al.*, 2019).

O emprego de modelos animais para a compreensão da anatomia e fisiologia humana remonta à Grécia antiga (ERICSSON; CRIM; FRANKLIN, 2013; ROBINSON *et al.*, 2019). Por exemplo, no século 6 a.C., Aristóteles estudou a embriogênese e a ontogenia em pintinhos. Mais tarde, no Renascimento, os modelos animais contribuíram para um verdadeiro avanço na fisiologia humana (ERICSSON *et al.*, 2013).

Em todo o mundo, há um debate ético em relação ao uso de animais para fins científicos e didáticos. Independentemente da posição defendida, a tendência global é a adoção de medidas legais que sustentem os 3Rs (Redução, Refinamento, Substituição). O investigador deve ter sempre papel relevante e ativo para

atualizar a legislação, a fim de garantir que todos os detalhes das questões éticas sejam fornecidos e que o modelo de validação e os animais mais adequados sejam selecionados (GLUCK; BELL; PEARSON-BISH, 2003).

Neste capítulo, comparamos diferentes países, em escala global, em relação aos seus instrumentos legais sobre o uso de animais para fins experimentais. Na Europa, foi abordada a evolução da legislação da União Europeia. Da América do Norte, abordamos a legislação dos três países, Canadá, Estados Unidos e México; na América do Sul, Argentina, Colômbia, Chile, Uruguai, Peru e Venezuela foram selecionados como os países mais representativos.

Na Ásia, China, Índia, Japão, Rússia e Coreia do Sul foram os principais países abordados. Na África, África do Sul, Quênia e Tanzânia foram escolhidos como países representativos; enquanto na Oceania, foram Austrália e Nova Zelândia os países selecionados para este estudo. Ademais, a Antártica também foi alvo da análise comparativa dos instrumentos legais de controle do uso de animais em investigação.

2 INSTRUMENTOS LEGAIS PARA USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS NA UNIÃO EUROPEIA

Na Europa, em 1986, entraram em vigor dois instrumentos legais para regulamentar o uso de animais para fins científicos. Um deles foi a *Convenção Europeia para a Proteção de Animais Ver-*

tebrados usados para Fins Experimentais e outros Fins Científicos (ETS123) do Conselho da Europa (EUROPE, 1986).

Esse documento reconheceu que o homem tem a obrigação de respeitar os animais e considerar sua capacidade de sofrimento e memória. Assim, deve ser limitado o uso de animais para fins científicos, quando possível, e implementadas medidas alternativas (EUROPE, 1986). O outro instrumento jurídico, a *Diretiva Europeia 86/609/EEC* (EU, 1986), foi estabelecido pela antiga Comunidade Econômica Europeia (CEE), agora União Europeia (UE ou EU – European Union), com o objetivo de alcançar uma legislação comum sobre o uso de animais para fins experimentais e outros estudos científicos. Embora essa diretiva tenha sido a base para a legislação proposta em diferentes Estados-membros da UE, alguns países adotaram medidas mais definidas e abrangentes.

Convém salientar que a convenção e a diretiva apresentavam conteúdos comuns, embora tenham estatuto jurídico diferente. As diretivas devem ser transpostas por todos os membros declarados, enquanto as convenções são juridicamente vinculativas apenas aos países que as ratificam (OLSSON; DA SILVA; TOWNEND; SANDØE, 2016).

A atualização da *Diretiva Europeia 86/609/EEC* teve início com discussões políticas em 1998, e em 2002 o Parlamento Europeu solicitou à comissão que redigisse um projeto da nova diretiva que considerasse a redução, a substituição e o refinamento/aperfeiçoamento dos testes em animais (ABBOTT, 2010). Em 2010, a *Diretiva*

86/609/EEC foi revogada pela *Diretiva 2010/63/EU* (EUROPEAN PARLIAMENT, 2010) com medidas mais rígidas e transparentes na área de experimentação, a fim de garantir a proteção dos animais utilizados para fins científicos.

A formação da UE, com integração econômica e política, permitiu que o bem-estar animal ganhasse mais importância. As principais diferenças entre a *Diretiva 86/609/EEC* e a *Diretiva 2010/63/EU* (EUROPEAN PARLIAMENT, 2010) foram muito bem abordadas, artigo por artigo, por Hartung (2010). De acordo com Hartung, a nova diretiva representa um emprego formal do princípio 3Rs implementado por Russel e Burch em 1959. Além disso, com essa nova diretiva, a Comissão Europeia prova o seu compromisso em melhorar a saúde humana ao permitir testes em animais e melhora da saúde e bem-estar animal, estabelecendo padrões mínimos, que harmonizam os estados membros da EU. Essa diretiva também tem importante papel no avanço do estabelecimento de padrões mundiais de bem-estar animal. O Quadro 1 resume os seis capítulos da *Diretiva 2010/63/EU* (EUROPEAN PARLIAMENT, 2010).

Quadro 1 – Descrição sumária do conteúdo de cada capítulo da *Diretiva 2010/63/EU*

Capítulo	Descrição do Conteúdo
I- Disposições gerais	A aplicação da diretiva, para que fins os animais podem ser usados; define os termos-chave; estabelece o princípio dos 3Rs como orientação para a experimentação animal

MODELOS ANIMAIS: DA LEGISLAÇÃO À EXPERIMENTAÇÃO CIENTÍFICA

<p>II- Disposições sobre a utilização de certos animais em procedimentos</p>	<p>Limitações para o uso de espécies ameaçadas de extinção; primatas não humanos; animais capturados no meio selvagem; e animais errantes ou assilvestrados de espécies domésticas; e define animais criados para fins específicos, como a abordagem padrão para animais das espécies típicas de laboratório</p>
<p>III- Procedimentos</p>	<p>Disposições específicas para implementar os 3Rs por meio de métodos; anestesia; classificação da severidade; reutilização de animais; conclusão do procedimento; partilha de órgãos e tecidos; e libertação e realojamento de animais</p>
<p>IV- Autorização</p>	<p>Requisitos aplicáveis aos criadores, fornecedores e utilizadores de animais em termos de autorizações; requisitos de instalações e equipamento; competência do pessoal e órgãos consultivos; inspeções e requisitos para avaliação e autorização de projetos</p>
<p>V- Prevenção de duplicação de procedimentos e abordagens alternativas</p>	<p>Reconhecimento e desenvolvimento de alternativas não animais</p>
<p>VI- Disposições finais</p>	<p>Regras para implementação, adaptação, relatórios e o papel de diferentes autoridades competentes.</p>

Fonte: European Parliament (2010).

3 INSTRUMENTOS LEGAIS PARA USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS NA AMÉRICA

3.1 Argentina

Em 2011, a Argentina criou um projeto de lei nacional com base na *Diretiva Europeia 2010/63/EU* (EUROPEAN PARLIAMENT, 2010), que abrange todas as instituições privadas e nacionais que utilizam animais para fins científicos. Os princípios dos 3Rs são tratados como princípios gerais que dão suporte ao documento. O projeto também inclui saúde e segurança ocupacional, instalações animais, enriquecimento ambiental, manejo e meio ambiente, bem como educação e treinamento de pessoal e atendimento veterinário (RIVERA; CARBONE; GONZALEZ; BAAMONDE, 2014). Em 2012, a comunidade biomédica argentina readequou o *Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório* (ILAR, 2011), o qual está sendo revisto por um comitê nacional.

A Argentina integrou voluntariamente os Comitês Institucionais de Cuidado e Uso de Animais (Cicuals)/Institutional Animal Care and Use Committees (Iacucs), os quais são de grande importância para a aplicação de princípios gerais à investigação animal. Em 2011, foi criada uma rede IACUC que coordena as atividades dos membros desses comitês (RIVERA; CARBONE; GONZALEZ; BAAMONDE, 2014). No entanto, a Associação de Ciência Animal

Laboratorial mais importante da Argentina é a Argentinean Association for Laboratory Animal Science - AACyTAL (2020). A Argentina também é membro do International Council for Laboratory Animal Science - ICLAS (2020), e da Federation of South American Societies for Laboratory Animal Science - Fessacal (2020).

3.2 Colômbia

Não existe, na Colômbia, uma lei específica sobre o uso de animais de laboratório em investigação e ensino, nem mesmo uma minuta de projeto. No entanto, houve duas minutas de Projetos de Lei, de 2009 a 2011, para modificar a Lei 84, de 27 de dezembro de 1989, sobre a Proteção dos Animais.

Existe um Comitê de Ética (Institutional Animal Care and Use Committee -IACUC) em quase todas as universidades colombianas, mas não há regulamentos especiais sobre a composição e o funcionamento desses comitês. A rede colombiana de Comitês de Ética, denominada Comitês Institucionais de Cuidado e Uso de Animais (CICUALES), é altamente ativa e destina-se a definir critérios para estabelecer Comitês de Ética institucionais (RIVERA; CARBONE; GONZALEZ; BAAMONDE, 2014).

A mais importante associação colombiana de Ciência de Animal de Laboratório é a Asociación Colombiana de la Ciencia y el Bienestar de los Animales de Laboratorio - ACCBAL (2020), vinculada à Fessacal (2020).

3.3 Canadá

No Canadá, o desenvolvimento de um sistema de supervisão para animais de investigação foi estimulado pela comunidade científica. De fato, em 1963, a pedido do Medical Research Council - MRC, o National Research Council - NRC criou um comitê para investigar o cuidado e o uso de animais experimentais. Como resultado, esse comitê recomendou, em 1966, a criação de um programa de controle voluntário exercido por cientistas, em cada instituição, sujeito ao julgamento de pares e comprometido com a implementação dos princípios orientadores de um órgão consultivo independente. E, então, apareceu o que viria a ser mais tarde, especificamente em 1968, o Canadian Council on Animal Care - CCAC (1989).

Embora, no Canadá, os animais usados em investigação científica sejam cobertos pelas regras gerais do Código Penal, que se referem apenas à dor, ao sofrimento e às lesões “desnecessárias”, a maioria das províncias canadenses (Alberta, Manitoba, New Brunswick, Newfoundland and Labrador, Nova Scotia, Prince Edward Island, Quebec e Saskatchewan) fazem referência ao cumprimento das diretrizes e políticas do CCAC nos regulamentos para a ciência baseada em animais. Esse Conselho considera animal um vertebrado não humano ou um cefalópode (CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE, 1989).

Além disso, a província de Ontário é a única que promulgou uma lei específica para animais usados em investigação cientí-

fica, a Animals for Research Act (1990), que permite que uma inspeção controle o registro de instalações de investigação e a emissão de licenças para instalações de abastecimento (GRIFFIN; LOCKE, 2016).

O CCAC é uma organização sem fins lucrativos, autônoma e independente, formada com o apoio de universidades e departamentos governamentais envolvidos na Ciência Animal.

Constituído por 22 organizações, cujos representantes incluem cientistas, educadores, veterinários e delegados da indústria e do movimento de bem-estar animal, e dois financiadores (Canadian Institutes of Health Research - CIHR e o Natural Sciences and Engineering Research Council - NSERC). A certificação CCAC é uma condição para todas as instituições que recebem financiamento das agências federais (CIHR e NSERC) para projetos com animais (GRIFFIN; LOCKE, 2016).

A cada três anos, o CCAC certifica instituições individuais em conformidade com as declarações e as diretrizes de suas políticas, que se baseiam no princípio dos 3Rs. Além disso, para ser certificada pelo CCAC, a instituição deve estabelecer pelo menos um comitê local de cuidados animais, cujos representantes incluem cuidadores de animais, estudantes de graduação, administração institucional, pós-doutorandos, representantes da comunidade local e pesquisadores.

Antes que iniciem oficialmente qualquer trabalho com animais, os investigadores e educadores devem, primeiramente, enviar uma

descrição detalhada do trabalho proposto ao Comitê Institucional de Cuidados Animais para revisão, aprovação e acompanhamento (monitoramento pós-aprovação).

A anuência do trabalho proposto é condicionada à sua contribuição para a compreensão dos princípios biológicos fundamentais ou para o desenvolvimento de conhecimentos que possam beneficiar humanos ou animais. Além disso, o Comitê local é responsável por administrar sua instituição para garantir que as instalações adequadas sejam bem geridas, disponibilizando oportunidades educacionais e materiais de referência para apoiar programas de formação em saúde ocupacional e segurança de utilizadores de animais (GRIFFIN; LOCKE, 2016).

As abordagens canadenses para proteger o bem-estar dos animais em investigações científicas mostram que as atividades do país relativas à regulamentação são amplamente baseadas em costumes e práticas, que legitimam os objetivos da investigação científica por meio de regulamentações e políticas confiáveis para o cuidado e uso de animais para fins científicos.

3.4 Chile

No Chile, a Lei 20,380/2009 (Lei de Proteção Animal) regulamenta temas genéricos como transporte de animais, testes de animais, experimentação e investigação, e abate de animais. Apoia a educação sobre o respeito aos animais e sua proteção; reconhe-

ce-os como seres vivos e sencientes e estabelece as normas para o “reconhecimento, proteção e respeito aos animais” a fim de evitar dor e sofrimento desnecessários. A Lei de Proteção Animal pune crueldade com pena de prisão de até 3 anos (CHILE, 2009).

A Lei 20.380/2009 cria um Comitê Permanente de Bioética Animal, responsável por produzir diretrizes sobre o uso de espécimes submetidos à investigação científica. No entanto, não há definição das espécies consideradas animais para fins científicos (vertebrados, invertebrados ou primatas não humanos). O Comitê Permanente de Bioética Animal é composto por dois acadêmicos, dois cientistas, um investigador, um representante da Associação de Medicina Veterinária e um representante de instituições de proteção a animais de importância nacional.

De acordo com a Lei 20.380/2009 (Art. 5º), os estabelecimentos destinados à investigação e ao ensino relacionados com animais devem possuir instalações adequadas às respectivas espécies e categorias, de forma a evitar maus-tratos e deterioração de sua saúde.

O Art 6º da lei chilena autoriza experiências com animais vivos para os mais diversos fins, incluindo o objetivo geral de estudar e conhecer seus comportamentos. No entanto, essas experiências com animais vivos só podem ocorrer no âmbito das Ciências Veterinárias, Médicas, ou afins, as quais evitarão o sofrimento deles tanto quanto possível. As intervenções cirúrgicas que requeiram anestesia devem ser realizadas por médico veterinário, em instalações adequadas às respectivas espécies animais.

Embora sejam proibidas no ensino básico e no nível médio, as experiências em animais vivos são permitidas em escolas agrícolas e de ensino superior, quando consideradas “indispensáveis” e não podem ser substituídas por experiência acumulada ou métodos alternativos de aprendizagem. Como tal, a Lei 20.380 (Art. 10) incorpora um dos Princípios dos 3Rs, que é a substituição. No entanto, os outros dois princípios: refinamento e redução, não constam nessa lei.

Embora o Chile não tenha legislação específica regulando o cuidado e o uso de animais de laboratório, a existência de Comitês de Ética Animal, na produção de diretrizes, já demonstra o compromisso do país em alcançar os padrões internacionais de cuidado e uso de animais para fins científicos.

3.5 México

Em 1999, o país criou sua primeira lei oficial específica que regulamenta o trabalho com animais de investigação científica: o NOM-062-ZOO-1999, Especificações Técnicas para a Produção, o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (SAGARPA, 2002). Esse documento inclui 15 capítulos, vários apêndices e baseia-se em três outros documentos, internacionalmente reconhecidos: o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, da Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos da América/*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Academy of Sciences of the United States of America* (NRC, 1996);

o Guia para o Cuidado de Animais de Laboratório do Conselho Canadense de Cuidado Animal/*Guide for the Care of Laboratory Animals of the Canadian Council on Animal Care* (1993); e as Diretrizes de Eutanásia da *American Veterinary Medical Association* (ANDREWS; BENNETT; CLARK; HOUP; PASCOE; ROBINSON; BOYCE, 1993).

O NOM-062-ZOO-1999 aplica-se a todas as instituições (acadêmicas, laboratórios governamentais e empresas privadas) que usam animais para fins científicos. Uma lista de instituições com o compromisso de praticar os padrões NOM-062-ZOO-1999 para o uso ético de animais é mantida pela Secretaria da Agricultura, Pecuária, Desenvolvimento Rural, Pesca e Alimentos (Sagarpa) (RIVERA; HERNANDEZ; CARISSIMI; PEKOW, 2016). Cada local de investigação que usa animais de laboratório deve ter pelo menos um Comitê Institucional de Uso e Cuidado de Animais ativo e eficaz (IACUC ou CICUAL) (SAGARPA, 2002).

A Sagarpa oferece supervisão dos programas de uso e cuidado dos animais por meio de seu Programa de Verificação-Certificação. Visitas regulares, normalmente por três anos, são realizadas nas instituições. Nessas visitas, o representante avalia a estrutura e os recursos do programa de cuidado e uso de animais; a composição, o funcionamento e a eficácia do IACUC e a adequação de práticas, procedimentos e instalações de cuidado e uso de animais (RIVERA; CARBONE; GONZALEZ; BAMONDE, 2014).

O NOM-062-ZOO-1999 difere das regulamentações de outros países da América Latina e cobre apenas roedores de laboratório (camundongos, ratos, gerbilos, *hamsters* e porquinhos-da-índia), coelhos, cães, gatos, porcos e primatas não humanos (MÉXICO, 2015; SAGARPA, 2002). Todos os animais usados para fins de investigação científica, ensino ou teste, ou para fins de exibição, devem ser objeto de um protocolo escrito de uso de animais a ser aprovado pelo IACUC antes do início do estudo. Os investigadores devem apresentar um relatório anual ao IACUC com o progresso e solicitar quaisquer emendas ao protocolo. Além disso, cada IACUC deve enviar um relatório anual à Sagarpa (RIVERA; HERNANDEZ; CARISSIMI; PEKOW, 2016).

O NOM-062-ZOO-1999 incorpora os princípios dos 3Rs e a adesão é requisito para o uso científico de animais, no México. O México também possui leis que cobrem, entre outros tópicos, o uso de animais experimentais na Lei de Saúde Geral e seu Regulamento (MÉXICO, 2015); a Lei de Bem-Estar Animal (MÉXICO, 2002); e a Norma Oficial Mexicana para Prevenção e o Controle de Doenças (MÉXICO, 2007), incluindo especificações de saúde para centros de controle caninos (SALUD, 2006).

A mais importante Associação da Ciência de Animais de Laboratório do México é a Asociación Mexicana de la Ciencia de Animales de Laboratorio - AMCAL). O México também é membro do ICLAS (2020), e da Asociación Centroamericana, del Caribe y Mexicana de Animales de Laboratorio - ACCMAL.

3.6 Peru

No Peru, existem dois documentos oficiais que dizem respeito ao cuidado e uso de animais de laboratório. O primeiro é a Lei nacional 27.265/2000, que se destina à Proteção de Animais Domésticos e Selvagens Mantidos em Cativeiro. No Capítulo IV, Art. 10, há normas sobre o uso de animais, para fins científicos, enfatizando principalmente métodos alternativos e contemplando o funcionamento e a composição dos comitês de ética (LACUCS) (PERU, 2000).

O outro documento oficial é o Código de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais, aprovado pelo Instituto Nacional de Saúde de Lima, em 2012, o qual abrange todos os estudos, ensaios diagnósticos e experiências com animais desenvolvidos nessa instituição. A Política do Serviço de Saúde Pública sobre Cuidado Humanitário e Uso de Animais de Laboratório descreve as funções do IACUC (RIVERA; CARBONE; GONZALEZ; BAAMONDE, 2014).

3.7 Uruguai

Os primeiros passos legais para regulamentar a investigação animal, no Uruguai, vieram em 2000, intitulados Regulamentos da Universidade da República (UdelaR): Uso de Animais em Testes, Investigação e Ensino. Um comitê nacional denominado *The Honorary Committee for Experimental Animals*, trabalhou de 2001 a 2008, sob o comando do secretário de Ciência e Tecnologia de

UdelaR, para construir uma estrutura para regulamentar o cuidado e o uso experimentais de animais no país (RIVERA; HERNANDEZ; CARISSIMI; PEKOW, 2016).

Em 2009, foi publicada a Lei 18.611/2009 sobre Uso de Animais em Atividades Experimentais, Ensino e Investigação Científica, estruturada segundo a legislação brasileira (RIVERA *et al.*, 2014) e que fornece a base para o uso de animais por universidades, institutos de investigação e escolas técnicas.

Essa lei criou também um órgão nacional estatutário responsável pelo controle das atividades em que os animais são utilizados, denominado Comissão Nacional de Experimentação Animal (CNEA) e responsável pela revisão das diretrizes sobre alojamento e cuidados de animais destinados a fins experimentais e outros fins científicos.

Além disso, regulamentou o uso de animais em investigação, ensino e testes e os animais incluídos no âmbito dessa legislação são os do *Filo Chordata*, *Subfilo Vertebrata* e determina que criadores de animais, instalações e instituições de investigação que utilizam os animais para fins científicos ou de ensino devem possuir um Registro Nacional (RIVERA; CARBONE; GONZALEZ; BAMONDE, 2014).

Na legislação uruguaia, o processo de revisão ética é obrigatório. Cada instituição de investigação que usa animais de laboratório deve ter pelo menos um IACUC ou CICUAL ativo e eficaz. Os Comitês revisam todos os projetos envolvendo ani-

mais para garantir que sejam justificados por seus benefícios e por minimizar qualquer dor ou sofrimento animal que possa ocorrer em pesquisas científicas e práticas de ensino (URUGUAY, 2009). Os princípios dos 3Rs não estão claramente discriminados na lei uruguaia, salvo o princípio de redução do número de animais utilizados em pesquisas científicas (RIVERA; HERNANDEZ; CARISSIMI; PEKOW, 2016). No entanto, o CNEA incentiva a promoção do bem-estar animal, assim como dos princípios dos 3Rs (CNEA, 2020).

A associação uruguaia mais importante, nesse campo de estudo, é a Associação para Ciência e Tecnologia de Animais de Laboratório do Uruguai (AAUCyTAL, 2020), que teve papel importante no desenvolvimento de uma estrutura regulatória para o uso ético de animais de laboratório nesse país. A AAUCyTAL é membro do ICLAS (2020), e da FESSACAL (2020).

3.8 Venezuela

Não há uma lei específica relacionada ao uso de animais para fins científicos, na Venezuela. A Lei 39.338, de 4 de janeiro de 2010, editada pela Asamblea Nacional de la República Bolivariana de Venezuela, cuida da Proteção da Fauna: Animais Domésticos, Selvagens e em Cativeiro, e é a única que cobre esse aspecto, pois apresenta artigos específicos relacionados com o uso desses animais.

A Lei 39.338/2010 dispõe que:

Só é permitida a utilização de animais domésticos em escolas técnicas, universidades, para o desenvolvimento de práticas laboratoriais constantes de currículos aprovados pelas autoridades competentes, quando não existam outros métodos ou técnicas para obter os mesmos resultados.

E ainda estabelece que:

Animais domesticados que tenham sido submetidos a um experimento afetando suas condições físicas de forma irreversível ou se a morte for inevitável, devido ao protocolo de pesquisa, devem ser abatidos sem dor.

Desde 2008, existem apenas dois comitês de ética ativos que analisam protocolos com animais: um em Caracas (Hospital Vargas) e outro na Universidade de los Andes (Mérida) (RIVERA; CARBONE; GONZALEZ; BAAMONDE, 2014).

3.9 Estados Unidos da América

Nos Estados Unidos da América (EUA) existem duas leis nacionais aplicáveis ao uso de animais na investigação científica: a *Animal Welfare Act (AWA)*, de 1966, e a *Health Research Extension Act (HREA)*, de 1985. Além disso, o uso de animais na investigação dos EUA também é definido por políticas de agências federais como, por exemplo, a *Food and Drug Administration (FDA)*.

Importa mencionar que, no referido país, a oitava edição do *Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório* do *National*

Institutes of Health (NIH), é a base para ajudar instituições e investigadores a cuidar, planejar e conduzir experiências com animais de acordo com os mais elevados critérios científicos, princípios éticos e humanos (ILAR, 2011).

A AWA e a HREA conferem, respectivamente, ao Departamento de Agricultura dos EUA (USDA) e ao Departamento de Saúde e Serviços Humanos (DHHS) a atribuição de fiscalizar e garantir a conformidade das referidas legislações. Essas duas leis têm algumas particularidades: enquanto a AWA abrange animais vertebrados de sangue quente usados para pesquisa, com exceção de ratos (gênero *Rattus*) e camundongos (gênero *Mus*), que são criados para uso em pesquisa; a HREA se aplica a todos os animais vertebrados usados em pesquisas financiadas pelos Institutos Nacionais de Saúde, incluindo ratos e camundongos (GRIF-FIN; LOCKE, 2016).

A AWA exige que todas as instalações de investigação se registrem no Departamento de Agricultura para obter uma licença. O Serviço de Inspeção de Saúde Vegetal e Animal (APHIS), que é uma agência do USDA, é responsável por garantir que as instalações cumpram a AWA. As instalações devem apresentar um relatório anual listando as espécies e o número de animais usados na investigação; relatando o número de animais que sentem dor ou angústia e justificando a metodologia da investigação.

A AWA estabelece padrões mínimos para alojamento e transporte; exige que cada instituição tenha um veterinário responsável;

inclui disposições para enriquecimento ambiental para primatas não humanos e requisitos de exercícios para cães. Os Regulamentos de Bem-Estar Animal, associados à AWA, exigem que cada instituição estabeleça um IACUC para revisar e aprovar todos os usos de animais em investigação.

A AWA também exige que o IACUC investigue reclamações e relate qualquer não conformidade à AWA. Cada IACUC deve incluir no mínimo três pessoas: um cientista experiente, um veterinário e um indivíduo não afiliado à instituição (VASBINDER; LOCKE, 2016).

A HREA apela ao cuidado e tratamento adequados dos animais e à organização do IACUC com os seguintes membros: o veterinário assistente, um cientista, um não cientista, e um membro não afiliado à instituição (GRIFFIN; LOCKE, 2016).

Os três princípios Rs (Substituição - usando material não sentiente que substitui o uso de animais em experimentos ou testes; Redução - usando o número mínimo de animais para os objetivos científicos; e Refinamento - evitando, aliviando ou minimizando a dor potencial, angústia e outros efeitos adversos) são incorporados às leis, aos regulamentos e às políticas dos EUA (ILAR, 2011).

3.10 Outros países da América

O Guia NRC para o cuidado e uso de animais de laboratório (ILAR, 2011) é referência em quase todos os países da América Latina, principalmente naqueles onde não há regulamentação pertinente à experimentação. No entanto, não há informações dispo-

níveis sobre regulamentos, leis e diretivas relativos ao cuidado e uso de animais de experimentação nos seguintes países: Paraguai, Bolívia, Guiana, Suriname, Guiana Francesa; incluindo os da América Central, como Panamá, Honduras e El Salvador (RIVERA; CARBONE; GONZALEZ; BAAMONDE, 2014).

Neste tópico, abordou-se a legislação de vários países da América Latina, exceto a brasileira. Vale ressaltar que o Brasil tem leis específicas de cuidado e uso de animais de laboratório, as quais são detalhadas em outro capítulo deste livro.

4 INSTRUMENTOS LEGAIS PARA USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS NA ÁSIA

O continente asiático é o maior, em extensão territorial, e apresenta variedade de leis nacionais que regulamentam o uso de animais em investigação; porém, as legislações de diversos países incorporam padrões internacionais, como as diretrizes da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE). Assim, é feita breve análise sobre as regulamentações de países que se destacam nesse continente pela quantidade de pesquisas biomédicas desenvolvidas.

4.1 China

A relação histórica entre o homem e os animais não humanos, na China, é influenciada por uma cultura baseada em diferentes

pensamentos filosóficos de religiões como, por exemplo, o budismo, o confucionismo e o taoísmo.

Nas últimas décadas, a China integrou-se na economia mundial de forma significativa, evidenciada, em parte, pelo compromisso em apoiar a investigação biomédica como um impulsionador econômico importante e um papel cada vez mais dominante no panorama global das ciências da vida. Inúmeras instituições, em diversos países, promovem parcerias com a China por meio de *outsourcing* e colaborações para fins de investigação e testes baseados em animais (BAYNE; RAMACHANDRA; RIVERA; WANG, 2015).

Assim, recentemente, Clark e Sun (2020) reconheceram ser urgente a necessidade de informar a comunidade internacional sobre as *Diretrizes para a Revisão Ética do Bem-Estar de Animais de Laboratório, Padrão Nacional da República da China*, anteriormente publicado apenas em mandarim e agora traduzido para o inglês. O princípio básico do documento estipula os requisitos para a revisão ética e gestão do bem-estar animal na produção, no transporte e no uso de animais de laboratório na China.

Atualmente, a investigação animal é regulamentada e administrada de acordo com as leis, regulamentos, diretrizes e padrões nacionais e provinciais (OGDEN; PANG; AGUI; LEE, 2016). Assim, em território chinês, a criação e a utilização de animais de laboratório, bem como qualquer programa que envolva experimentação animal, devem ser realizadas com base na importância do estudo, sem violação de leis e regulamentos. Além disso, os padrões de

conformidade das instalações de animais; qualificações de pessoal; procedimentos operacionais; e todos os aspetos éticos envolvidos em testes com animais, devem ser garantidos (CLARK; SUN, 2020).

4.2 Índia

Na década de 1960, a Lei de Prevenção da Crueldade Animal (PCA) foi aprovada e, posteriormente, revista em 1982. O seu objetivo principal era prevenir o sofrimento desnecessário dos animais. Naquela época, foi criado o Comitê de Fins de Controle e Supervisão de Experiências com Animais (CPCSEA).

O CPCSEA é composto por membros da comunidade científica, autoridades regulatórias e ativistas em prol dos animais e tem a missão de tomar as medidas necessárias para garantir que os animais não sejam submetidos a dor ou sofrimento desnecessário, antes, durante ou após a realização de protocolos experimentais (PEREIRA; VEERARAGHAVAN; GHOSH; GANDHI, 2004).

Atualmente, as organizações que usam animais para fins educacionais, investigação biomédica e produção de vacinas ou medicamentos imunobiológicos, na Índia, devem ser registradas no CPCSEA. Essa obrigação legal foi estabelecida por meio das Regras de Reprodução e Experiências com Animais (Controle e Supervisão), de 1998, que foram alteradas em 2001 e, em seguida, em 2006, para regulamentar a experimentação com animais naquele país (COMMITTEE FOR THE PURPOSE OF CONTROL AND SUPERVISION OF EXPERIMENTS ON ANIMALS, 2018).

Há esforços contínuos da CPSEA para promover a formação em Ciências de Animais de Laboratório com base nas diretrizes internacionais voltadas a manter e promover a conscientização sobre o bem-estar animal entre seus utilizadores (BAYNE; RAMACHANDRA; RIVERA; WANG, 2015).

O CPCSEA tem os seguintes objetivos, que norteiam suas atividades: (1) Registro de estabelecimentos que realizam experimentação animal ou criação para esse fim; (2) Seleção e designação de membros para as Comissões Institucionais de Ética Animal dos estabelecimentos registrados; (3) Aprovação de Biotério com base em relatórios de fiscalizações realizadas pelo CPCSEA; (4) Permissão para experiências envolvendo o uso de animais; (5) Recomendação para importação de animais para uso em experiências; (6) Ação contra estabelecimentos, em caso de violação de qualquer norma ou estipulação legal; e (7) Realização de programas de formação como o CPCSEA, de 2020.

4.3 Japão

No país, existe uma lei que regulamenta o uso de animais para fins científicos e educativos. Várias diretrizes ministeriais fornecem orientação administrativa, ao passo que existem inúmeras diretrizes de organizações. A Lei 105, de 1º de outubro, 1973, do Tratamento e Manejo Humanitário de Animais, (INVESTIGATIVE COMMITTEE, 2001), revista inúmeras vezes, regulamenta os testes em animais no país. No Japão, a ênfase é dada na promoção

de práticas de bem-estar animal compatíveis com as necessidades, sem estipulá-las estritamente por lei (OGDEN; PANG; AGUI; LEE, 2016). Assim, as instituições promovem diretrizes internas que incentivam o bem-estar animal como prática norteadora da experimentação científica.

Desde a criação da Lei do Bem-Estar Animal, o conceito dos 3Rs tornou-se amplamente reconhecido pela comunidade de cientistas da área biomédica. A adoção da política de 3Rs na experimentação científica é incentivada pela Sociedade Japonesa de Animais de Laboratório e Meio Ambiente/*Japanese Society of Laboratory Animals and Environment* (JSLAE); a Associação de Ciência de Animais de Laboratório (JALAS); e a Associação Japonesa de Tecnólogos em Animais Experimentais/*Japanese Association of Experimental Animal Technologists* (JAEAT), por meio de sessões de educação e formação contínuas (KUROSAWA, 2018).

4.4 Rússia (Federação Russa)

O primeiro documento relacionado com o uso humanitário de animais de investigação, na Rússia, oficialmente Federação Russa, foi elaborado pelo Ministério da Saúde da extinta *Russian Soviet Federative Socialist Republic* (Documento 755, de 12 de agosto de 1977), com base nos princípios da Declaração de Helsinque (1964) e nas Regras de Saúde (Documento 1.045-73, de 6 de abril de 1973).

O documento inclui requisitos para instalações experimentais e descreve as regras para prevenção da dor em animais em pro-

protocolos anestésicos. Na Rússia, o campo legislativo sobre experimentação animal foi desenvolvido em harmonia com os padrões internacionais, incluindo os padrões da Diretiva Europeia 2004/10/CE (KUROSAWA, 2018).

Atualmente, as ferramentas para o desenvolvimento da regulamentação do uso de animais de laboratório, na Rússia, têm se baseado no estabelecimento de cooperação técnica por meio da União Econômica Euro-Asiática (EAEU).

4.5 Coreia do Sul

A experimentação animal na Coreia do Sul é regulamentada por duas leis principais: a Lei de Proteção Animal, estabelecida pelo Ministério da Agricultura, Alimentos e Assuntos Rurais, e a Lei de Animais de Laboratório, do Ministério de Segurança Alimentar e de Medicamentos.

A primeira foi promulgada em 1991, no entanto, essa legislação baseava-se principalmente na prevenção do abuso de animais de companhia, com apenas uma disposição sobre animais usados na investigação científica (redução da dor e definição das condições de eutanásia humanitária). Somente em 2008, a Lei dos Animais de Laboratório foi promulgada para aumentar os valores éticos na experimentação animal e promover uma utilização adequada das instalações de animais, incluindo o estabelecimento de comitês de ética em experimentação. Os comitês locais, compostos por 3 a 15 membros, incluem, necessariamente, um veterinário

de animais de laboratório e uma pessoa com formação e experiência em proteção animal, recomendada por uma organização não governamental, selecionada por decreto presidencial (OGDEN; PANG; AGUI; LEE, 2016).

Embora exista legislação específica na Coreia do Sul, Nam *et al.* (2018) afirmam que é necessário estimular a investigação no país para superar o problema da reprodutibilidade e atenção ao cumprimento das diretrizes dos 3Rs. Após avaliar 50 artigos científicos publicados na área biomédica e produzidos no país entre os anos de 2013 e 2016, Nam *et al.* (2018) afirmam que apenas 8% mencionaram avaliações e intervenções relacionadas com o bem-estar animal e 4% não mencionaram quaisquer implicações de métodos experimentais ou descobertas que apontem critérios relacionados aos 3Rs. O mesmo estudo enfatiza a necessidade de desenvolver programas educacionais em Ciência de Animais de Laboratório para investigadores no país.

5 INSTRUMENTOS LEGAIS PARA USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS NA ÁFRICA

Entre os países africanos avaliados quanto a políticas e diretrizes relativas ao bem-estar dos animais utilizados em pesquisa e ensino, constatou-se que a maioria não tem legislação específica (KIMWELE; MATHEKA; FERDOWSIAN, 2011). Essa falta de legislação propicia que empresas estrangeiras com escritórios em

países africanos desenvolvam pesquisas científicas com animais de laboratório (NYIKA, 2009).

No continente africano, determinados países sob influência britânica usaram o *Animal Protection Act*, da Grã-Bretanha, aprovado em 1911, como modelo para redigir sua legislação. No entanto, países como África do Sul, Quênia e Tanzânia promulgaram sua própria legislação de bem-estar animal (HAU; GUHAD; COOPER; FARAH; SOUILEM; HAU, 2014).

5.1 África do Sul

Na África do Sul, duas leis regulam o bem-estar animal: a *Animal Protection Act 71*, de 1962, e a *Performing Animals Protection Act 24*, de 1935. No entanto, o uso de animais para fins científicos segue as diretrizes do *African Medical Research Council Act 58*, de 1991, revisado em 2004.

As diretrizes da Lei do Conselho Africano de Investigação Médica 58, de 1991 (SOUTH AFRICA, 1991), afirmam que todo trabalho experimental que utiliza animais, quer seja no âmbito da pesquisa ou do ensino, deve ser submetido a um Comitê de Ética Animal. Esse Comitê é constituído por um membro de uma organização de bem-estar animal; um veterinário; um membro da instituição; e voluntários com experiência no uso de animais para fins científicos.

Esses acordos são descentralizados e cada instituição atua conforme suas próprias políticas, adotando voluntariamente as recomendações de cada comitê. Além das diretrizes da Lei do Con-

selho de Investigação Médica da África, o *South African Bureau of Standards* (SABS) produziu o Guia Nacional da África do Sul para o Cuidado e Uso de Animais para Fins Científicos/*South African National Standard for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes* (SANS) 10386, de 2008, com o objetivo de garantir que as experiências científicas com animais sigam os princípios dos 3Rs (SOUTH AFRICAN, 2008).

5.2 Quênia

A Lei de Prevenção da Crueldade contra os Animais, de 1962 (KENYA, 1983), revista em 2012, determina a garantia do bem-estar animal, no Quênia. A legislação estabelece que “qualquer experiência realizada num animal que é responsável por causar dor, mas não inclui uma operação”, deve ser realizada com animais anestesiados e por profissionais registrados nos termos da Lei dos Cirurgiões Veterinários ou da Lei dos Médicos e Dentistas; ou deve estar sob a supervisão de alguém registrado sob uma dessas Leis. Porém, não há comitês de ética animal que avaliem as propostas de cada estudo científico.

5.3 Tanzânia

A Lei de Bem-Estar Animal é utilizada para animais invertebrados e vertebrados e baseia-se nos princípios dos 3Rs, para evitar experiências com animais e que eles possam ser substituídos por

métodos alternativos (ANIMAL WELFARE LAW ACT, 2008). Essa lei considera crime maltratar animais, administrar substâncias tóxicas e realizar procedimentos cirúrgicos sem autorização das autoridades responsáveis.

6 INSTRUMENTOS LEGAIS PARA USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS NA OCEANIA

São poucas as informações disponíveis sobre as diretrizes e legislações relacionadas com o uso de animais nos diferentes países da Oceania. Aqui, destacamos sucintamente algumas das ações e leis mais importantes relacionadas com o uso de animais de experimentação científica na Austrália e na Nova Zelândia. Historicamente, ambos os países foram fortemente influenciados pelo Reino Unido, em termos de legislação de bem-estar animal, embora a Austrália tenha desenvolvido recentemente diretrizes de acordo com cada jurisdição.

6.1 Austrália

Legislações, regulamentações e diretrizes distintas são aplicadas em cada um dos seis estados e dois territórios da Austrália para prevenir a crueldade e o sofrimento dos animais. Os governos estaduais e territoriais têm a responsabilidade principal pelo bem-estar animal na sua jurisdição, de acordo com os 3Rs e com o Código de Prática Australiano para o Cuidado e Uso de Animais

para Fins Científicos/*Australian Code of Practice for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes*. Embora existam diferenças na legislação de bem-estar animal entre os estados e territórios australianos, os principais fundamentos são semelhantes, uma vez que todos adotam o Código como referência principal.

O Código foi criado em 1969, pelo National Health and Medical Research Council (NHMRC), para regulamentar todas as atividades envolvendo animais em investigação. O objetivo era garantir o cuidado humano, ético e responsável e o uso de animais para qualquer finalidade, visando à aquisição, ao desenvolvimento ou à demonstração de conhecimento ou técnicas em qualquer área da ciência, incluindo ensino, teste de produtos, estudos ambientais, testes de campo, diagnóstico, indústria e outros. O Código é atualizado regularmente e sua última revisão (oitava) foi lançada em 2013 (NATIONAL HEALTH AND MEDICAL RESEARCH COUNCIL, 2013).

Adicionalmente ao Código, as legislações mais importantes para o uso de animais de experimentação científica referentes a cada um dos estados e territórios australianos estão resumidas no Quadro 2.

Quadro 2 – Principais legislações de bem-estar animal em cada estado ou território australiano

Região Australiana	Legislação de Bem-Estar Animal
Território Capital da Austrália/Australian Capital Territory	Animal Welfare Act 1992 (Australian Capital Territory, 1992) Animal Welfare Regulation 2001

MODELOS ANIMAIS: DA LEGISLAÇÃO À EXPERIMENTAÇÃO CIENTÍFICA

Região Australiana	Legislação de Bem-Estar Animal
Nova Gales do Sul/New South Wales)	Animal Research Act 1985 (New South Wales Government, 1985) Animal Research Regulation 2010
Território do Norte/Northern Territory)	Animal Welfare Act 1999 (Northern Territory Government, 1999) Animal Welfare Regulations
Queensland	Animal Care and Protection Act 2001 (Queensland Government, 2001) Animal Care and Protection Regulations, 2012
Sul da Austrália/South Australia	Animal Welfare Act 1985 (South Australian Government, 1985) Animal Welfare Regulations, 2012
Tasmânia	Animal Welfare Act 1993 (Tasmanian Government., 1993) Animal Welfare (General) Regulations, 2015
Victoria	Prevention of Cruelty to Animals Act 1986 (Victorian Government, 1986) Prevention of Cruelty to Animals Regulations, 2008
Austrália Ocidental/Western Australia)	Animal Welfare Act 2002 (Western Australian Government, 2002) Animal Welfare (Scientific Purposes) Regulations, 2003

Fonte: Elaborado pelos autores.

A fim de favorecer o bem-estar animal e equilibrar essas disparidades entre a legislação de cada estado e territórios, o NHMRC estabeleceu algumas diretrizes e referências complementares em conformidade com o Código (2016): (1) código australiano para a conduta responsável de investigação científica (2007); (2) diretrizes para a geração, a criação, o cuidado e o uso de animais geneticamente modificados e clonados para fins científicos (2007); (3)

diretrizes para a produção de anticorpos monoclonais (2008); (4) diretrizes para promover o bem-estar de animais usados para fins científicos: avaliação e alívio da dor e sofrimento em animais para fins científicos (2008); (5) diretrizes sobre o uso de animais para formação de médicos intervencionistas e demonstração de novos equipamentos e técnicas médicas (2009); (6) diretrizes sobre o cuidado de cães usados para fins científicos (2009); (7) diretrizes sobre o cuidado de gatos usados para fins científicos (2009); (8) um guia para o cuidado e uso de mamíferos nativos australianos em investigação e ensino (2014); (9) princípios e diretrizes para o cuidado e uso de primatas não humanos para fins científicos (2016).

Além disso, com a legislação nacional de bem-estar animal, têm sido usados códigos modelo de prática em estados e territórios (AUSTRALIAN GOVERNMENT DEPARTMENT OF AGRICULTURE AND WATER RESOURCES, 2020). Certos países estão atualmente sob avaliação, como parte da Estratégia Animal Australiana, a fim de serem incorporados como parte dos Regulamentos dos Estados e Territórios relativos ao uso de animais em investigação científica (Quadro 3) (NOONAN; WILLIAMS, 2019).

Quadro 3 – Códigos de prática e documentos de orientação para fins científicos em diferentes estados e territórios australianos

Âmbito	Código de Prática /Documento de Orientação
Nacional Australian Government Department of Agriculture, (2004)	Comitê Consultivo Nacional de Diretrizes de Bem-Estar Animal/National Consultative Committee of Animal Welfare Guidelines

MODELOS ANIMAIS: DA LEGISLAÇÃO À EXPERIMENTAÇÃO CIENTÍFICA

<p>Nova Gales do Sul New South Wales Animal Research Review Panel (2020)</p>	<p>Diretrizes do Painel de Revisão de Pesquisa Animal para o Cuidado e Alojamento de Cães em Instituições Científicas/Animal Research Review Panel Guidelines for the Care and Housing of Dogs in Scientific Institutions</p> <p>Diretrizes do Painel de Revisão de Pesquisa Animal para rastreamento por rádio em pesquisa de vida selvagem/Animal Research Review Panel Guidelines for radio tracking in wildlife research</p> <p>Diretrizes de cuidados com animais do Painel de Revisão de Pesquisa Animal para pesquisas de vida selvagem/Animal Research Review Panel Animal care guidelines for wildlife surveys</p> <p>Diretrizes do Painel de Revisão de Pesquisa Animal sobre pesquisas oportunistas sobre vida selvagem em vida livre/Animal Research Review Panel Guidelines on opportunistic research on free living wildlife</p> <p>Diretrizes do Painel de Revisão de Pesquisa Animal sobre o uso de animais selvagens em pesquisas/Animal Research Review Panel Guidelines on the use of feral animals in research</p> <p>Diretrizes do Painel de Revisão de Pesquisa Animal sobre a coleta de espécimes testemunha /Animal Research Review Panel Guidelines on collection of voucher specimens</p> <p>Diretrizes do Painel de Revisão de Pesquisa Animal sobre o uso de armadilhas/Animal Research Review Panel Guidelines on the use of pitfall traps</p> <p>Diretrizes do Painel de Revisão de Pesquisa Animal para a produção de anticorpos monoclonais/Animal Research Review Panel Guidelines for the production of monoclonal antibodies</p> <p>Supervisão do Painel de Revisão de Pesquisa Animal do Suprimento Animal por Comitês de Ética Animal/ Animal Research Review Panel Supervision of Animal Supply by Animal Ethics Committees</p> <p>E outras orientações para o cuidado e manejo de algumas espécies de animais de laboratório – ratos, camundongos, porquinhos-da-índia, ovelhas, dentre outros – em instituições de pesquisa</p>
<p>Victoria Victoria Agriculture (2020)</p>	<p>Código de prática para alojamento e cuidado de camundongos, ratos, porquinhos-da-índia e coelhos de laboratório/<i>Code of Practice for the Housing and Care of Laboratory Mice, Rats, Guinea Pigs and Rabbits</i></p>
<p>Sul da Austrália South Australia Department of Environment (2020)</p>	<p>Coleta de sangue de animais selvagens</p> <p>Coleta de amostras de cabelo e penas</p> <p>Coleta de espécimes testemunha</p> <p>Eutanásia de animais de pesquisa no campo</p> <p>Relato de eventos adversos</p> <p>Transporte de animais vivos</p> <p>Uso de armadilhas vivas para capturar vertebrados terrestres</p> <p>Uso de <i>microchips</i> para marcação de animais selvagens</p> <p>Uso de túneis de rastreamento</p>

Fonte: Elaborado pelos autores.

6.2 Nova Zelândia

A principal legislação de bem-estar animal da Nova Zelândia é o *Animal Welfare Act* 1999 (NEW ZEALAND GOVERNMENT, 1999). No Art. 6º, essa lei discute exclusivamente o uso científico de animais, o qual compreende qualquer manipulação visando teste (experimental, de investigação, toxicidade, diagnóstico, potência); ensino; produção de antissoros; ou outra produção biológica. A última versão da lei foi lançada em 2015 (*Welfare Amendment Act*), quando o uso de animais para qualquer finalidade cosmética era estritamente proibido.

Além disso, o *National Animal Ethics Advisory Committee* lançou o *Guia de boas práticas para o uso de animais em investigação, testes e ensino/Good Practice Guide for the Use of Animals in Research, Testing, and Teaching*, em 2010. O Guia Prático amplia e complementa a lei, fornecendo orientação geral para uso e cuidado com os animais em todos os tipos de investigação ou atividades, seja em veterinária, biologia, medicina, indústria, ensino ou outras áreas.

Outras diretrizes e regulamentos importantes relativos ao uso de animais em investigação são fornecidos como se segue: (1) Lei de Biossegurança (BIOSECURITY ACT, 1993); (2) Lei de Substâncias Perigosas e Novos Organismos (HAZARDOUS SUBSTANCES AND NEW ORGANISM ACT, 1996); (3) Eutanásia de Animais Usados para Fins Científicos/*Euthanasia of Animals Used for*

Scientific Purposes; (4) Padrão da Autoridade de Biossegurança MAF 154.03.03: Instalações de Contenção para Animais Vertebrados de Laboratório/*MAF Biosecurity Authority Standard 154.03.03: Containment Facilities for Vertebrate Laboratory Animals* (NEW ZEALAND, 2003); (5) Regulamentos da *International Air Transport Association* (IATA, 2020); (6) Transporte de Animais dentro da Nova Zelândia (NATIONAL ANIMAL WELFARE ADVISORY COMMITTEE, 2011).

7 ANTÁRTICA

A Antártica comporta vida em abundância, desde bactérias até muitas espécies de organismos complexos. O seu clima e geografia particulares têm suscitado problemas específicos de soberania, jurisdição, proteção do ambiente, conservação e exploração dos recursos naturais. As soluções para esses problemas surgem com o Sistema do Tratado da Antártica/*Antarctic Treaty System -ATS* (ANTARCTIC TREATY, 1959) e seus mecanismos, como o Protocolo de Proteção Ambiental ao Tratado da Antártica (1911), também conhecido como Protocolo de Madrid (PROTOCOL ON ENVIRONMENTAL PROTECTION TO THE ANTARCTIC TREATY. INTERNATIONAL LEGAL MATERIAL., 1991). De acordo com esse Protocolo, a Antártica é uma reserva natural dedicada à paz e à ciência. Ao longo dos cinco anexos do protocolo, normas específicas de proteção ambiental e recomendações devidamente aprovadas

são inseridas em um instrumento jurídico integrado, que permite futuras modificações ou acréscimos de novos anexos por meio de medidas, decisões e resoluções aprovadas na Reunião Consultiva do Tratado da Antártica (ANTARCTIC TREATY, 1991).

Além do ATS e do Protocolo de Madrid, existe o Código de Conduta para o Uso de Animais para Fins Científicos na Antártica do Comitê Científico de Investigação Antártica/*Scientific Committee on Antarctic Research's Code of Conduct for the Use of Animals for Scientific Purposes in Antarctic* (IP53, 2011). Esse Código de Conduta fornece princípios orientadores, estrutura ética e descreve responsabilidades para pesquisadores e instituições que realizam investigação científica com animais na Antártica, considerando a senciência dos animais, a fim de evitar ou minimizar eticamente a dor, a angústia, o desconforto ou qualquer outra fonte de sofrimento animal.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É inquestionável a contribuição do uso de modelos animais para fins científicos, particularmente os avanços no âmbito da medicina. O uso desses modelos é fundamental para o alcance de resultados confiáveis em prol da obtenção de dados experimentais que são posteriormente aplicados na espécie humana. Embora o uso desses modelos revele grande importância para o desenvolvimento científico, faz-se necessário seguir normas de proteção, premissa de uma

pesquisa humanitária da experimentação animal como o princípio dos 3 Rs (*Replacement, Reduction and Refinement*). Assim, deve-se reduzir o número de animais, com o uso de métodos alternativos, como modelos *in silico* e cultura de células. Métodos que minimizem o número de animais usados no estudo em questão e métodos que minimizem a dor, o sofrimento, a angústia ou dano duradouro que possa ser experimentado pelos animais.

Nesse viés, os instrumentos jurídicos que normatizam o uso mundial de animais para fins experimentais e estabelecem padrões mínimos de proteção, são de vital importância. No entanto, ainda há um longo caminho para o alcance desse objetivo, devido à diversidade de instrumentos jurídicos nos diferentes países e continentes.

Se, por um lado, há países na linha de frente no que diz respeito à defesa dos direitos do bem-estar dos animais e do estabelecimento de mecanismos legais que os protejam no curso da realização de estudos científicos, como nos estados-membros da União Europeia, no Canadá e nos Estados Unidos, ainda existem países, principalmente na África, que não têm legislação específica para proteger os animais utilizados na pesquisa experimental e nos estudos educacionais.

AGRADECIMENTOS

O trabalho foi apoiado pela UIDB/00211/2020 com financiamento da FCT/MCTES através de fundos nacionais.

REFERÊNCIAS

- ARGENTINEAN ASSOCIATION FOR LABORATORY ANIMAL SCIENCE. 2020. Disponível em: <http://aacytal.org/>. Acesso em: 15 ago. 2020
- ARGENTINEAN ASSOCIATION FOR LABORATORY ANIMAL SCIENCE. Association for Laboratory Animal Science and Technology from Uruguay, 2020.
- ABBOTT, A. Lab-animal battle reaches truce. *Nature*, v. 464, n. 7291, 2010. DOI 10.1038/464964a.
- ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE LA CIENCIA Y EL BIENESTAR DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO. 2020. Disponível em: <http://www.accbal.org/>. Acesso em: 15 ago. 2020.
- ASOCIACIÓN CENTROAMERICANA, DEL CARIBE Y MEXICANA DE ANIMALES DE LABORATORIO. 2020. Disponível em: <https://twitter.com/accmal>. Acesso em: 15 ago. 2020.
- ASOCIACIÓN MEXICANA DE LA CIENCIA DE ANIMALES DE LABORATORIO. 2020. Disponível em: <http://amcal-ac.blogspot.com/>. Acesso em: 15 ago. 2020.
- ANDREWS, E. J. *et al.* Report of the American Veterinary Medical Association panel on euthanasia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 202, p. 229-249, 1993.
- ANIMAL WELFARE LAW ACT. *Animal Welfare Law Act*. 2008. Disponível em: <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/tan85327.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2020.
- ANTARCTIC TREATY. *United Nations Treaty Series*, v. 402, n.71, 1959.
- ANTARCTIC TREATY. *Annex III to the protocol on environmental protection to the Antarctic Treaty (Madrid protocol)*, 1991.
- AUSTRALIAN CAPITAL TERRITORY. Animal welfare act 1992. *Act n. 45*. Disponível em: http://www.austlii.edu.au/au/legis/act/consol_act/awa1992128/. Acesso em: 15 ago. 2020.
- AUSTRALIAN GOVERNMENT DEPARTMENT OF AGRICULTURE AND WATER RESOURCES. *Australian animal welfare standards and guidelines (model codes of practice)*. 2020. Disponível em: <http://www.agriculture.gov.au/animal/welfare/standards-guidelines>. Acesso em: 15 ago. 2020.

AUSTRALIAN GOVERNMENT DEPARTMENT OF AGRICULTURE, F. F. *NC-CAW position statements*, 2004.

BAYNE, K. *et al.* The Evolution of Animal Welfare and the 3Rs in Brazil, China, and India. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, v. 54, n. 2, 2015.

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. *CCAC policy statement on: the ethics of animal investigation*. Ottawa, ON, Canada, 1989. Disponível em:

http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/POLICIES/ETHICS.HTM. Acesso em: 15 ago. 2020.

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. *Guide for the care of laboratory animals of the canadian council on animal care*. Ontario: Canada, 1993. Disponível em: https://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Experimental_Animals_Vol1.pdf. Acesso em: 15 ago. 2020.

CHILE. *Ley no 20.380/2009 on the protection of animals*, 2009.

CLARK, J. A. M.; SUN, D. Guidelines for the ethical review of laboratory animal welfare People's Republic of China National Standard GB/T 35892-2018 [Issued 6 February 2018 Effective from 1 September 2018]. *Animal Models and Experimental Medicine*, 3(1), 103-113, 2020.

COMISIÓN NACIONAL DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL. 2020. Disponível em: <http://www.cnea.gub.uy/>. Acesso em: 15 ago. 2020.

COLOMBIA. *Estatuto Nacional de Protección Animal*. Ley n- 84/1989. 1989. Disponível em: <http://www.fao.org/faolex/results/details/es/c/LEX-FAOC023531/> Acesso em: 15 ago. 2020.

COMMITTEE FOR THE PURPOSE OF CONTROL AND SUPERVISION OF EXPERIMENTS ON ANIMALS. *In functions of CPCSEA*. 2020. Disponível em: http://cpcsea.nic.in/Content/58_1_Functions.aspx. Acesso em: 15 ago. 2020.

COMMITTEE FOR THE PURPOSE OF CONTROL AND SUPERVISION OF EXPERIMENTS ON ANIMALS. 2018. Disponível em: <http://cpcsea.nic.in/WriteReadData/userfiles/file/Compendium of CPCSEA.pdf>. Acesso em: 30 ago. 2020.

COUNCIL OF EUROPE. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. *Cets*, v. 170, n.

123, 1986. Disponível em: <http://www.coe.int/en/web/conventions/full-list/-/conventions/treaty/123>. Acesso em: 15 ago. 2020.

ERICSSON, A. C.; CRIM, M. J.; FRANKLIN, C. L. A brief history of animal modeling. *Missouri Medicine*, v. 110, n. 3, p. 201-205, 2013.

EUROPEAN UNION. Council Directive 86/609/EEC on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. *Official Journal of the European Communities*, (L), L358/1, 1986.

EUROPEAN PARLIAMENT. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union*, L276, 33-79, 2010.

FESSACAL. *Federación de sociedades sudamericanas de ciencias en animales de laboratorio*, 2020. Disponível em: <http://www.fessacal.com/en/>. Acesso em: 15 ago. 2020.

GLUCK, J. P.; BELL, J. B.; PEARSON-BISH, M. Confronting ethical issues in the use of animals in biomedical and behavioral research: The search for principles. *Handbook of Professional Ethics for Psychologists: issues, questions, and controversies*, v. 171, p. 257-274, 2003. DOI 10.4135/9781412990004.n15.

GRIFFIN, G.; LOCKE, P. Comparison of the canadian and US laws, regulations, policies, and systems of oversight for animals in research. *ILAR J.*, v. 57, p. 271-284, 2016. DOI 10.1093/ilar/ilw037

HARTUNG, T. Comparative analysis of the revised directive 2010/63/EU for the protection of laboratory animals with its predecessor 86/609/EEC - A t4 report. *Altex*, v. 27, n. 4, p. 285-303, 2010. DOI 10.14573/altex.2010.4.285

HAU, A.R.; GUHAD, F. A.; COOPER, M. E.; Farah, I. O.; SOUILEM, O.; HAU, J. Animal experimentation in Africa: Legislation and guidelines: Prospects for improvement. *Laboratory Animals*, p. 205-217, 2014. Academic Press.

INTERNATIONAL AIR TRANSPORTATION ASSOCIATION. *Live animal regulations*. 2020. Disponível em: <https://www.iata.org/en/programs/cargo/live-animals/>. Acesso em: 15 ago. 2020.

INTERNATIONAL COUNCIL FOR LABORATORY ANIMAL SCIENCE. 2020. Disponível em: <https://iclas.org/>. Acesso em: 15 ago. 2020.

INSTITUTE FOR LABORATORY ANIMAL RESEARCH. *Guide for the care and use of laboratory animals*. 8th ed. Washington (DC): National Academies Press, 2011.

INVESTIGATIVE COMMITTEE. Investigative committee on the law for the humane treatment and management of animals. *In: Explanatory handbook on the law*. Tokyo: Seirin Shoin, 2001.

IP53. *Scars code of conduct for the use of animals for scientific purposes in Antarctica*. Antarctic Treaty Consultative Meeting, 24., *Anais [...]*. 2011.

KENYA. *Kenya prevention of cruelty to animals act of 1983, Chapter 360*. 1983. Disponível em: <http://www.kenyalaw.org:8181/exist/kenyalex/sublegview.xql?-subleg=CAP.360>. Acesso em: 2 set. 2020.

KIMWELE, C.; MATHEKA, D.; FERDOWSIAN, H. A. Kenyan perspective on the use of animals in science education and scientific research in Africa and prospects for improvement. *Pan African Medical Journal*, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2011.

KUROSAWA, T. M. Alternative Research (3Rs) in the World, Asia and Japan. *Alternatives to Animal Testing*, p. 33-36, 2018.

MÉXICO. Ley para la prevención de la crueldad a los animales del distrito federal. 2002. Disponível em: <http://www.aldf.gob.mx/archivo-1ab9f8a53e4add9904bbfcefdb0a0db9.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2020.

MÉXICO. *Ley de sanidad animal*. 2007. Disponível em: http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/ref/lfsa/LFSA_orig_25jul07_ima.pdf. Acesso em: 15 ago. 2020.

MÉXICO. *Ley general de salud en materia de investigación para la salud*. 2015. Disponível em: www.salud.gob.mx/cnts/pdfs/LEY_GENERAL_DE_SALUD.pdf. Acesso em: 15 ago. 2020.

NAM, M. H. *et al.* Ensuring reproducibility and ethics in animal experiments reporting in Korea using the ARRIVE guideline. *Laboratory Animal Research*, v. 34, 11-19, 2018.

NATIONAL ANIMAL WELFARE ADVISORY COMMITTEE. *Transport of animals within New Zealand by transportation*. 2011. Disponível em: <https://www.mpi.govt.nz/protection-and-response/animal-welfare/codes-of-welfare/>. Acesso em: 26 jun. 2020.

NATIONAL HEALTH AND MEDICAL RESEARCH COUNCIL. *Principles and guidelines for the care and use of non-human primates for scientific purposes*. 2016. Disponível em: <https://www.nhmrc.gov.au/guidelines-publications/ea15>

NATIONAL HEALTH AND MEDICAL RESEARCH COUNCIL (Australia). Animal Welfare Committee. *Guidelines for the generation, breeding, care and use of genetically modified and cloned animals for scientific purposes*. 2007.

NEW SOUTH WALES ANIMAL RESEARCH REVIEW PANEL. *Policies and guidelines*. 2020. Disponível em: https://www.animaletics.org.au/__data/assets/pdf_file/0017/1200707/animal-research-review-panel-2018-19-annual-report.pdf

NEW SOUTH WALES GOVERNMENT. *Animal research act 1985*. Act n. 123 of 1985. Disponível em: http://www.austlii.edu.au/au/legis/nsw/consol_act/ara1985134/. Acesso em: 15 ago. 2020.

NEW ZEALAND. *New Zealand biosecurity act*. 1993. Disponível em: <http://www.legislation.govt.nz/act/public/1993/0095/latest/DLM314623.html>

NEW ZEALAND. *New Zealand biosecurity authority, standard 154.03.03 containment facilities for vertebrate laboratory animals*. 2003. Disponível em: <https://www.epa.govt.nz/assets/Uploads/Documents/New-Organisms/Policies/3be-6da8deb/154-03-03-MAF-ERMA-Std-2002.pdf>

NEW ZEALAND GOVERNMENT. *Animal Welfare Act 1999*. Disponível em: <http://www.legislation.govt.nz/act/public/1999/0142/latest/versions.aspx>. Acesso em: 15 ago. 2020.

NEW ZEALAND GOVERNMENT. (2015). *Animal welfare amendment act n. 2*. 2015. Disponível em: <http://www.legislation.govt.nz/act/public/2015/0049/30.0/DLM5174807.html>.

NEW ZEALAND. *Hazardous substances and new organisms act*. 1996. Disponível em: <http://www.legislation.govt.nz/act/public/1996/0030/latest/DLM381222.html>

NATIONAL HEALTH AND MEDICAL RESEARCH COUNCIL (AUSTRALIA). *Australian code for the care and use of animals for scientific purposes*. 8th Edition, 2013. Disponível em: <https://www.nhmrc.gov.au/about-us/publications/australian-code-care-and-use-animals-scientific-purposes#> Acesso em: 19 jun. 2020.

NOONAN, D.; WILLIAMS, V. Laboratory animals regulations and recommendations: Australia and New Zealand. *Laboratory Animals*, 2nd ed., p. 375-419, 2019. Academic Press. DOI 10.1016/B978-0-12-849880-4.00012-X

NORTHERN TERRITORY GOVERNMENT. Animal welfare act. *Act n. 44 of 1999*. Disponível em: http://www.austlii.edu.au/au/legis/nt/consol_act/awa128/. Acesso em: 15 ago. 2020.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Guide for the care and use of laboratory animals. 1996. Acesso em: 15 ago. 2020

NYIKA, A. Animal research ethics in Africa: An overview. *Acta Tropica*, v. 112, p. 48-52, 2009.

OGDEN, B. E. *et al.* Laboratory animal laws, regulations, guidelines and standards in China Mainland, Japan, and Korea. *ILAR Journal*, v. 57, n. 3, p. 301-311, 2016. DOI 10.1093/ilar/ilw018.

OLSSON, I. A. S. *et al.* Protecting animals and enabling research in the European Union: An overview of development and implementation of directive 2010/63/EU. *ILAR Journal*, v. 57, n. 3, p. 347-357, 2016. DOI 10.1093/ilar/ilw029.

PEREIRA, S. *et al.* Animal experimentation and ethics in India: The CPCSEA makes a difference. *Alternatives to Laboratory Animals*, v. 32, n. 1, p. 411-415, 2004.

PERU. *Ley n. 27265/2000 de protección a los animales domésticos y a los animales silvestres mantenidos en cautiverio*. 2000. Disponível em: <https://sinia.minam.gob.pe/normas/ley-proteccion-animales-domesticos-animales-silvestres-mantenidos>. Acesso em: 15 ago. 2020.

PERU. *Instituto Nacional de Salud. Procedimiento para el uso de animales de laboratorio en el Instituto Nacional de Salud*. 2012. Disponível em: http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/2/jer/normatividad_01/MANUAL

PROCEDIMIENTOS CIEA.pdf. Acesso em: 15 ago. 2020.

PROTOCOL ON ENVIRONMENTAL PROTECTION TO THE ANTARCTIC TREATY. *International legal material*, v. 30, p. 1-455, 1991.

QUEENSLAND GOVERNMENT. *Animal care and protection act 2001*. Act n. 64 of 2001. 2001. Disponível em: <https://www.legislation.qld.gov.au/view/pdf/inforce/current/act-2001-064>. Acesso em: 15 ago. 2020.

RIVERA, E. *et al.* Laboratory animal legislation in Latin America. *ILAR J.*, v. 57, 293-300, 2016.

RIVERA, E. A. B. *et al.* *Laboratory animals: regulations and recommendations for global collaborative research*, San Diego: Elsevier, p. 95-115, 2014.

ROBINSON, N. B. *et al.* The current state of animal models in research: A review. *International Journal of Surgery*, v. 72, p. 9-13, 2019. DOI 10.1016/j.ijssu.2019.10.015.

SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN. NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. *Diario Oficial de la Federación*, 2002. Disponível em: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF>. Acesso em: 15 ago. 2020.

SECRETARIA DE SALUD. México. *Prevención y control de enfermedades*. NOM 042-SSA2-2006. Especificaciones sanitarias para los centros de atención canina. Norma Oficial Mexicana. 2006. Disponível em: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5067791&fecha=06/11/2008. Acesso em: 15 ago. 2020.

SOUTH AFRICA. *South African medical research council, Act 58 of 1991*. Disponível em: https://www.gov.za/sites/default/files/gcis_document/201409/a581991.pdf Acesso em: 30 ago. 2020.

SOUTH AFRICAN. *South African National Standard: The care and use of animals for scientific purposes (SANS 10386:2008)*. 2008. Disponível em: <https://www.sun.ac.za/english/research-innovation/Research-Development/Documents/Animal Ethics/ENGLISH/SANS10386.pdf>? Acesso em: 28 ago. 2020.

SOUTH AUSTRALIA DEPARTMENT OF ENVIRONMENT, W. and N. R. *Policies and guidelines for wildlife research*. 2020. Disponível em: https://www.environment.sa.gov.au/topics/plants-and-animals/animal-welfare/Animals_in_research_teaching/Animal_ethics_committees/policies-for-wildlife-research

SOUTH AUSTRALIAN GOVERNMENT. South Australian Government. *Animal welfare act 1985*. Act n. 106 of 1985. Disponível em: http://www.austlii.edu.au/au/legis/sa/consol_act/awa1985128/. Acesso em: 15 ago. 2020.

TASMANIAN GOVERNMENT. *Animal welfare act 1993*. Act n. 63 of 1993. Disponível em: http://www.austlii.edu.au/au/legis/tas/consol_act/awa1993128/. Acesso em: 15 ago. 2020.

URUGUAY. Ley n. 18.611. *Utilización de animales en actividades de experimentación, docencia e investigación científica*, 2009. Disponível em: <http://>

www.iibce.edu.uy/ETICA/ley-18611-oct-2-2009.pdf. Acesso em: 15 ago. 2020.

VASBINDER, M. A.; LOCKE, P. Introduction: Global laws, regulations, and standards for animals in research. *ILAR J.*, v. 57, n. 3, p. 261-265, 2016.

VENEZUELA. Asamblea Nacional de la República Bolivariana de Venezuela. *Ley para la Protección de la Fauna Doméstica Libre y en Cautiverio*. Gaceta Oficial n. 39.338 del 4 de enero de 2010. Disponível em: <http://virtual.urbe.edu/gacetas/39338.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2020.

VICTORIA AGRICULTURE. *Code of practice for the housing and care of laboratory mice, rats, guinea pigs and rabbits*. 2020.

VICTORIAN GOVERNMENT. *Prevention of cruelty to animals act 1986*. Act n. 46 of 1986.

WESTERN AUSTRALIAN GOVERNMENT. *Animal welfare act 2002*. Act n. 033 of 2002. Disponível em: https://www.slp.wa.gov.au/legislation/statutes.nsf/main_mrtitle_50_currencies.html. Acesso em: 15 ago. 2020.

CAPÍTULO 3 [<doi>10.51996/9788574853994.cap3</doi>](https://doi.org/10.51996/9788574853994.cap3)

TÓPICOS ESPECIAIS SOBRE CIÊNCIA EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO

*Wesley Lyeverton Correia Ribeiro*¹

*Klena Sarges Marruaz da Silva*²

*Augusto César Aragão Oliveira*³

*Hugo Leonardo Melo Dias*⁴

*Isaac Neto Goes da Silva*⁵

*Joel Majerowicz*⁶

Resumo: A evolução da ciência e os constantes questionamentos sobre o uso de animais em experimentação alteraram substancialmente as relações entre animais humanos e não humanos. Nessa seara, a Ciência em Animais de Laboratório se constitui em uma abordagem multidisciplinar que envolve o conhecimento sobre o modelo animal e suas necessidades etológicas específicas no âmbito da produção, reprodução, sanidade e experimentação animal. Esse campo do conhecimento se concentra em questões relacionadas à Bioética, à saúde e ao bem-estar animal, principal-

1 Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil. E-mail para correspondência: wesleylyeverton@gmail.com

2 Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

3 Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

4 Biotério Central, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brasil.

5 Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

6 Majerowicz Consultoria & Serviços em Biotérios, Brasil.

mente no que se refere ao reconhecimento e tratamento de dor, aplicação de protocolos anestésicos e de eutanásia. No âmbito experimental, pautando-se sobre as premissas de redução, refinamento e substituição de animais em pesquisa, essa Ciência se dedica, ainda, ao estudo de delineamentos experimentais e análise de dados. Neste sentido, objetiva-se, com este capítulo, apresentar novas abordagens sobre tópicos relacionados à Ciência em Animais de Laboratório.

Palavras-Chave: Bioética. Bem-estar Animal. Biomodelos. Biotério. Experimentação Animal.

SPECIAL TOPICS IN LABORATORY ANIMAL SCIENCE

Abstract: The evolution of science and constant questions about use of animals in experimentation have substantially changed relationships between human and non-human animals. In this sense, Laboratory Animal Science is a multidisciplinary approach that involves knowledge about animal models and their specific ethological needs within the scope of animal production, reproduction, and experimentation. This knowledge focuses on bioethics, health, and animal health issues, mainly referring to surveillance and pain treatment, applying anesthetic and euthanasia protocols. In the experimental context, based on the premises of reduction, refinement, and replacement of animals in research, this science is also dedicated to studying experimental designs and data analysis. Thus,

this chapter aims to present new approaches on topics related to science in laboratory animals.

Keywords: Bioethics. Animal Welfare. Biomodels. Vivarium. Animal Experimentation.

1 INTRODUÇÃO

A pesquisa com biomodelos animais existe há décadas, porém suas novas perspectivas pautam-se em critérios que envolvem ambiência, melhoramento genético, qualidade sanitária e, sobretudo a Bioética e o bem-estar animal. Neste âmbito, a finalidade da Ciência em Animais de Laboratório (CAL), área do conhecimento que aborda um universo de evidências científicas que faz uso de biomodelos animais, é minimizar os vieses em pesquisas pré-clínicas e, em paralelo e não menos importante, promover melhor qualidade de vida aos animais em experimentação.

Assim, este capítulo versa sobre tópicos atualmente relevantes no que diz respeito à CAL, com ênfase ao uso de camundongos (*Mus musculus*) e ratos (*Rattus norvegicus*) em experimentação e sua atual importância para a ciência, na medida em que seus desdobramentos impactam de modo substancial o desenvolvimento de novos produtos de interesse à saúde humana e animal.

2 ANIMAIS DE LABORATÓRIO: DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÕES

Os animais de laboratório sempre serviram às pesquisas na área da saúde, elucidando vias de transmissão de doenças infecciosas, parasitárias, mecanismos e tratamentos de doenças crônicas como o câncer, diabetes e a obesidade, além de vir colaborando decisivamente no desenvolvimento de novos imunobiológicos. Toda a importância dos biomodelos animais para a saúde humana e animal nos leva à reflexão sobre o que são animais de laboratório em uma perspectiva conceitual.

O conceito de animais de laboratório foi definido pelas Diretrizes Brasileiras para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA) publicadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea), em 2016, como aquele “animal não humano do filo Chordata, subfilo Vertebrata, usado em atividades de ensino ou de pesquisa científica” (p. 4).

Sob uma perspectiva mais ampla, é possível inferir que animais de laboratório são biomodelos com características sanitárias e genéticas definidas, adaptados ou produzidos, mantidos ou manipulados de forma experimental ou observacional em instalações destinadas ao ensino e à pesquisa científica.

Cabe-nos destacar que a escolha do biomodelo para determinada finalidade deve considerar suas características biológicas, comportamentais, constituição genética, estado nutricional e estado sanitário.

2.1 Tipos de Animais de Laboratório

As características dos animais de laboratório, ou sua classificação, variam de acordo com a situação sanitária e a genética.

Segundo Couto (2002, p. 59), animais de laboratório classificados como convencionais não possuem microbiota definida, por serem mantidos em ambientes desprovidos de barreiras “ou mesmo com barreiras atuantes, mas que não impeçam a interação do animal com microrganismos do meio”, porém observam-se outras correntes de pensamento que se referem ao termo “convencional”, para espécies mais comumente utilizadas, tais como camundongo, rato, cobaia, coelho ou hamster.

Os animais não convencionais não são usados tradicionalmente em pesquisas, por limitações da espécie, seja por dificuldades de manutenção, ou mesmo falta de conhecimento acerca de suas características biológicas, fisiológicas, anatômicas ou de aplicabilidade a determinados protocolos experimentais.

Considerando-se as tendências de substituição de animais em experimentos, algumas espécies não convencionais, como o *zebrafish* ou peixe-zebra (*Dario rerio*), tem ganhado cada vez mais espaço em relação aos roedores, em alguns protocolos pré-clínicos, principalmente nos que envolvem toxicidade, teratogenicidade e estudos comportamentais. No caso da utilização do *zebrafish*, um dos motivos para essa substituição se deve ao fato de que é capaz de produzir um maior número de exemplares em curto período, por

exemplo. Num período de até 72 horas após a fertilização, já se tem a disponibilidade dos estágios embrionário e, a seguir, larval (LOPES-FERREIRA, 2017). Dentre diversas outras características biológicas e genéticas que o torna um bom modelo biológico em investigações biomédicas, pode-se incluir a sua similaridade gênica com o ser humano, que é de 70%.

Outra espécie não convencional, porém, em franca utilização, é a suína. Tanto o suíno doméstico (*Sus scrofa domesticus*) quanto sua miniatura, o *mini pig*, têm sido utilizados em diferentes áreas da pesquisa biomédica e do ensino, devido a semelhanças com a biologia da espécie humana, particularmente em relação às características cutâneas, estruturais, articulares, de dentição, além de similaridades do trato gastrintestinal, pâncreas, fígado, rins, coração, vasos sanguíneos, pulmão, mecanismo imune e estado fisiológico do recém-nascido. Ademais, as facilidades de manuseio em plataformas experimentais formatadas para a criação da espécie em condições de confinamento viabilizam seu uso como modelos (BELON, 2017).

Atualmente, as principais espécies animais utilizadas como biomodelos em pesquisas biomédicas são: camundongo (*Mus musculus*), rato (*Rattus norvegicus*), coelho (*Oryctolagus cuniculus*), hamster sírio (*Mesocricetus auratus*), porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*), furão ou ferret (*Mustelaputorius furo*), gerbil (*Meriones unguiculatus*), suíno (*Sus scrofa domesticus*), zebrafish (*Danio rerio*) e macaco-rhesus (*Macaca mulata*) (ABREU *et al.*, 2020; BEBERT *et al.*, 2020; PABST, 2020; LANA, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2018).

2.2 Classificação de Animais de Laboratório Conforme o *Status* Sanitário

Considerada a especificidade das instalações animais, as barreiras sanitárias; os procedimentos operacionais; e objetivos institucionais para pesquisa, é possível ter animais com as seguintes classificações sanitárias, em relação aos microbiomas interno e externo: (1) Axênicos ou livres de germes; (2) Microbiota Definida (MD); (3) Livres de patógenos específicos ou SPF (do inglês, *Specific Patogen Free*); (4) Livres de patógenos oportunistas ou SOPF (do inglês, *Specific Opportunist Patogen Free*); e (5) Indefinidos ou não definidos (FERREIRA; HOCHMAN; BARBOSA, 2005).

Os animais classificados como axênicos são aqueles totalmente livres de microbiota, isto é, isentos de qualquer microrganismo interno ou externo, tais como bactérias, fungos, protozoários, algas, riquétsias ou vírus associados. Os animais com microbiota definida são originalmente axênicos, que foram intencionalmente contaminados com microrganismos ou parasitas específicos. Os animais assim classificados são continuamente monitorados para constatação da presença dos organismos selecionados e da ausência de outros.

Os animais incluídos como Livres de Germes Patogênicos Específicos (SPF) não apresentam microbiota capaz de lhes determinar doenças, ou seja, albergam somente microrganismos não patogênicos (COUTO, 2002). Os animais livres de patógenos oportunistas (SOPF) são aqueles que não possuem patógenos oportunistas, mas podem apresentar patógenos específicos.

tunistas (SOPF) são livres de agentes infecciosos e parasitas selecionados. Já os animais classificados como possuidores de microbiotas indefinidas são aqueles mantidos em ambientes desprovidos de barreiras sanitárias bem estabelecidas (COUTO, 2002).

Ressalta-se que, para o direcionamento e a manutenção das condições sanitárias de colônias, conforme essa classificação, necessita-se que haja um controle ambiental específico e o emprego de manejo técnico continuado dos animais para que se mantenha o *status* desejado.

Mesmo com o desenvolvimento de todas as técnicas que visam a um padrão sanitário satisfatório, em colônias de animais de laboratório, é patente a preocupação de muitos grupos de pesquisa com o fator microbioma e a sua implicação nos resultados de pesquisas. Entretanto, nas últimas décadas, percebe-se um direcionamento de atenção ao tema. Exemplificando essa necessidade, Alves *et al.* (2017), ao realizarem um levantamento de literatura utilizando os descritores “microbiota”, “microbioma” ou “microflora”, apresentaram uma evolução substancial no número de publicações, entre os anos de 1980 e 2015, desses temas na base de dados PubMed.

2.3 Classificação de Animais de Laboratório Conforme sua Genética

A variação genética nas colônias de roedores de laboratório tem implicações importantes para o *design*, o resultado e a re-

produtibilidade de experimentos biológicos (JUSTICE; DHILLON, 2016). Altos níveis de variação genética em biomodelos animais podem aumentar a variação na resposta a uma determinada intervenção experimental, entretanto, a utilização de colônia com este padrão pode ser mais adequada em pesquisas pré-clínicas, por representarem a variação genética normal de populações naturais.

Ademais, a utilização de modelos consanguíneos (animais clones, sem variabilidade genética) pode impossibilitar uma previsão com maior acurácia sobre o comportamento de uma droga em espécies com alta variabilidade genética, como a humana. No entanto, o uso de modelos consanguíneos, ao limitar o ruído causado pela variação genética entre os indivíduos, proporciona dados biológicos mais uniformes, maior reprodutibilidade dos resultados, além de requerer menor número de animais por ensaio.

Assim, do ponto de vista genético, pode-se classificar os animais de laboratório em dois grandes grupos, são eles: a) não consanguíneos ou *outbred*, ou seja, aqueles que apresentam em sua constituição genética um alto nível de heterozigose (99%); e b) consanguíneos, *inbred* ou isogênicos, ou animais que apresentam índice de homozigose de 99%, o que os tornam os mais idênticos possíveis entre si (populações obtidas após, pelo menos, 20 gerações de acasalamentos consecutivos entre irmãos).

Os camundongos cruzados ao acaso constituem lotes de animais não definidos geneticamente, que não podem ser chamados de linhagens (GODARD; MASSIRONI, 2017). As colônias de ca-

mundongos e ratos de laboratório cruzados sem direcionamento são mais prolíferas e, conseqüentemente, de mais fácil utilização, no que diz respeito a atender à demanda das pesquisas, enquanto as linhagens consanguíneas são exatamente o oposto.

Especificando um pouco mais os modelos genéticos, após a exposição desses dois grandes grupos de classificação, animais isogênicos podem ser incluídos em sublinhagens; híbridos F1; linhagens coisogênicas; e linhagens congênicas recombinantes.

As sublinhagens são resultantes de heterozigose residual, ou isogenia incompleta, como resultado de mutações espontâneas e fixação de alelos de interesse. Animais híbridos F1 são originados de duas linhagens isogênicas. Linhagens coisogênicas são oriundas de mutação que ocorre em linhagem isogênica e é fixada por cruzamentos, dando origem a uma nova linhagem, que difere do original em apenas um *locus*.

A linhagem congênica é obtida de duas linhagens; uma doadora, que carrega o gene mutado; e a consanguínea receptora. Num primeiro cruzamento entre ambas, são obtidos indivíduos N1 e, a partir de então, são nove gerações seguidas de cruzamentos entre esses animais, e, na décima geração (N10), os animais portadores do gene mutado podem ser cruzados entre si, estabelecendo-se assim uma nova linhagem congênica (GODARD; MASSIRONI, 2017).

Em todo caso, o modelo animal e seu *status* genético precisam ser bem conhecidos para que o protocolo experimental não tenha resultados equivocados e viés por fundo genético.

A seguir, listamos linhagens de camundongos (Quadro 1) comumente utilizadas em pesquisas biomédicas no Brasil; sua respectiva classificação genética; e principais aplicações em protocolos experimentais.

Quadro 1 – Linhagens de camundongos (*Mus musculus*) comumente utilizados em pesquisas biomédicas no Brasil, classificação genética e principais aplicações em protocolos experimentais

Linhagem	Característica	Classificação	Aplicação
Balb/c	Albino	<i>Inbred</i>	Produção de anticorpos monoclonais; desenvolvem alguns tipos de câncer com facilidade, como, por exemplo: neoplasias reticulares, tumores primários de pulmão e tumores renais
Balb/c ^{Nu+/Nu+}	Machos sem pelos	<i>Inbred</i>	Deficiência de linfócitos T, suscetibilidade a infecções, técnicas de transplantes e estudos de transplantes, desenvolvimento de fármacos antitumorais e estudo do lúpus eritematoso
C57BL/6	Preto	<i>Inbred</i>	Estudos cardiovasculares, de comportamento, obesidade e diabetes
C3H/HeJ	Agouti	<i>Inbred</i>	Câncer, imunologia e inflamação, biologia sensorial e cardiovascular
DBA/2NTac	Marrom diluído, não Agouti	<i>Inbred</i>	Usado em estudos de doenças infecciosas; estudos genéticos e teste anticonvulsivantes; suscetíveis a crises epiléticas audiogênicas induzidas

Linhagem	Característica	Classificação	Aplicação
Swiss Webster	Albino	<i>Outbred</i>	Extensivamente usado por décadas como um <i>stock</i> para todos os propósitos, para a pesquisa e teste de segurança para drogas; frequentemente usado como receptoras em laboratórios de transgênico, devido à sua habilidade materna superior

Fonte: Elaborado pelos autores.

Ademais, a seguir, listamos as linhagens de ratos (Quadro 2) mais utilizadas em pesquisas biomédicas no Brasil, sua respectiva classificação genética e principais aplicações em protocolos experimentais.

Quadro 2 – Linhagens de ratos (*Rattus norvegicus*) comumente utilizados em pesquisas biomédicas no Brasil, classificação genética e principais aplicações em protocolos experimentais

Linhagem	Cor	Classificação	Aplicação
¹ SHR	Albino	<i>Inbred</i>	Testes de drogas hipertensivas, doenças cardiovasculares e hipertensão. É também usada como modelo animal para estudos de esquizofrenia
Wistar Kyoto	Albino	<i>Inbred</i>	Controle para a linhagem de rato SHR
Sprague Dawley	Albino	<i>Outbred</i>	O excelente desempenho reprodutivo faz dessa linhagem um bom modelo para gerar fêmeas grávidas cronometradas

Linhagem	Cor	Classificação	Aplicação
Wistar Hannover	Albino	<i>Outbred</i>	Frequentemente utilizado como modelo de toxicologia e modelo de uso geral para pesquisa biomédica
Long Evans	Duas cores; conhecido como rato encapuzado	<i>Outbred</i>	Usado para estudos neurológicos, toxicológicos e oftalmológicos. Há relatos de maior resistência desta linhagem a problemas respiratórios em relação a ratos albinos, tornando-o um bom modelo para procedimentos cirúrgicos que requerem uso prolongado de anestésicos inalantes

¹SHR – *Spontaneously hypertensive rats* (ratos espontaneamente hipertensos).

Fonte: Elaborado pelos autores.

3 INFRAESTRUTURA DE INSTALAÇÕES ANIMAIS PARA ROEDORES

As instalações para animais de laboratório, sejam biotérios de criação, manutenção ou de experimentação, devem ser planejadas e construídas de forma a atender a certos quesitos básicos que proporcionem as condições necessárias à produção ou à experimentação animal.

O desenvolvimento de projetos e o planejamento de biotérios são processos criativos e precisam ser cuidadosamente avaliados, de acordo com a finalidade das atividades a serem desenvolvidas; portanto é necessário contar com um grupo multidisciplinar que se atenha ao planejamento arquitetônico; aos detalhes construtivos;

à especificação de equipamentos; aos procedimentos de operacionalização; e às práticas de biossegurança. Assim se inicia um projeto de biotério bem-sucedido.

O ideal é que as instalações para animais de laboratório sejam fisicamente separadas de outros laboratórios. Essas instalações devem ser construídas visando à facilidade de limpeza, desinfecção e manutenção técnica. Outro aspecto a considerar é o de manter espaço físico de reserva para futuras ampliações das instalações ou modernização de equipamentos. Nesse sentido, o projeto deverá facilitar a incorporação de maquinário, tanto no que se refere às áreas de animais, como de serviços.

Aqui faz-se menção à Lei 11.794/2008 (Lei Arouca), regulamentada pelo Decreto 6.899/2009, que delegou ao Concea a competência de “estabelecer e rever, periodicamente, normas técnicas para instalação e funcionamento de centros de criação, de biotérios e de laboratórios de experimentação animal, bem como sobre as condições de trabalho em tais instalações” (BRASIL, 2008). Dando cumprimento a essa questão, o Concea publicou, em 2013, a Resolução Normativa (RN) 15 que trata da “Estrutura Física e Ambiente de Roedores e Lagomorfos” (BRASIL, 2013).

A arquitetura de um biotério deve compreender uma estrutura mínima que se compõe de salas de animais entre dois corredores.

a) Salas de animais

Devem ser separadas por espécie, isto é, numa sala, deve ser criada, ou mantida, uma única espécie. No caso de biotério de

experimentação, uma sala para cada pesquisa. Quando isso não for possível, todos os esforços devem ser feitos a fim de minimizar o uso indevido de animais de pesquisa diferentes. Salas especiais devem ser preparadas para os estudos que envolvam o uso de radiações, agentes infecciosos e substâncias tóxicas.

b) Corredores

Devem ser largos o suficiente para facilitar a movimentação de pessoal e equipamentos. Segundo a NR 23 (BRASIL, 1978), de proteção contra incêndio, a largura mínima deverá ser de 1,2 m e sempre rigorosamente desobstruídos.

A essa estrutura básica, acrescentam-se áreas de apoio, em função das necessidades dos trabalhos a serem desenvolvidos. Em geral, uma instalação moderna, deve estar constituída por:

a) Box de higienização corporal

Deve estar localizado em via obrigatória de passagem de pessoal, na entrada dos biotérios de criação e em biotérios de experimentação, também na saída, caso o nível de biossegurança exija a higienização corporal. A paramentação apropriada e de uso exclusivo nas áreas de animais é recomendada em todas as situações.

b) Quarentena

Animais a serem introduzidos em uma instalação devem ser isolados até que seu estado de saúde possa ser determinado. Esse

ambiente deve ser localizado em área que não tenha fluxo de animais já alojados no biotério e que permita o recebimento de novos animais por acesso específico e independente para esse fim. Deve ser precedida de uma antecâmara, para procedimentos de acesso de pessoal e recebimento dos animais. A interligação da quarentena com a área controlada deve ser feita por caixa de passagem, com portas intertravadas.

c) Recepção animal

Em biotérios de experimentação, onde os animais são utilizados em poucos dias após sua chegada e não há tempo disponível para avaliar seu padrão sanitário, é, então, de fundamental importância que os animais sejam obtidos de criação certificada quanto ao padrão sanitário. O ambiente para a recepção animal deve possuir pelo menos dois recintos interligados por caixa de passagem ou antecâmara; no primeiro ambiente, o processo de desinfecção ou troca de gaiolas é realizado, seguindo a transferência dos animais para a recepção animal, propriamente dita.

d) Sala de procedimento

As salas de procedimentos devem estar localizadas estrategicamente, em relação às salas de animais. É muito importante enfatizar a flexibilidade desse ambiente, uma vez que seu uso poderá ser modificado em função das demandas de novos projetos de pes-

quisa. A sua localização não deve estar no fluxo de materiais zootécnicos, de insumos, ou resíduos provenientes da sala de animais. Assim, não deve estar em uma das extremidades do ambiente.

e) Depósitos

Devem ser planejados depósitos separados para a guarda específica de insumos, materiais zootécnicos ou, ainda, para equipamentos. A capacidade de armazenamento deve contemplar quantidade suficiente de materiais e insumos para atender à demanda rotineira do biotério, por período prolongado, prevendo possível inoperância do equipamento de desinfecção ou esterilização.

Especial atenção deve ser dada às condições de temperatura e ventilação do depósito de rações, visando à manutenção das características organolépticas desses alimentos. Qualquer material, ou insumo, não deve ser acondicionado diretamente no piso.

f) Área de higienização

Nesse local, a ventilação deve ser suficiente para evitar odores, excesso de calor e vapor, que podem afetar a saúde das pessoas e comprometer as condições ambientais das áreas vizinhas. Os tanques devem ser largos e com profundidade adequada, visando a facilitar a higienização de materiais. As autoclaves e outros equipamentos destinados à higienização e desinfecção de materiais devem ser instalados nessa área, de maneira a facilitar a operação e transferência de insumos e materiais, de forma segura, para as áreas controladas.

g) Área de descontaminação

Adotada em biotérios de experimentação, deve estar localizada em ambiente interno e segregado no final do corredor de saída, e contígua à área de higienização. Uma autoclave de barreira é recomendada, em biotério com atividades com risco biológico, a partir do nível de biossegurança 2 (NB 2).

h) Depósito de rejeitos

Na impossibilidade de um rápido tratamento, carcaças, tecidos, excrementos, e outros rejeitos, devem ser acondicionados apropriadamente e armazenados em uma área própria, refrigerada, protegida contra vetores, fácil de higienizar e desinfetar. Esse depósito deve ser separado fisicamente de outras áreas.

4 CRIAÇÃO E BEM-ESTAR ANIMAL

Sob diversos aspectos, é inegável o avanço científico alcançado na Ciência em Animais de Laboratório, sob os pontos de vista estruturais (ambiência); melhoramento genético; qualidade sanitária ao longo dos últimos anos; culminando com o desenvolvimento de medicamentos, imunobiológicos, técnicas cirúrgicas, anestésicas, transplantes, dentre outros; e contribuindo decisivamente para o aumento da expectativa de vida humana e animal.

No entanto, esses benefícios não se constituem como mera justificativa para o uso indiscriminado de animais. Assim, com o

avanço do conhecimento sobre a capacidade sensitiva dos animais, bem como a promoção de debates em torno da proteção animal e da aplicação da ética em protocolos de pesquisa envolvendo animais de laboratório, muitos esforços têm sido empreendidos na tentativa de reduzir, refinar e substituir o uso de animais em pesquisa por métodos alternativos, como modelos *in vitro*, *in silico* ou matemáticos, por exemplo (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2011).

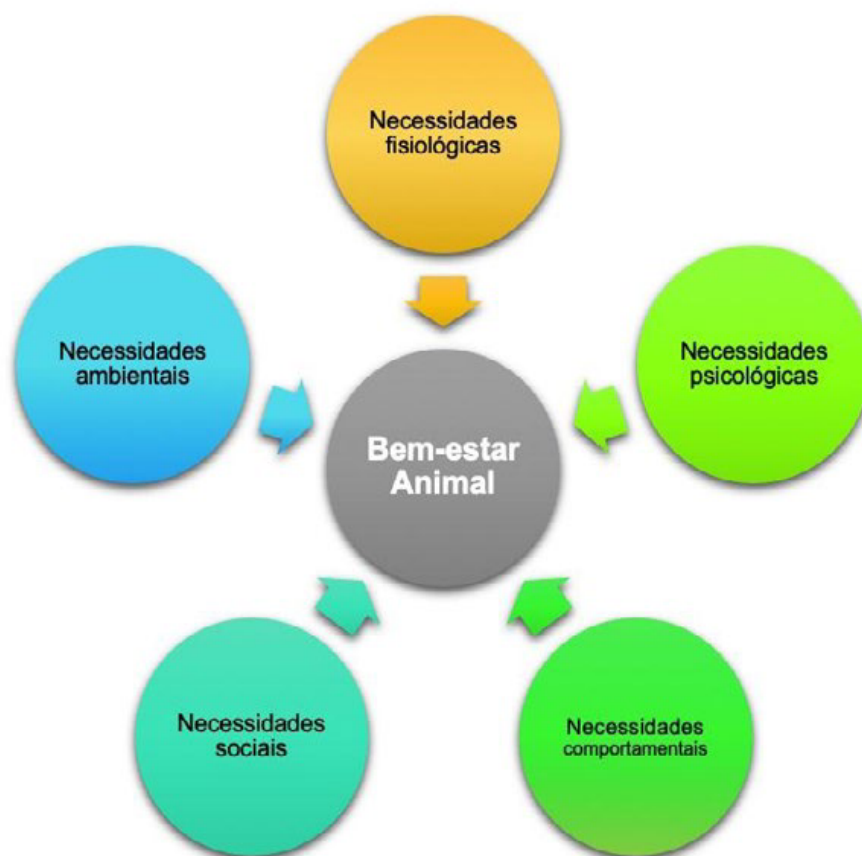
Aliadas à questão ética, as melhorias no bem-estar animal influenciam diretamente na qualidade dos resultados obtidos nas pesquisas científicas (BALCOMBE, 2010; NC3Rs, 2020). Entretanto, o bem-estar animal não diz respeito apenas ao controle de sofrimento, dor e distresse acarretados pela experimentação *per se*, mas está diretamente relacionado às condições de alojamento e à rotina das instalações de criação animal.

Isso porque animais de laboratório tendem a adaptar-se às mudanças em seu ambiente externo (luminosidade; nutrição; disponibilidade de água; umidade relativa do ar; cama; trocas de ar; temperatura; agrupamento ou isolamento social; nível de ruídos; dentre outros) e a variações internas (infecções; medo; dor; genética; sexo; idade etc.), circunstâncias que ocasionam alterações em seu metabolismo, em resposta a essas mudanças, o que pode comprometer seriamente a confiabilidade e reprodutibilidade dos dados (MELLOR *et al.*, 2009; NC3Rs, 2020).

É fato que não há um consenso claro entre diferentes estudiosos sobre o conceito de bem-estar animal, no entanto, referimo-nos

aqui ao modo como os animais se relacionam com o ambiente a que estão submetidos, o qual deve suprir suas necessidades fisiológicas, físicas, psicológicas, comportamentais, sociais e ambientais, conforme ilustrado na Figura 1. O bem-estar animal também está intimamente ligado à qualidade de vida e à capacidade de o indivíduo expressar seu comportamento normal (FRASER, 2008).

Figura 1 – Esquema representativo do bem-estar animal como resultado da satisfação das suas necessidades nas esferas fisiológica, psicológica, comportamental, social, ambiental e física



Fonte: Elaborada pelos autores.

Na esfera das necessidades fisiológicas, estão a fome, a sede, o sono, os níveis hormonais, a nutrição e a saúde como um todo. Dependendo da idade, da raça, do sexo, essas necessidades podem variar. Alterações em quaisquer dessas necessidades podem gerar efeitos altamente impactantes no bem-estar animal.

Na esfera psíquica, podem ser citadas as sensações, emoções, cognições, como o sofrimento, a dor, o medo; a angústia, a irritação, a agressividade, o tédio etc. Quaisquer dessas variantes podem acarretar importantes mudanças hormonais e de neurotransmissores e afetar substancialmente a saúde mental dos animais. Tais fatos podem ocorrer em diversas situações, estimuladas pelo que veem, escutam, sentem, lembram e, principalmente, farejam, uma vez que o olfato é o sentido mais desenvolvido em roedores.

No âmbito comportamental, é possível elencar uma série de comportamentos, como o ato de explorar, esconder-se, escalar, escavar, formar ninhos, dentre outros. O enriquecimento ambiental configura-se aqui como excelente alternativa para promover tais comportamentos, por isso é fortemente requerido (BRASIL, 2016).

Na esfera social, não obstante sua característica territorialista, esses animais são seres sociais e tendem a formar grupos, estabelecer dominância, e sofrem quando são mantidos em isolamento ou em aglomeração excessiva. Ressalta-se, aqui, por exemplo, que o melhor momento para a formação de grupos é após o desmame e que quaisquer alterações nesse estabelecimento social (inclusão ou exclusão de um animal do grupo), pode causar estresse, agressão e até a morte por lutas e canibalismos (BRASIL, 2016).

Considerando o aspecto ambiental, diversos fatores influenciam no bem-estar animal, como luminosidade (intensidade e duração do ciclo claro/escuro); ruídos externos; odores; disponibilidade e frequência de troca de água, ração, maravalha (utilizada como cama); temperatura e umidade relativa do ar. Os animais apresentam sensibilidade auditiva particular, que varia de acordo com a espécie, e são capazes de emitir e captar sons em faixas de frequência que podem ser inaudíveis aos humanos, mas interferir em diversos processos, como acasalamento; cuidado parental; disputas territoriais; ou até mesmo na saúde auditiva dos animais, a depender da intensidade e duração. O tipo de gaiola e seu material podem ser de fundamental importância para a redução dos ruídos prejudiciais, ao proporcionar melhor isolamento acústico, especialmente nas gaiolas fechadas, como é o caso dos microisoladores.

Uma vez que apresentam hábito noturno, esses animais possuem certa sensibilidade à intensidade luminosa, e podem exibir maior susceptibilidade a danos oculares do que os seres humanos, especialmente os animais albinos. Exposições prolongadas à luz intensa podem culminar em lesões, tais como atrofia de retina e cataratas, mesmo em ambientes com luminosidade confortável ao olho humano. Em relação à intensidade de luz, o tipo de material e a opacidade da gaiola também podem funcionar como filtros. Tanto o isolamento acústico de sons externos quanto a atenuação da intensidade luminosa podem ser obtidos pelo uso de alguns tipos de estantes ventiladas ou microisoladores.

Outro relevante fator refere-se às dimensões da gaiola, que precisam ter espaço suficiente para permitir que: a) os animais eliminem suas excreções (algumas espécies reservam locais distintos da gaiola para isso); b) mantenham-se em posição bípede quando necessário (acasalamento, lutas, exploração do ambiente etc.); e c) haja o favorecimento da manutenção de temperatura ambiental e de trocas de ar, evitando acúmulo de amônia e umidade excessiva. Sem o devido espaço para tais necessidades, o ambiente torna-se insalubre, comprometendo a saúde e o bem-estar dos animais (McMILLAN, 2005; SANTOS, 2002).

Em relação à temperatura, cada espécie possui uma faixa ótima, cuja constância precisa ser monitorada e garantida para evitar desconforto térmico e favorecer o bem-estar animal. Igualmente, a umidade relativa do ar precisa de monitoração frequente, uma vez que sua elevação pode dificultar a volatilização de amônia e favorecer doenças respiratórias, enquanto sua redução pode causar desidratação de mucosas e pele, propiciando o surgimento de lesões cutâneas, bem como problemas respiratórios.

Diversos fatores, como manuseio inadequado; mudança de tratador; troca frequente ou muito tardias de gaiolas; restrições ou privações alimentares ou hídricas; transporte desacompanhado; sons e iluminação de alta intensidade; acúmulo de amônia e umidade no ambiente; espaço insuficiente; dentre outras causas possíveis; podem ocasionar diversas condições de estresse e sofrimento aos animais.

Os seguintes comportamentos sinalizam estresse: canibalismo de filhotes; baixa produtividade de acasalamentos; *barbearing* (barbeamento); ausência de *grooming* (comportamento de limpeza); cromodacriorreia (secreção avermelhada de porfirina na região dos olhos e nariz); emagrecimento; vocalização; isolamento; postura encurvada; piloereção; dentre outros sinais (RIVERA, 2002). Quaisquer desses sinais podem ser fortes indicativos de estresse, dor e sofrimento, requerendo intervenção imediata para reverter a situação.

O bem-estar animal pode ser aprimorado por meio de enriquecimento ambiental, o qual pode funcionar como um método para melhorar as condições do ambiente das gaiolas, mas que, em muitos casos, não permite a satisfação total das necessidades ambientais e comportamentais dos animais. O enriquecimento ambiental deve favorecer o suprimento de necessidades, como alimentação, descanso, nidificação, esconderijo, abrigo da luz, escadas, roeduras, escavações etc.

Para isso, o ambiente da gaiola é enriquecido pela adição de dispositivos que buscam mimetizar o hábitat ou, pelo menos, atributos naturais. Como consequência, espera-se alcançar a melhoria na qualidade de vida e no bem-estar, uma vez que favorece a expressão do comportamento natural do animal, e permite, assim, a produção de espécimes com melhor padrão de qualidade.

Existem diferentes tipos de enriquecimento ambiental (físico, sensorial e social) e diversos tipos de artefatos, desde adaptáveis,

aos comercializados, que variam quanto à função. Pode-se citar o uso de iglus; túneis; materiais para nidificação; caixas; plataformas; redes suspensas etc.

Outro tipo de enriquecimento é o sensorial, exemplificado pelo fornecimento de madeira oca para ratos, cuja mastigação alivia o estresse e favorece seu bem-estar. Há ainda o enriquecimento social, que favorece a interação entre os animais e até mesmo com os técnicos e pesquisadores. É fato que, com o tempo de manuseio, a presença do tratador e o contato com os animais podem contribuir para o bem-estar deles, que se acostumam com sua presença, sua forma de tateá-los e com os cheiros característicos. Por outro lado, como comentado, devido ao fato de o olfato ser um dos sentidos mais desenvolvidos nos roedores (SCHOENFELD, CLELAND, 2004), uma mudança de tratador pode ser fonte de estresse para os animais, bem como o uso de perfumes ou outras substâncias voláteis.

Em todo caso, a finalidade do enriquecimento ambiental é permitir que o animal altere e controle o ambiente, de acordo com suas necessidades. Por exemplo, uma gaiola enriquecida com material de nidificação, permite que os animais adaptem seu ninho, de forma que seja possível controlar a temperatura, a quantidade de luz e servir como abrigo e proteção de animais agressivos etc.

O enriquecimento ambiental minimiza alterações fisiológicas e comportamentais, que poderiam comprometer a reprodutibilidade dos dados (SMITH; LILLEY, 2019). Recentemente, uma pesquisa

mostrou que a simples adição de um dispositivo de enriquecimento físico (iglu) foi capaz de diminuir significativamente o crescimento de células tumorais transplantadas pela ativação das células NK do sistema imunológico em camundongos fêmeas da linhagem B6C3F1 (TAKAI *et al.*, 2019).

Ainda assim, para que seja viável o emprego de enriquecimento ambiental, deve-se atentar para algumas questões, como: viabilidade econômica; resistência à esterilização; toxicidade dos materiais; facilidade de limpeza; exequibilidade do plano de trabalho (em relação aos funcionários e pesquisadores); avaliação de impacto nas pesquisas; padronização exata em experimentos científicos; dentre outras.

Portanto, é imperativo conhecer as necessidades e os comportamentos naturais dos animais em um biotério, ou de determinada espécie a ser utilizada em uma pesquisa, para ser possível avaliar corretamente falhas no bem-estar animal, reconhecendo sinais de sofrimento, dor e distresse. Essa avaliação, segundo o *National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research* (NC3Rs), pode ser realizada a nível coletivo ou individual destacando-se os seguintes indicadores:

- a. Aparência: postura do corpo anormal; pelagem sem brilho; ferimentos ou rachaduras na pele; secreções de porfirina na região ocular ou nasal etc.;
- b. Função corporal: inapetência, emagrecimento; variações de temperatura; dentre outros;

- c. Ambiente: marcas de sangue na gaiola ou na maravalha; alterações na consistência das fezes; ou outros;
- d. Comportamento: isolamento social; agressividade; estereotípias; apatia etc.;
- e. Indicadores de experimentos específicos: crescimento tumoral em estudos de câncer;
- f. Observações adicionais: quaisquer outros eventos não previstos.

É possível, ainda, avaliar o bem-estar, pela inspeção e por exames complementares, na tentativa de identificar infecções, dor, ou qualquer outro fator de sofrimento que possa interferir no conforto do animal. A avaliação de dor continua sendo um desafio, porque, além da óbvia incapacidade de verbalização dos animais, pode haver dificuldades por parte dos técnicos ou pesquisadores na percepção da expressão de dor no comportamento do animal e, por isso, é extremamente importante e indispensável a capacitação de profissionais que lidam direta e indiretamente com esses biomodelos. Nessa situação, a existência, ou não, de dor, deve ser rotineiramente estimada por instrumentos de mensuração que avaliem sua presença e amplitude de forma simples e rápida.

A Escala de Grimace é um instrumento útil na avaliação da dor. Essa escala foi primeiramente utilizada para aferir a dor por meio de expressões faciais em humanos desprovidos da capacidade de comunicação verbal (WILLIAMS, 2002). Posteriormente, a

Escala de Grimace foi adaptada a roedores e avalia a dor atribuindo escores (0 - ausente, 1 - moderada e 2 - evidente) aos seguintes parâmetros: posicionamento e rotação auricular; grau de abertura das pálpebras; contração dos músculos da região nasal; contração das bochechas; e posicionamento das vibrissas.

Após a soma dos valores atribuídos a cada parâmetro, calcula-se uma média aritmética simples e, desse modo, avalia-se a condição de dor do animal (LANGFORD *et al.*, 2010; SOTOCINAL *et al.*, 2011). Uma vez identificada e aferida a dor, é necessário saná-la, obrigatória e imediatamente, uma vez que essa condição tem alto impacto sobre o bem-estar animal.

Vale salientar que as boas práticas de bem-estar animal preconizam não apenas a remediação, mas a prevenção de dor, doença, distresse, medo, maus-tratos e quaisquer outras condições que possam prejudicar cada uma das necessidades básicas dos animais. A identificação desses fatores é essencial para a decisão precoce de desfechos humanitários (ponto final humanitário), quando necessário (NC3Rs, 2020).

Para isso, é fundamental que técnicos e pesquisadores que manejam diretamente animais de laboratório, sejam bem treinados, habilidosos, sensíveis e empáticos e que, de preferência, possuam experiência com a espécie animal e os procedimentos realizados, a fim de minimizar ao máximo o comprometimento do bem-estar dos biomodelos.

5 CUIDADO COM ANIMAIS: MANEJO, DIETA E CONTROLE DE QUALIDADE

5.1 Manejo de Animais de Laboratório

O manuseio rotineiro de animais de laboratório deve ser realizado por pessoas treinadas e capacitadas no manejo adequado para cada espécie. Entregar animais de laboratório aos cuidados de manejadores que não conhecem sua biologia e suas necessidades pode trazer sérias implicações à sua criação e vieses aos experimentos que os utilizam.

Conhecimentos básicos sobre alojamentos; parâmetros ambientais ideais; insumos básicos utilizados na criação; técnicas de troca de gaiolas e contenção dos animais são conhecimentos essenciais para manejar animais de laboratório.

Na contenção de animais, é importante que ocorra um período de adaptação do técnico que realizará o manejo, a fim de assegurar o bem-estar do animal e a segurança do operador (ANDERSEN *et al.*, 2014). A contenção de animais de laboratório é adaptada para cada espécie. No caso de camundongos e ratos, em geral, utiliza-se a contenção pela base da cauda, para retirar os animais da gaiola e, depois estes podem ser contidos por sujeição por pinçamento da pele dorsal, no caso de camundongos; e a mesma técnica com contenção conjunta dos membros posteriores, para ratos, em caso de administração de fármacos ou coleta de material biológico (ANDERSEN *et al.*, 2014).

Embora essas sejam as técnicas mais utilizadas, há uma mudança de comportamento quanto à contenção desses animais e o uso cada vez mais frequente de técnicas que diminuam a ansiedade do animal e comportamentos aversivos. O uso de tubos de policloreto de vinila (PVC) transparentes e mãos em concha, para retirá-los da gaiola são dois métodos que proporcionam estes objetivos. Outro método que vem sendo recomendado para manuseio de ratos é a inclusão do hábito de fazer cócegas e carinhos (*rattickling*) nesses animais, como forma de melhorar o bem-estar e a interação com humanos (CLOUTIER *et al.*, 2018).

Embora com todos os cuidados de contenção tomados, deve-se lembrar que fêmeas com filhotes, especialmente neonatos, requerem um manuseio mais cuidadoso e rápido, evitando, sempre que possível, o contato direto com os filhotes, a fim de evitar o canibalismo ou o abandono pelas mães (FELASA, 2020).

As gaiolas para animais de laboratório são fabricadas em materiais diversos, mas resistentes às sucessivas lavagens e à amônia, produto da ação de bactérias urease positivas sobre a ureia dos dejetos. A periodicidade de troca de gaiolas de camundongos e ratos depende de fatores como o grau de absorção do material de cama e densidade populacional, principalmente. Conforme mencionado, a regra é não deixar acumular fezes e urina em quantidades que possam prejudicar a saúde e o bem-estar animal. Sempre, ao trocar as gaiolas por outras limpas, a água e ração devem ser renovadas e ofertadas *ad libitum*, de acordo com o que será discutido no tópico 4.2.

Destaca-se que, além do cuidado com as gaiolas, a sala de criação, ou experimentação dos animais, deve manter parâmetros ambientais estáveis e controlados, para cada espécie. Segundo a RN 15 do Concea (BRASIL, 2013), ambientes com pequenos roedores e lagomorfos devem ser mantidos com temperatura média entre 20°-26°C, para camundongos, ratos, hamsters e cobaias, e 16°-22°C para coelhos. A temperatura deve estar numa faixa de variabilidade máxima de 4°C.

Outros parâmetros importantes são a umidade relativa média, que deve estar entre 40% a 60%; a iluminação da sala, que deve ser mantida com intensidade ao redor de 325 lux, distante 1m do piso; e a renovação de ar dos ambientes deve ser realizada em regime de 15 a 20 vezes o volume do ambiente por hora.

5.2 Dieta

Uma dieta nutricionalmente equilibrada é importante, tanto para a saúde e o bem-estar de animais de laboratório quanto para garantir que os resultados experimentais não sejam influenciados por fatores nutricionais não intencionais.

Para conhecer as necessidades nutricionais de roedores e lagomorfos utilizados em pesquisas, sugere-se consultar as publicações da *National Academy of Sciences* sobre as necessidades nutricionais de animais de laboratório. As publicações descrevem quais são os requerimentos nutricionais desses animais segundo as necessidades específicas de cada fase da vida (crescimento, reprodução,

longevidade), bem como as necessidades das principais linhagens utilizadas (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1977; 1995).

Não menos importante é o conhecimento sobre comportamentos alimentares específicos, como ocorre com o coelho doméstico, cujo hábito alimentar natural é herbívoro, mas que possui o hábito natural de coprofagia, ou seja, o consumo das próprias fezes ainda amolecidas diretamente do ânus à medida em que é excretada. A fermentação no intestino grosso e a prática da coprofagia fornecem as quantidades necessárias da maioria das vitaminas B e algumas proteínas bacterianas, além de permitirem a digestão de alguns nutrientes por múltiplas passagens pelo trato digestivo (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1995).

A dieta de animais de laboratório, especialmente roedores e lagomorfos, é baseada na oferta *ad libitum* de rações industriais desenvolvidas segundo as exigências nutricionais de cada espécie. Assim, grande parte das rações industrializadas para animais de laboratório disponíveis no mercado consistem quase que inteiramente de ingredientes de origem vegetal e possuem apresentação em formatos de *pellets*, ou em forma extrusada, o que facilita o desgaste necessário dos dentes incisivos dos roedores e lagomorfos (ANDERSEN *et al.*, 2014).

Um fator importante que deve ser considerado na dieta de animais de laboratório são os requisitos de energia necessários para a manutenção dos espécimes nas variadas funções produtivas (crescimento, lactação, gestação) (NATIONAL RESEARCH

COUNCIL, 1995). Outro fator importante a ser considerado é que a dieta é uma fonte potencial de variação em muitos tipos de estudos; portanto, uma descrição detalhada da dieta e do método de alimentação (*ad libitum*; porções em horários estipulados; jejum prolongado etc.) deve ser incluída na metodologia em todos os estudos. Informações sobre procedimentos de manuseio e preparação de alimentos (esterilização por autoclave ou irradiação) também são úteis (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2011).

5.3 Controle de Qualidade

O controle da qualidade sanitária das colônias é uma das questões-chave para a boa prática da CAL. A manutenção dos animais requer um trabalho rígido de manejo, higienização, desinfecção e controle dos insumos e da saúde deles.

O fornecimento de biomodelos animais com qualidade é de extrema importância para o alcance de resultados confiáveis nas pesquisas biomédicas e testes pré-clínicos. Conforme discutido, biomodelos que possuem patógenos específicos alheios à sua espécie podem criar vieses nos resultados dos experimentos em que são utilizados e prejudicar a sua reprodutibilidade (MINAGAWA, 2007). Assim, é necessário que os monitoramentos sanitário e genético, em animais de instalações para criação, sejam periódicos, objetivando garantir a fidedignidade dos resultados experimentais.

O monitoramento sanitário de rotina tem como propósito pesquisar agentes infecciosos, conforme recomendações da *Federa-*

tion of European Laboratory Animal Science Association (MÄHLER, 2014). Esses requerimentos asseguram que os animais utilizados em pesquisas estejam livres de microrganismos indesejados para cada espécie e que o fundo genético da linhagem permaneça inalterado, para que os animais expressem as características originais dessa linhagem.

No monitoramento sanitário, é necessário que a instituição mantenedora de animais de laboratório, em regime de criação, tenha à disposição um laboratório de análises clínicas que viabilize estudos microbiológicos, patológicos e de investigação em parasitologia animal. Para realizar o monitoramento genético, deve haver um laboratório de apoio à investigação da qualidade genética habilitada a realizar testes de microssatélites e genotipagem por marcadores do tipo SNP (do inglês *Single Nucleotide Polimorphism*).

A genotipagem por SNP é uma alternativa relativamente barata e amplamente difundida e, atualmente, utilizada na maioria das instituições, pois permite estudos de associação e mapeamento genético, assim como detecção de doenças genéticas ou polimorfismos associados a outras características genotípicas (CAETANO, 2009; FELASA, 2020).

6 EUTANÁSIA DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Um ponto crítico, quando se trata do uso ético de animais de laboratório, é a escolha do método de eutanásia adequado, para não causar desconforto físico nem emocional para o animal ou

para a pessoa que o executa. Há inúmeras legislações nacionais que regulamentam essa prática, entretanto, por hora, cabe-nos aqui fazer uma discussão tomando por base conceitos universais.

Rapidez e ausência de dor ou angústia são princípios básicos que guiam a escolha de um bom método de eutanásia. Há vários procedimentos descritos para realizar a eutanásia em animais de laboratório. Determinados procedimentos não são mundialmente aceitos, mas há uma tendência em respeitar os referidos princípios básicos.

No Brasil, o médico veterinário é o profissional responsável por escolher os métodos aplicáveis, segundo a legislação vigente no país, além de treinar e supervisionar a equipe envolvida na realização da eutanásia (BRASIL, 2012). Quem determina quais são as práticas legais de eutanásia em animais de laboratório de criação e experimentação no Brasil é o Concea, órgão colegiado subordinado ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI). Em 2018, o Concea publicou a RN 37, que traz a Diretriz da Prática de Eutanásia e publica os métodos aceitáveis e métodos de uso restrito para cada grupo taxonômico animal (BRASIL, 2018a).

Além desta RN, o Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), preocupado com as boas práticas de eutanásia, publicou anteriormente, em 2012, a Resolução 1.000, que “dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências” (CFMV, 2012). Essa resolução foi consultada para a elaboração da RN 37 do Concea, assim como serviu de base para diretrizes publicadas em outros países.

Em resumo, para pequenos roedores, que são as espécies mais utilizadas em experimentação, é indicado utilizar agentes anestésicos gerais barbitúricos (por via intravenosa ou intraperitoneal), ou anestésicos gerais administrados por via injetável, ou por inalação, ou, ainda, sobre dosagem de anestésicos dissociativos associados. Dentre esses, os anestésicos inalatórios trazem vantagens quanto à pouca manipulação do animal, facilidade de administração e inconsciência rápida (BRASIL, 2018a).

A exceção se dá para neonatos e fetos, que demonstram ser resistentes à hipóxia, devido a mecanismos remanescentes da vida intrauterina; portanto, recomenda-se a decapitação e, com restrição, o congelamento rápido, quando o neonato não ultrapassar 0,2 g.

Ainda sobre eutanásia para pequenos roedores, a câmara de CO₂, o deslocamento cervical, e o uso de micro-ondas específico, são considerados métodos aceitos com restrição, quando é justificável cientificamente a não utilização de anestésicos, pois, em alguns casos, podem comprometer os resultados de estudos. Em todo caso, é importante ter perfeita compreensão sobre a forma como o método de eutanásia escolhido pode interferir na leitura dos resultados da pesquisa.

Por exemplo, métodos que levam à hipóxia, como o uso de CO₂, podem causar acidose, e o uso da via intraperitoneal para administração de anestésicos pode lesionar algum órgão do sistema gastrointestinal que será utilizado no estudo (PARLAMENTO E CONSELHO EUROPEU, 2010). O atordoamento, seguido de exsanguinação, é um método aceito apenas em pesquisa de campo, quando

aplicado a roedores silvestres. Salienta-se que o uso de qualquer outro método não citado na diretriz é considerado inaceitável.

Para coelhos, os métodos aceitáveis de eutanásia também incluem o uso de anestésicos gerais, barbitúricos e inalatórios, e acrescenta-se a permissão de realizar exsanguinação por punção cardíaca, desde que após aplicada a anestesia geral. São ainda aceitos, de modo restrito, métodos físicos para animais silvestres em pesquisa de campo, como o atordoamento por eletronarcose e o uso de pistola de insensibilização, ou dardo cativo, ambos seguidos de outro método que assegure a morte.

O deslocamento cervical e a decapitação com equipamento apropriado (guilhotina) são aceitos para filhotes e coelhos que pesem menos de 1.000g, porém, esse procedimento deve ser precedido de anestesia (BRASIL, 2013). Essa é uma recomendação controversa, pois, havendo a necessidade de anestésicos, é mais razoável a escolha de método que utilize sobredose de anestésicos.

A RN 37 do Concea apresenta também diretrizes para eutanásias de outros animais menos utilizados em experimentação, do que roedores e lagomorfos, como é o caso de primatas não humanos; peixes; artiodáctilos; répteis; mamíferos marinhos; mamíferos carnívoros (cães, felídeos e mustelídeos); equídeos; anfíbios; e aves. A consulta ao documento é obrigatória, quando se submete um projeto à Comissão de Ética em Uso de Animais em Experimentação (Ceua) utilizando qualquer uma das espécies de cordados enquadradas na legislação (BRASIL, 2018a).

7 DESCARTE DE MATERIAL BIOLÓGICO

O descarte de material biológico proveniente de instalações animais é tema relevante para a biossegurança de todos os envolvidos na cadeia de criação e experimentação de laboratório e para questões de preservação do meio ambiente.

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 222, de 28 de março de 2018, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (BRASIL, 2018b), que regulamenta as Boas Práticas de Gerenciamento dos Resíduos de Serviços de Saúde, abrange atividades relacionadas com a atenção à saúde humana, ou animal; entre esses serviços, incluem-se os estabelecimentos de ensino e pesquisa na área de Saúde.

As instituições abrangidas pela citada RDC devem dispor de um Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde (PGR-SS) que contemple a segregação; o acondicionamento e a identificação; a coleta e o transporte internos; armazenamentos interno, temporário e externo; coleta e transporte externos e destinação.

No tocante ao descarte de materiais biológicos, de interesse neste capítulo, constam os classificados nos Grupos A e D. Os do Grupo A são os resíduos com possíveis agentes biológicos que, por suas características, podem apresentar risco de infecção; e os do Grupo D são resíduos que não apresentam risco biológico, químico ou radiológico à saúde ou ao meio ambiente, podendo ser equiparados aos resíduos domiciliares.

7.1 Grupo A

O grupo A é subdividido em subgrupos de A1 a A5, como segue.

a) Subgrupo A1

Abrange resíduos resultantes da atividade de ensino e pesquisa, ou atenção à saúde de indivíduos ou animais, com suspeita ou certeza de contaminação biológica por agentes da classe de risco 4; microrganismos com relevância epidemiológica e risco de disseminação ou causador de doença emergente, que se torne epidemiologicamente importante, ou cujo mecanismo de transmissão seja desconhecido.

Assim, resíduos desse grupo devem ser submetidos a processos que vierem a ser validados para a redução ou eliminação da carga microbiana, em equipamento compatível com Nível III de inativação microbiana, que pode ser feito dentro ou fora da unidade geradora, inclusive fora do estabelecimento, desde que respeitadas as condições mínimas de acondicionamento e transporte desses resíduos.

Em relação ao Nível III de inativação microbiana, o processo físico, ou outros processos para a redução ou eliminação da carga microbiana, deve ter como resultado a inativação de bactérias vegetativas; fungos; vírus lipofílicos e hidrofílicos; parasitas e micobactérias com redução igual ou maior do que $6\text{Log}10$; e inativação de esporos do *Bacillus stearothermophilus* ou de esporos do *Bacillus subtilis*, com redução igual ou maior do que $4\text{Log}10$.

b) Subgrupo A2

As carcaças; peças anatômicas; vísceras; e outros resíduos provenientes de animais submetidos a processos de experimentação com inoculação de microrganismos; bem como suas forrações; e os cadáveres de animais suspeitos de serem portadores de microrganismos de relevância epidemiológica e com risco de disseminação, que foram submetidos ou não a estudo anatomopatológico ou confirmação diagnóstica.

O tratamento de resíduos do Subgrupo A2 pode ser realizado fora da unidade geradora, desde que ocorra nas dependências do serviço. Após essa etapa, os rejeitos devem ser acondicionados em saco branco leitoso e identificados com a inscrição PEÇAS ANATÔMICAS DE ANIMAIS. Os resíduos do Subgrupo A2 que contenham microrganismos com alto risco de transmissibilidade; alto potencial de letalidade; ou representem risco, caso sejam disseminados no meio ambiente, devem ser submetidos, na unidade geradora, a tratamento que atenda ao Nível III de Inativação Microbiana.

c) Subgrupo A3

Não há indicação para atividades com animais de laboratório.

d) Subgrupo A4

Neste subgrupo, estão relacionados resíduos como cadáveres, carcaças, peças anatômicas, vísceras e outros resíduos

provenientes de animais não submetidos a processos de experimentação com inoculação de microrganismos. O tratamento de resíduos classificados no Subgrupo A4 não necessitam de tratamento prévio, mas devem ser acondicionados em saco branco leitoso e encaminhados para a disposição final ambientalmente adequada.

e) Subgrupo A5

Estão categorizados, neste subgrupo, materiais como órgãos, tecidos e fluidos orgânicos de alta infectividade para príons; de casos suspeitos ou confirmados; bem como quaisquer materiais resultantes da atenção à saúde de indivíduos ou animais, suspeitos ou confirmados, e que tiveram contato com órgãos, tecidos e fluidos de alta infectividade para príons. Esse material deve ser encaminhado para tratamento por incineração. Ademais, esses resíduos devem ser segregados e acondicionados em saco vermelho duplo, como barreira de proteção, e contidos em recipiente exclusivo devidamente identificado.

7.2 Grupo D

Neste grupo, estão categorizadas forrações de animais de bio-térios sem risco biológico associado e pelos de animais. Esses resíduos, quando não encaminhados para compostagem, ou aproveitamento energético, devem ser classificados como rejeitos. Os rejeitos sólidos devem ser dispostos conforme as normas ambientais vigen-

tes. Só podem ser destinados para compostagem forrações de animais de biotérios que não tenham risco biológico associado.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir de todos os aspectos expostos, podemos inferir que a Ciência em Animais de Laboratório apresenta especificidades que a tornam um todo indissociável. Os tópicos inerentes a essa área do conhecimento evidenciam, sobretudo, que repousa moralmente sobre pesquisadores e técnicos a promoção de um tratamento digno aos animais que, nobremente, contribuem para os avanços da ciência. Ademais, em consonância com as leis vigentes, cabe aos cientistas promover experimentação pautada nos princípios da redução, do refinamento e da substituição de animais em pesquisa, visando a solidificar critérios éticos e de bem-estar animal em todo o processo de investigação científica. Tudo isso é imperativo, na medida em que a forma como se conduz uma pesquisa com animais de laboratório está intimamente relacionada à confiabilidade e reprodutibilidade dos dados gerados e ao próprio desenvolvimento da ciência.

REFERÊNCIAS

- ABREU, M. S. de. *et al.* Zebrafish as a model of neurodevelopmental disorders. *Neuroscience*, v. 445, p. 3-11, 2020.
- ALVES, D. P. *et al.* Gnotobiologia. In: LAPCHIK, V. B. V.; MATARRAIA, V. G. M.; KO, G. M. *Cuidado e manejo de animais de laboratório*. São Paulo: Atheneu, 2017. p. 365-394.

ANDERSEN, M. L. *et al.* *Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação*. São Paulo: Cromosete, 2004. 167p.

BALCOMBE, J. P. Laboratory rodent welfare: Thinking outside the cage. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, v. 13, n. 1, p. 77- 88, 2010.

BELON, A. R. Suínocomodelo experimental. *In*: LAPCHIK, V. B. V.; MATARRAIA, V. G. M.; KO, G. M. *Cuidado e manejo de animais de laboratório*. São Paulo: Atheneu, 2017. p. 307-322.

BERBERT, L. R. *et al.* Biomodelos e a covid-19: Estado da arte e tendências de uso. *Revista da Sociedade Brasileira de Animais de Laboratório*, v. 8, n. 1, p. 19-32, 2020.

BRASIL. Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do Art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei n. 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2008. Seção 1, p. 1-4.

BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea). *Diretriz da prática de eutanásia do Concea*, 2018b. Disponível em: https://antigo.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Anexo-Resolucao-Normativa-n-37-Diretriz-da-Pratica-de-Eutanasia_site-concea-.pdf. Acesso em: 7 mar. 2021.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea). Resolução Normativa n. 30, de 2 de fevereiro de 2016, baixa a Diretriz para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea). *Diário Oficial da União*, de 3 fev. 2016, n. 23, Seção 1, p. 3, Brasília, DF, 2 fev. 2016.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea). Resolução Normativa n. 15, Estrutura Física e Ambiente de Roedores e Lagomorfos do Guia Brasileiro de Criação e Utilização de Animais para Atividades de Ensino e Pesquisa Científica. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 18 dez. 2013.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea). *Re-*

solução Normativa n. 13, de 20 de setembro de 2013. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/31061978/do1-2013-09-26-resolucao-normativa-n-13-de-20-de-setembro-de-2013-31061974. Acesso em: 4 mar. 2021.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea). *Resolução Normativa n, 33, de 18 de novembro de 2016*. Disponível em: https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-33-de18.11.2016-D.O.U.-de-21.11.2016-Secao-I-Pag.-05.pdf. Acesso em: 7 mar. 2020).

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n. 222. Regulamenta as boas práticas de gerenciamento dos resíduos de serviços de saúde e dá outras providências, 2018. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 29 mar. 2018.

BRASIL. Ministério do Trabalho. Norma Regulamentadora n. 23. *Proteção contra incêndio*. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 6 jul. 1978.

CAETANO, A. R.; Marcadores SNP: Conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 38, p. 64-71, 2009.

CLOUTIER, S. *et al.* Tickling, a technique for inducing positive affect when handling rats. *Journal of Visual Experiments*, v. 135, n. 135, p. 571- 590, 2018.

COUTO, S. E. R. Classificação dos animais de laboratório quanto ao status sanitário. *In*: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. *Animais de laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. p. 59-64.

FELASA WorkingGroup Report *et al.* Genetic quality assurance and genetic monitoring of laboratory mice and rats. *Laboratory Animals*, v. 54, n. 2, p. 135-148, 2020.

FERREIRA, L. M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M. V. J. Modelos experimentais em pesquisa. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 20, p. 28-34, 2005. Suplemento 2.

FRASER, D. The role of the veterinarian in animal welfare. Animal welfare: too much or too little? Abstracts of the 21st Symposium of the Nordic Committee for Veterinary Scientific Cooperation (NKVet). *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 50, 2007. Suplemento 1.

GODARD, A. L. B.; MASSIRONI, S. M. G. Animais geneticamente modificados. *In: LAPCHIK, V. B. V.; MATARRAIA, V. G. M.; KO, G. M. Cuidado e manejo de animais de laboratório.* São Paulo: Atheneu, 2017. p. 155-166.

HURST, J. L.; WEST, R. S. Taming anxiety in laboratory mice. *Nature Methods*, v. 7, p. 825- 826, 2010.

JUSTICE, M. J.; DHILLON, P. Using the mouse to model human disease: Increasing validity and reproducibility. *Disease Models & Mechanisms*. v. 9, p. 101-103, 2016.

LANA, M. Experimental studies of Chagas disease in animal models. *In: TELLERIA, J.; TIBAYRENC, M. American Trypanosomiasis Chagas Disease.* 2. ed. [S. l.]: Elsevier, p. 299- 320, 2017.

LANGFORD, D. J. *et al.* Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nature methods*, v. 7, n. 6, p. 447-449, 2010.

LOPES-FERREIRA, M. Peixe-zebra. *In: LAPCHIK, V. B. V.; MATARRAIA, V. G. M.; KO, G. M. Cuidado e manejo de animais de laboratório.* São Paulo: Atheneu, 2017. p. 295-306.

MÄHLER, M. *et al.* Recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Laboratory Animals*, v. 48, n. 3, p. 178-192, 2014. Erratum in: *Laboratory Animals*, v. 49, n. 1, p. 88, 2015.

MAJEROWICZ, J. *Boas práticas em biotérios e biossegurança.* Rio de Janeiro: Interciência, 2008. 173 p.

MAJEROWICZ, J. Planejando biotérios de roedores. *Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório*, v. 1, n. 1, p. 9-23, 2019.

MATTARAIA, V. G. M. Enriquecimento ambiental. *In: LAPCHIK, V. B. V.; MATARRAIA, V. G. M.; KO, G. M. Cuidados e manejo de animais de laboratório.* São Paulo: Atheneu, 2009, p. 537-47.

MCMILLAN, F. D. *Mental health and well-being in animals.* Boston: Blackwell Publishing, 2005.

MELLOR, D. J.; PATTERSON-KANE, E.; STAFFORD, K. J. *The sciences of animal welfare.* John Wiley & Sons, 2009. 212 p.

MINAGAWA, C. Y. *Estudo microbiológico fecal de linhagens de camundongos, estirpes de E. coli e do meio ambiente em biotérios*. São Paulo, 2007. 108f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US). Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8th ed. Washington (DC): National Academies Press, 2011.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Institute for Laboratory Animal Research. Division on Earth and Life Studies. *Guidance for the Description of Animal Research in Scientific Publications*. Washington DC: National Academy of Sciences, 2011. 41p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Nutrient Requirements of Laboratory Animals*. Fourth Revised Edition. Washington DC: National Academy of Sciences, 1995. 192p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Nutrient Requirements of Rabbits*, Second Revised Edition. Washington DC: National Academy of Sciences, 1977. 30p.

NC3Rs, 2020. *Housing and husbandry: Rodents*. Disponível em: <https://www.nc3rs.org.uk/3rs-resources/housing-and-husbandry/rodents>. Acesso em: 8 mar. 2021.

NC3Rs, 2020. *Welfare assessment*. Disponível em: <https://www.nc3rs.org.uk/welfare-assessment>. Acesso em: 8 mar. 2021.

NEVES, S. M. P. *et al.* *Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do biotério de produção e experimentação da FCF-IQ/USP*. São Paulo: FCF-IQ/USP, 2013. 216 p.

OLIVEIRA, R. E. M. de. *et al.* Collateral Arteries of the aortic arch in mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 46, n. 1, 2018.

PABST, R. The pig as a model for immunology research. *Cell Tissue Research*, v. 380, p. 287- 304, 2020.

RIVERA, E. A. B. Analgesia em Animais de Experimentação. *In*: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. *Animais de laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. p. 247- 253.

SANTOS, B. F. Macro e microambientes. *In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. Animais de laboratório: Criação e experimentação.* Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 59-64, 2002.

SCHOENFELD, T. A.; CLELAND, T. A. The anatomical logic of smell. *Trends in Neurosciences*, v. 28, n. 11, p. 620-627, 2005.

SMITH, A. J.; LILLEY, E. The Role of the Three Rs in Improving the Planning and Reproducibility of Animal Experiments. *Animals*, v. 9, n. 11, p. 975, 2019.

SOTOCINAL, S. G. *et al.* The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Molecular Pain*, v. 7, n. 55, 2011.

TAKAI, D. *et al.* Minimum environmental enrichment is effective in activating antitumor immunity to transplanted tumor cells in mice. *Experimental animals*, v. 68, n. 4, p. 569-576, 2019.

WILLIAMS, A. C. C. Facial expression of pain: an evolutionary account. *The Behavioral and Brain Sciences*, v. 25, n. 4, p. 439-55, 2002.

CAPÍTULO 4 <doi>10.51996/9788574853994.cap4</doi>

PANORAMA ATUAL DA PESQUISA COM ANIMAIS E CORONAVÍRUS (SARS-CoV-2): MODELOS, ASPECTOS DE LEGISLAÇÃO E BIOSSEGURANÇA

*Aline Diogo Marinho*¹

*Roberta Jeane Bezerra Jorge*²

*Mirna Marques Bezerra Brayner*³⁴

*Mirele da Silveira Vasconcelos*⁵

*Diana Célia Sousa Nunes-Pinheiro*⁶

Resumo: Os modelos animais podem ser úteis na compreensão da fisiopatologia da infecção causada pelo SARS-CoV-2 e contribuir para o desenvolvimento de vacinas, testes diagnósticos e terapias destinadas a controlar o processo infeccioso. No entanto, existem desafios, vantagens e desvantagens associados a cada modelo, bem como medidas de biossegurança na pesquisa com

1 Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará (UFC), *campus* do Porangabuçu, Fortaleza, Ceará, Brasil. *E-mail* para correspondência: marinhodaline@gmail.com

2 Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará (UFC), *campus* do Porangabuçu, Fortaleza, Ceará, Brasil.

3 Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará (UFC), *campus* do Porangabuçu, Fortaleza, Ceará, Brasil.

4 Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC), *campus* Sobral, Sobral, Ceará, Brasil.

5 Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE), *campus* Baturité, Baturité, Ceará, Brasil.

6 Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará (Uece), Fortaleza, Ceará, Brasil.

SARS-CoV-2 em biotérios e laboratórios. Dessa forma, neste capítulo, são abordados os principais modelos animais disponibilizados para estudo da Covid-19, doença causada pela infecção por SARS-CoV-2, além de aspectos de legislação e biossegurança. Primatas não humanos, furões, *hamsters* e camundongos estão entre os principais modelos animais para estudar a Covid-19. A escolha do modelo para a pesquisa com SARS-CoV-2 deve considerar o propósito do estudo, como transmissão viral, patogênese, terapia ou vacina, respeitando o nível de biossegurança adequado. Esse cenário pandêmico ratifica a importância dos modelos animais, uma vez que o êxito clínico de qualquer agente terapêutico está diretamente relacionado ao conhecimento da patogênese da doença.

Palavras-Chave: Animais. Modelos pré-clínicos. Legislação. Biossegurança. SARS-CoV-2. Covid-19.

CURRENT ANIMAL RESEARCH AND CORONAVIRUS (SARS-CoV-2): MODELS, ASPECTS OF LEGISLATION AND BIOSAFETY

Abstract: Animal models can help understand the pathophysiology of infection caused by SARS-CoV-2, contributing to the development of vaccines, diagnostic tests, and therapies to control the infectious process. However, there are challenges, advantages, and disadvantages associated with each model and biosafety measures in research with SARS-CoV-2 in bioterium and laborato-

ries. Thus, this chapter aims to address the main animal models for studying Covid-19, a disease caused by SARS-CoV-2 infection, and aspects of legislation and biosafety. Non-human primates, ferrets, hamsters, and mice are among the main animal models for studying Covid-19. The choice of the model for research with SARS-CoV-2 should consider the study's purpose, such as viral transmission, pathogenesis, therapy, and vaccine respecting the appropriate biosafety level. This pandemic scenario confirms the importance of animal models since any therapeutic agent's clinical success is related to the knowledge of the pathogenesis of the disease.

Keywords: Animals. Preclinical Models. Legislation. Biosafety. SARS-CoV-2. Covid-19.

1 INTRODUÇÃO

Em resposta à atual pandemia da Covid-19 (acrônimo para doença do coronavírus 2019), que é causada pelo SARS-CoV-2 (do inglês, *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*), é necessário avançar no desenvolvimento de ferramentas terapêuticas, assim como no desenvolvimento de vacinas, no aprimoramento de testes diagnósticos e nas medidas sanitárias amplamente divulgadas de proteção das vias respiratórias com o uso de máscaras, prática de distanciamento social e higienização das mãos e fômites. Para esse fim, os estudos com modelos animais são de

grande valia, uma vez que o êxito clínico desses agentes é previamente validado, muitas vezes, pelos achados de pesquisas pré-clínicas sobre a patogênese da infecção viral.

Uma vez que a espécie humana carece de imunidade ao SARS-CoV-2, é imprescindível o uso de vacinas para aplacar o atual cenário pandêmico e prevenir o agravamento da Covid-19. Nesse aspecto, para dar celeridade aos processos de desenvolvimento de medidas diagnósticas e terapêuticas para conter a infecção pelo SARS-CoV-2, em fevereiro de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) montou um painel internacional para desenvolver modelos animais com Covid-19.

Estudos de revisão abordam o uso de modelos animais atualmente disponíveis para coronaviruses, incluindo modelos de infecção por SARS-CoV-2 e mecanismos de doenças relacionadas à Covid-19 (CLEARY *et al.*, 2020, LUTZ *et al.*, 2020; SINGH *et al.*, 2020; YUAN *et al.*, 2020). Além de avaliar a eficácia de substâncias com potencial atividade viral, esses modelos animais específicos para Covid-19 também são úteis para a análise da segurança pré-clínica desses possíveis agentes terapêuticos (LE *et al.*, 2020).

O esclarecimento dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia e no tratamento específico para a Covid-19 exige ensaios pré-clínicos que validem a eficácia e a segurança. Os modelos animais são muito úteis para compreender a infecção causada pelo SARS-CoV-2, pois permitem a reprodução dos sinais clínicos do hospedeiro infectado; o estudo da resposta imuno-inflamatória ao

vírus; a gravidade da doença; rota de infecção; replicação viral; transmissão; assim como níveis comparáveis de morbidade e mortalidade (RAHIM; MUHAMMAD, 2020). Essas características são importantes para o desenvolvimento de medidas preventivas, assim como para o diagnóstico e os tratamentos (YU *et al.*, 2020a).

Embora a infecção por SARS-CoV-2 seja conhecida por causar patologia respiratória, incluindo pneumonia e Síndrome da Dificuldade Respiratória Aguda (SDRA), pode também resultar em várias manifestações extrapulmonares (GUPTA *et al.*, 2020). Dessa forma, além dos pulmões, a Covid-19 pode levar à síndrome de disfunção múltipla de órgãos, o que traz muitos desafios para o estudo da fisiopatogênese da doença e possíveis terapias, principalmente no que concerne à sua representação em modelos animais. Além disso, outra importante preocupação refere-se à biossegurança em instalações animais de pesquisa para a realização de testes pré-clínicos com o SARS-CoV-2 (BERBERT *et al.*, 2020).

A pesquisa pré-clínica é necessária, portanto, para entender o vírus e testar a segurança e eficácia de uma vacina ou agente antiviral. Várias espécies animais estão sendo usadas no estudo da doença e para testes dos compostos terapêuticos (YUAN *et al.*, 2020). Neste capítulo, são abordados os principais modelos animais para estudar a Covid-19, bem como aspectos de legislação e biossegurança.

2 MODELOS ANIMAIS DE SARS-CoV-2

Os primeiros modelos animais com Covid-19 relatados na literatura foram roedores transgênicos infectados intranasalmente com SARS-CoV-2 que expressam enzima conversora de angiotensina 2, ECA₂ humana, ou sigla inglês ACE2 (camundongos hACE2) (BAO *et al.*, 2020) e macacos rhesus (*Macaca mulatta*) infectados intratraquealmente (YU *et al.*, 2020a). Modelos de primatas não humanos; modelos animais em furões, *hamsters* e camundongos, estão disponíveis para o estudo da Covid-19, os quais são especificados no Quadro 1 (SINGH *et al.*, 2020; CLEARY *et al.*, 2020).

Quadro 1 – Aspectos gerais das principais espécies animais atualmente utilizadas para estudo da infecção pelo SARS-CoV-2

	Principais Espécies Animais para Estudo da Infecção pelo SARS-CoV-2	Comentários gerais
Camundongo	BALB/c	<p>Maior disponibilidade comercial de anticorpos monoclonais para marcadores imunológicos.</p> <p>Os sinais clínicos são mais evidentes em animais idosos.</p>
	HFH4-hACE2 K18-hACE2	<p>Diversa disponibilidade de ferramentas de pesquisa.</p> <p>Respostas imunológicas bem caracterizadas.</p> <p>Maior número de animais por grupo de estudo.</p> <p>Requer expressão transgênica de hACE2 de alto custo (aquisição, transporte e tempo).</p> <p>Apresenta algumas diferenças importantes nas fisiologias pulmonar e imunológica em comparação com os humanos.</p>

MODELOS ANIMAIS: DA LEGISLAÇÃO À EXPERIMENTAÇÃO CIENTÍFICA

Hamster	<i>Syrian or golden hamster (Mesocricetus auratus)</i>	Alta homologia com humanos em termos de receptor ECA ₂ . Apresenta características clínicas de infecção similares aos humanos quando comparados com os BALB/ c idosos. Limitação de anticorpos monoclonais para proteínas específicas da espécie.
Furão	<i>Ferret (Mustela putorius furo)</i>	Exibe um reflexo de tosse não encontrado para camundongo e rato. Desenvolve sintomas semelhantes aos descritos na Covid-19 humana (tosse e febre). No entanto, não está claro se a infecção pulmonar grave e edema podem ser causados pelo SARS-CoV-2.
Primata não humano	<i>Rhesus macaques Common marmoset African green monkeys Cynomolgus monkeys</i>	Filogeneticamente próximo aos humanos. Número limitado de animais por grupo. Apresenta questões éticas adicionais em comparação com os animais roedores.

Fonte: Hassan *et al.* (2020); Dinnon *et al.*(2020); Bao *et al.* (2020); Sun *et al.* (2020); Cleary *et al.*(2020); Singh *et al.*(2020); Yuan *et al.* (2020).

Os modelos não primatas têm sido substancialmente utilizados, a despeito da sua filogenia não estar tão próxima aos humanos quanto os modelos primatas não humanos. Contudo, a possibilidade de um grupo experimental robusto torna o estudo com modelos roedores atraente para a investigação, assim como sua capacidade reprodutiva (em menor tempo) e um manuseio facilitado, por se tratar de animais de pequeno porte (CLEARY *et al.*, 2020). Em geral, os modelos não primatas descritos aqui tornam-se ferramentas úteis para estudar a transmissão e a patogênese do SARS-CoV-2 e avaliar vacinas, testes diagnósticos e drogas terapêuticas contra a Covid-19.

Sabe-se que o SARS-CoV-2 utiliza a ACE2 como um receptor celular para invadir as células humanas (ANDERSEN *et al.*, 2020). A identificação dessa possível rota de infecção tem implicações importantes para a compreensão da patogênese e, conseqüentemente, para as estratégias de tratamento da infecção pelo SARS-CoV-2.

Nos diferentes tecidos, existem níveis de expressão diferenciada de ACE2, que são maiores no intestino delgado, rins, coração, tireoide e tecido adiposo, seguidos dos pulmões, cólon, fígado, bexiga e glândula adrenal, e níveis mais baixos no sangue, baço, medula óssea, cérebro, vasos sanguíneos e músculos (LI *et al.*, 2020a; 2020b). Além disso, a localização da ACE2 foi identificada na mucosa oral e nasal, nasofaringe, estômago, pele, nódulos linfáticos e timo (GALLO *et al.*, 2020; SUNGNAK *et al.*, 2020).

O processo de entrada do vírus nas células-alvo do hospedeiro é mediado pela glicoproteína de pico de superfície (S proteína ou proteína *spike*). A proteína *spike* inclui duas regiões, S1 e S2, que serão clivadas por proteases, como serina protease transmembranar 2 (TMPRSS2), que permitem a entrada viral nas células epiteliais do hospedeiro para replicação viral como mecanismo de infecção (WANG *et al.*, 2020). A região S1 é para a ligação ao receptor da célula hospedeira e a S2 é para a fusão da membrana. Na região S1, está o domínio de ligação ao receptor (RBD), que se liga à ACE2, e essa interação dá início à infecção humana com SARS-CoV-2 (MALIK, 2020).

Portanto, o primeiro desafio dos modelos não primatas é a reprodução da infecção. Os estudos *in silico* têm demonstrado altas energias livres de ligação entre a proteína *spike*-RBD e o ACE2 humano (-50,43 kcal / mol) (HE *et al.*, 2020). Então, o polimorfismo do ACE2 e a semelhança com o hACE2 são preditivos para um modelo eficaz. No caso dos roedores, a probabilidade de infecção é menor, uma vez que o SARS-CoV-2 apresenta interações ineficientes entre a proteína *spike* e o ortólogo murino do receptor humano, mACE2, de camundongos selvagens (DINNON *et al.*, 2020).

Para superar essa limitação, foi necessário um remodelamento da ligação S com mACE2, o que resultou num vírus recombinante (SARS-CoV-2 MA) tornando possível a sua entrada pela mACE2 e, conseqüentemente, a reprodução da infecção viral nestes animais. O SARS-CoV-2 MA replicou-se, embora em taxa ligeiramente mais baixa, nas vias respiratórias superiores e inferiores de camundongos BALB/c, tanto nos jovens como nos idosos. Porém, o desenvolvimento da doença mais grave foi observado apenas nos BALB/c idosos (DINNON *et al.*, 2020).

Mais um modelo utilizado é o de entrega de hACE2 mediado por vetores virais, o adenovírus deficiente para replicação Ad5-hACE2. Camundongos inoculados com Ad5-hACE2 desenvolveram pneumonia, associada à perda de peso. Contudo, a taxa de replicação do vírus foi restrita aos pulmões, além de ter uma limitação na reprodução dos sinais clínicos compatíveis aos humanos (RATHNASINGHE *et al.*, 2020).

No teste de vacinação, em um ensaio clínico de fase I, o adenovírus ChAdOx1 nCoV-19 foi imunogênico em camundongos BALB/c, provocando uma resposta mediada por células e uma resposta humoral robusta. Foram observados títulos de IgG total e das subclasses de IgG contra as subunidades S1 e S2, e uma resposta predominantemente Th1 apoiada por altos níveis de IFN- γ e TNF- α , e baixos níveis de IL-4 e IL-10 (VAN DOREMALEN *et al.*, 2020).

Um modelo bem-sucedido de patogênese SARS-CoV-2 com infecção e doença pulmonar foi realizado em camundongos C57BL/6 e BALB/c, com hACE2 análoga (SUN *et al.*, 2020). Dentre as vantagens desse modelo, destacam-se, entre os animais jovens, uma replicação viral sem inflamação substancial nos pulmões, enquanto nos adultos as respostas pró-inflamatórias são precoces e agudamente excessivas, nesses órgãos. Porém, a desvantagem desses animais jovens, é que as características da infecção são menos similares à dos humanos.

Contudo, os camundongos BALB/c idosos apresentam suscetibilidade acentuada para a infecção, com doença semelhante ao quadro clínico humano. Ambos os animais, jovens e adultos, mostram capacidade de desenvolver uma resposta imune adaptativa à infecção. Porém, devido à aquisição emergencial, a espera para atingir a idade necessária se torna uma das limitações do seu uso. Vale ressaltar que os anticorpos monoclonais contra os marcadores imunológicos em camundongos são de fácil aquisição e comercialmente disponíveis.

Outra estratégia para o estudo da Covid-19 em roedores foi a utilização de animais transgênicos gerados com a tecnologia *knockin* CRISPR/Cas9, como os camundongos que expressam o hACE2 em substituição ao mACE2, tornando esses animais susceptíveis à infecção pelo SARS-CoV-2 (SUN *et al.*, 2020). Em comparação com camundongos C57BL/6 do tipo selvagem, camundongos hACE2 jovens e idosos sustentaram altas cargas virais no pulmão, na traqueia e no cérebro, após inoculação intranasal.

Em alguns modelos transgênicos de camundongos hACE2 infectados com SARS-CoV-2, os animais apresentaram pneumonia e perda moderada de peso, embora não tenham sido observadas mortes ou alteração histopatológica em tecidos não pulmonares (BAO *et al.*, 2020). Curiosamente, a inoculação intragástrica de SARS-CoV-2 causou infecção produtiva e levou a alterações patológicas pulmonares em camundongos hACE2. No geral, os animais idosos tornam-se um modelo mais fidedigno, pois são mais susceptíveis à infecção (LUTZ *et al.*, 2020).

O modelo transgênico HFH4-hACE2 em camundongos C3B6 utilizou o promotor HFH4/FOXJ1 para expressar hACE2 em células epiteliais ciliadas do pulmão. Contudo, a expressão em outros órgãos, como fígado, rim, cérebro e intestino, ocorreu de forma variada. Os camundongos apresentaram perda de peso, alta taxa de replicação viral no pulmão e no cérebro, com evolução para encefalite letal, em alguns animais, embora tenha havido baixa taxa de mortalidade (JIANG *et al.*, 2020). Esse modelo também mostrou

infecção ocular, dado consistente com resultados clínicos de pacientes com Covid-19 (COLAVITA *et al.*, 2020).

Na maioria dos estudos experimentais, desenvolve quadros leves a moderados da doença. No entanto, no modelo transgênico K18-hACE2, o promotor de citoqueratina K-18 conduziu à expressão de hACE2 nas células epiteliais das vias respiratórias, bem como em epitélios de outros órgãos, incluindo o fígado, rim, trato gastrointestinal e cérebro. Esse modelo, foi capaz de reproduzir o estágio grave, assim como foi capaz de reproduzir sintomas de anosmia, distúrbios do ouvido, nariz e garganta comuns em pacientes com Covid-19 (ZHENG *et al.*, 2021).

Corroborando com os achados clínicos, houve aumento de Interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e Proteína 10 induzida por IFN (IP-10), assim como as quimiocinas: fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e monócito quimiotático proteína 1 (MCP-1) (YINDA *et al.*, 2020). Esse resultado é de grande importância, pois em pacientes infectados, ocorre uma tempestade de citocinas, que, além de estar relacionada à progressão da doença, também está intimamente ligada ao desenvolvimento da síndrome respiratória aguda grave (SOY *et al.*, 2020).

Como pode ser avaliado, o modelo transgênico HFH4-hACE2 difere do K18-hACE2 pela variação potencial na expressão e distribuição de hACE2 nos tecidos com inflamação brônquica leve. Po1a1 em variados órgãos e tipos de células e diferenças na patogênese.

Devido às muitas diferenças em sua genética, anatomia e fisiologia, esses modelos murinos com Covid-19 não são os mais adequados para estudos de patogênese. Também deve-se considerar o custo desses animais, com relação à aquisição, ao transporte e ao tempo de manutenção, assim como a urgência para reproduzir os modelos, o que torna impossível esperar muitos meses até o animal atingir uma idade que se torne mais propícia às manifestações da infecção.

Nesse contexto, o *hamster* sírio dourado ou *golden hamster* (*Mesocricetus auratus*) torna-se um modelo mais atraente e prontamente disponível. A porção RBD da proteína S apresenta alta afinidade de ligação com a ACE2, de maneira fisiológica, não necessitando, o animal, de modificações adicionais para torná-lo suscetível à infecção. As manifestações clínicas e histopatológicas assemelham-se às de humanos com Covid-19 (CHAN *et al.*, 2020a). Outra vantagem é que, para *hamsters*, há disponibilidade de reagentes para apoiar o estudo.

Em estudos sobre a patogênese e a transmissão do SARS-CoV-2 em *golden hamster*, observou-se que os sinais clínicos se assemelham à infecção leve em humanos, com quadro subclínico, com eficiente replicação viral, mas que apresentam um curto período de transmissão, apesar da persistente detecção de RNA viral nas lavagens nasais (SIA *et al.* 2020), confirmando que os assintomáticos podem ter alta carga viral e propiciar a transmissão do vírus. Esses achados foram importantes para entender o processo

de transmissão, o que fortaleceu a adoção de medidas de distanciamento social e bloqueio da disseminação.

Em outro estudo, houve replicação eficiente dos vírus, associada às lesões pulmonares graves, após infecção intranasal, com características semelhantes à de humanos infectados por SARS-CoV-2 (IMAI *et al.*, 2020), como opacidade em vidro fosco multilobular grave, bilateral, periférica, e regiões de consolidação pulmonar, diferentemente do estudo anteriormente citado.

Em relação aos mecanismos de defesa, os *hamsters* infectados com SARS-CoV-2 apresentaram respostas de anticorpos neutralizantes e foram protegidos contra a reinfeção. A transmissão passiva de soro convalescente foi capaz de inibir eficientemente a replicação do vírus nos pulmões, mesmo quando o soro foi administrado dois dias após a infecção. O que corrobora com estudos clínicos, em que a taxa de mortalidade foi diminuída quando havia transferência de soro até 72 horas após a infecção (JOYNER *et al.*, 2021). Sabe-se que a aplicação do método de transferência de imunidade passiva não é uma técnica nova, mas ampliou a possibilidade para consolidar o seu uso também nos casos de Covid-19.

A eficiência das máscaras cirúrgicas de proteção individual para a prevenção da transmissão também foi avaliada em *hamsters*. Provou-se que as gotículas eliminadas pela fala, espirro e tosse tiveram sua dispersão contida pelo seu uso, dado consistente com estudos de outros vírus, como o causador da influenza (CHAN *et al.*, 2020b) favorecendo a utilização de máscaras pela população mundial.

Coletivamente, esses resultados demonstram que esse modelo de *hamster* sírio é extremamente útil para compreender não só a patogênese do SARS-CoV-2, como também pesquisas para tratamento, uma vez que os animais apresentaram sinais clínicos, com altos títulos virais e achados histopatológicos pulmonares compatíveis com os dos humanos infectados.

Porém, a despeito dos mecanismos imunológicos, esse modelo apresenta limitações, uma vez que o sequenciamento do genoma do *hamster* levou um tempo considerável e há escassez de anticorpos monoclonais desenvolvidos contra proteínas específicas para a espécie e marcadores imunológicos, inviabilizando a aquisição de *kits* comerciais para tais fins.

Furões (*Ferret*) são mamíferos já utilizados em estudos para outras infecções (KIM *et al.*, 2020), tornando-se um modelo a ser explorado. Concha nasal, palato mole e amígdalas, desses animais, se mostraram mais susceptíveis ao SARS-CoV-2, mas indetectável nos demais órgãos coletados, como coração, fígado, baço, rins, pâncreas, intestino delgado e cérebro (SHI *et al.*, 2020a).

Esse acometimento de vias respiratórias superiores é vantajoso para a investigação sobre a Covid-19, assim como a transmissibilidade observada pelo contato direto e pelo ar (RICHARD *et al.*, 2020). Mas, mesmo após inoculação intratraqueal, não foram detectados vírus nos lobos pulmonares, o que precisa ser melhor investigado, e não se sabe se furões machos apresentam quadro mais grave do que as fêmeas, o que representa limitações do modelo no estudo da patogenia pulmonar.

Apesar disso, os furões desenvolvem sinais semelhantes aos humanos, como elevada temperatura corporal, falta de apetite e tosse, entre os dias 2 a 12 pós infecção (CLEARLY *et al.*, 2020). Outro fato importante a se considerar é que os laboratórios brasileiros não têm a disponibilidade dessa espécie. Furão não faz parte da fauna brasileira, e as instalações laboratoriais não são específicas para a sua manutenção.

O primata não humano (PNH), devido à sua proximidade filogenética com os humanos, torna-se um modelo promissor para pesquisa pré-clínica sobre a Covid-19. Em ensaios pré-clínicos, têm sido utilizadas espécies de macacos pertencentes a duas famílias (macacos do Velho e do Novo Mundo). Essas espécies são suscetíveis à infecção por SARS-CoV-2; apresentam replicação do vírus; e disseminam vírus em esfregaços nasais. Além do mais, também foi observada a produção de anticorpos específicos contra o vírus (LU *et al.*, 2020).

Os macacos rhesus (*Macaca mulatta*), tanto jovens (3 a 5 anos) como idosos (15 anos), foram utilizados no estudo de Yu *et al.* (2020a), com a finalidade de avaliar a inoculação intratraqueal de SARS-CoV-2. Observaram-se perda de peso e sinais clínicos transitórios, incluindo febre e astenia. Uma menor carga viral foi constatada nos animais jovens, assim como uma pneumonia intersticial mais branda do que nos idosos, de acordo com achados clínicos e histopatológicos.

Com relação aos achados imunológicos, houve diminuição de linfócitos, o que corrobora com achados clínicos de pacientes infectados, e mesmo após 14 dias foram detectados os anticorpos IgG específicos contra SARS-CoV-2. Esses dados reforçam que os estudos que trazem comparação no curso da infecção entre os animais jovens e idosos dão resultados importantes para as pesquisas sobre a Covid-19.

No tocante ao desenvolvimento de vacinas, pesquisas com macacos rhesus também têm sido conduzidas. Quatro vacinas contra SARS-CoV-2 foram avaliadas, incluindo duas vacinas inativadas; uma vacina de vetor adenoviral; e uma vacina de DNA (YU *et al.*, 2020b).

Os macacos rhesus como modelo de infecção por SARS-CoV-2 apresentaram altas cargas virais nos tratos respiratórios superior e inferior; respostas imunes humorais e celulares; e evidências patológicas de pneumonia viral; além da proteção contra reinfeção, mediada principalmente por controle imunológico (CHANDRASHEKAR *et al.*, 2020; SINGH *et al.*, 2021; YU *et al.*, 2020b). Altos níveis séricos de citocinas IL-10, IL-1RA, IL-8, IL-15 e MCP-1 foram detectadas em macacos infectados (LU *et al.*, 2021).

Os macacos rhesus também foram utilizados em testes de vacinas baseadas em vetor de adenovírus sorotipo 26 (Ad26), que expressam a proteína *spike* de SARS-CoV-2 em primatas não humanos. Essas vacinas se encontram em fase de testes clínicos (MERCADO *et al.*, 2020). As vias utilizadas para a imunização foram

intranasal e intratraqueal. Após uma única dose, observaram-se respostas robustas de anticorpos neutralizantes, e resposta imune celular mediada principalmente por Th1, e não Th2, enquanto a maioria dos animais desenvolveu proteção contra a SARS-CoV-2. Porém, não se sabe sobre a intensificação da doença respiratória associada à vacina ou se há aumento da infecção dependente de anticorpos.

Outra vacina candidata é a que utiliza um adenovírus do sorotipo 5 recombinante incompetente para replicação, Ad5-S-nb2, que carrega um gene com códon otimizado, que codifica a proteína *spike*, a qual também foi testada em macacos rhesus (FENG *et al.*, 2020). Neste trabalho, a inoculação da vacina se deu pelas vias intramuscular (IM) e intranasal (IN). A dosagem de IgG específica mostrou-se maior nos macacos vacinados por via IM comparada à via IN, assim como a resposta mediada por células foi mais fraca por via IN. Essa vacina também está sob ensaio clínico, e esses resultados, principalmente relacionados à via de administração, são muito úteis para a pesquisa com seres humanos.

Outro modelo que pode ser usado são os macacos cinomolgos, ou cynomolgus (*Macaca fascicularis*). Rockx *et al.* (2020) investigaram, nestes animais, a infecção, e, diferentemente dos macacos rhesus, não observaram sinais clínicos evidentes, como doença respiratória ou perda de peso, e não houve diferença significativa entre jovens e idosos. Porém, esses animais foram susceptíveis à infecção, com alta taxa de replicação no trato respiratório superior, e foram capazes de disseminar o vírus por um longo período.

Em outro estudo, vias combinadas, intranasal e intratraqueal, foram avaliadas em macacos cinomolgos (LE BRAS, 2020). Aqui, novamente, não mostraram sinais clínicos evidentes da doença, mas foram capazes de liberar o vírus, assim como ocorre em humanos assintomáticos. No estudo de Finch *et al.* (2020) utilizando *Macacas fascicularis* submetidos à instilação intrabrônquica com solução contendo o vírus SARS-CoV-2, um dos principais achados foi o notável aumento da concentração de citocinas (também conhecida como “tempestade de citocinas”), como quimiocina ligante 8 motivo CXC (CXCL8), IL-6, IL-13, IL-15, antagonista do receptor de IL-1 (IL-1 RN) e TNF, começando por volta do sexto dia.

Além disso, testes de imunogenicidade com a S proteína modificada (S-2P) foram realizados nessa espécie, na qual houve detecção de IgG específico para S proteína de SARS-CoV-2, com diferenças nos títulos de anticorpos neutralizantes, os quais foram maiores no macaco macho em relação à fêmea após a terceira dose (LI *et al.*, 2020a). Esses resultados foram importantes para avaliar se a infecção apresentava curso diferente, a depender do gênero.

Em resumo, os macacos rhesus desenvolveram pneumonia e sinais clínicos que se assemelham melhor aos casos mais graves de Covid-19, enquanto a doença em macacos cinomolgos foi bastante leve. Essa construção também foi avaliada no desenvolvimento de ensaio sorológico. Outras vacinas, utilizando o mesmo *designer*, encontram-se sob avaliação clínica (CORBETT *et al.*, 2020; GUEBRE-XABIER *et al.*, 2020).

Macacos verdes africanos suportam um alto nível de replicação do SARS-CoV-2 e desenvolvem doença respiratória pronunciada e lesões pulmonares graves, que podem ser mais substanciais do que o relatado para outras espécies de NHP, incluindo macacos cynomolgus e rhesus (WOOLSEY *et al.*, 2020). A introdução do vírus por vias combinadas, intratraqueal e intranasal, causou perda de apetite e febre. Ainda, os animais apresentaram mudança transitória sistêmica de leucócitos e trombocitopenia leve.

Foram observados níveis séricos elevados de IL-8, IP-10, IL-12 e MCP-1, os quais podem explicar o recrutamento subsequente de monócitos e neutrófilos para o pulmão. O aumento de IL-6 e IFN- β também foi evidente. Essa elevação de citocinas está intimamente relacionada à gravidade da doença em seres humanos (COSTELA-RUIZ *et al.*, 2020).

Detectaram-se, também, distúrbios de coagulação (elevação de fibrinogênio) associados a achados macroscópicos de hemorragia substancial no pulmão. Houve evidência de envolvimento gastrointestinal nos macacos infectados com SARS-CoV-2. Esses resultados, em conjunto, assemelham-se aos casos humanos de Covid-19. Porém, muitas perguntas essenciais ainda precisam ser respondidas, como a durabilidade da imunidade natural.

O macaco *Callithrix jacchus* (*C. jacchus*) também foi utilizado para investigação da Covid-19, mas não houve detecção de replicação viral no tecido pulmonar com o protocolo utilizado, assim como também não houve detecção de anticorpos específicos con-

tra o vírus nas amostras de soro dos animais infectados, diferentemente do *M. mulatta* e *M. fascicularis*. Não se observaram lesões graves em pulmão, baço e nódulos linfáticos de *C. jacchus* (LU *et al.*, 2020), demonstrando que esse modelo apresenta relativa resistência à infecção por SARS-CoV-2 (LU *et al.*, 2021).

Mediante o exposto, pode-se inferir que os macacos se apresentam como o padrão ouro para pesquisa de Covid-19 com animais, úteis para o desenvolvimento de vacinas e abordagens terapêuticas, assim como para investigar a imunopatogênese da infecção viral. Segundo Yuan *et al.* (2020, p. 949): “Um modelo animal ideal é aquele que imita a infecção viral e doenças em humanos em vários aspectos, incluindo morbidade, carga viral, sinais clínicos típicos, respostas imunes do hospedeiro e mortalidade”. Apesar das inúmeras vantagens, devem-se considerar as limitações, como a raridade dos animais à disposição no Brasil. Com o surto da pandemia do coronavírus, o preço desses animais aumentou consideravelmente.

Outro desafio a ser superado é a instalação de uma estrutura que atenda ao manejo desses primatas, o que também não é comum no Brasil, e qualificada mão de obra para manipulá-los, já que não são animais de pequeno porte. A diminuição substancial do grupo experimental também é uma limitação. Muitos animais utilizados na pesquisa eram adultos (cerca de 15 anos), o que dificulta ainda mais a obtenção de um grupo experimental adequado ao estudo.

Estudos *in vitro* com o SARS-CoV-2 em células renais de coelho e porco mostraram infecciosidade (CHU *et al.*, 2020). Esses animais podem ser úteis para estudos relacionados à Covid-19. Coelhos são adequados para estudos longitudinais da função pulmonar, enquanto órgãos dos porcos se assemelham aos humanos e são úteis para estudos envolvendo medições hemodinâmicas.

Embora os morcegos não sejam comumente usados como organismos modelo, bem como suas linhagens celulares, esses podem também representar interesse particular, provavelmente porque o SARS-CoV-2 tem origem de um coronavírus que infectou morcegos (ANDERSEN *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020). Além disso, seus sistemas imunológicos são capazes de tolerar infecções persistentes de vírus com maior virulência (BROOK *et al.*, 2020; RABI *et al.*, 2020).

Animais domesticados, como cães e gatos, podem ser hospedeiros potenciais para suportar a infecção por SARS-CoV-2 (SHI *et al.*, 2020a). Gatos e tigres alojados em zoológicos apresentaram resultados positivos para o vírus nos Estados Unidos da América (EUA), sugerindo a importância veterinária e zoonótica de estudos em felinos com o SARS-CoV-2 (NEWMAN, 2020; HAMER *et al.*, 2021). No Brasil, já foi detectado o vírus em animais domiciliados, cães e gatos (DIAS *et al.*, 2021).

Até o momento, os modelos animais de infecção disponíveis foram úteis para estudos de transmissão e imunidade, e a maioria deles modela apenas parcialmente os mecanismos implicados na

Covid-19 grave em humanos. Diante disso, é importante a investigação contínua de modelos animais que mimetizem os principais achados clínicos da Covid-19, a imunopatologia e as possíveis sequelas dessa infecção, bem como para estabelecer a segurança e eficácia de possíveis agentes terapêuticos e vacinas.

3 ASPECTOS DE LEGISLAÇÃO E BIOSSEGURANÇA

O aprimoramento e o conhecimento fundamental do vírus SARS-CoV-2 e da doença humana Covid-19 tornaram-se recentemente objetos de estudo em centros de pesquisa internacionais, para a caracterização do vírus e para a compreensão dos mecanismos envolvidos na infecção e doença causada por esse agente (BANACH *et al.* 2020; ENKIRCH; VON MESSLING, 2015; GRETEBECK e SUBBARAO, 2015; HABTEMARIAM *et al.* 2020; KIM *et al.*, 2020; SHI, *et al.*, 2020b; SUREDA *et al.* 2020).

As pesquisas com biomodelos em prol do acesso ao conhecimento científico sobre a Covid-19 vêm sendo desenvolvidas mundialmente com a colaboração entre várias instituições de pesquisa; pesquisadores individuais; e especialistas em cuidados com animais; cientistas; e funcionários de laboratórios, com o objetivo de gerar informações sobre como os projetos de pesquisa estão sendo gerenciados e mantidos; acelerar a pesquisa para diagnosticar, prevenir e tratar a Covid-19; ressaltar o papel prioritário dos modelos animais na pesquisa; identificar novos tratamentos para a Covid-19; e desenvolver uma vacina segura e eficaz contra o vírus SARS-CoV-2.

Como exemplo, o Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas ligado ao *National Institute of Health* (NIH), nos EUA, sugere especificamente que modelos de pequenos e grandes animais podem recapitular a Covid-19 observada em humanos. Já a Universidade de Michigan, nos EUA, reforça que é preciso garantir o bem-estar animal e apoiar a comunidade de pesquisa envolvida com a Covid-19 considerando os princípios orientadores para trabalhar em segurança com animais de pesquisa (UNIVERSITY OF MICHIGAN, 2021).

O Código Australiano para o Cuidado e Uso de Animais para Fins Científicos, de 2013 (8ª edição), traz detalhes sobre as responsabilidades de instituições, comitê de ética animal, investigadores e todas as pessoas envolvidas no cuidado e uso de animais. Em sua cláusula 2.1.1, o Código informa que as instituições devem garantir que o cuidado e o uso de animais estejam em conformidade com seus preceitos (NATIONAL HEALTH AND MEDICAL RESEARCH COUNCIL (AUSTRALIA); AUSTRALIAN RESEARCH COUNCIL, 2013). Informa, ainda, que as instituições são responsáveis pelo fornecimento de diretrizes para o cuidado e uso de animais, incluindo ações necessárias para eventos adversos inesperados e emergências.

Assim como na Austrália, o Brasil, por meio do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea), orienta as Instituições de pesquisa e suas Comissões de Ética no Uso de Animais (Ceuas) para manterem o devido cuidado com os animais.

As instituições e os comitês têm autonomia para elaborar planos de contingência, em função da pandemia Covid-19, seguindo as normas do Concea e da Ceua institucional, além dos demais regulamentos, para não colocar em risco o bem-estar dos animais e a segurança dos profissionais.

É importante destacar que os procedimentos de biossegurança em biotérios e laboratórios para a pesquisa com o vírus emergente SARS-CoV-2, causador da Covid-19, são imprescindíveis. O conhecimento da doença é limitado, mas, diante da rápida evolução do conhecimento científico, diretrizes de biossegurança laboratorial estão sendo atualizadas com frequência e as normativas ainda estão em formação, porém, algumas instituições têm elaborado seu próprio Plano de Contingência Covid-19 (VALLE, 2020).

Algumas medidas de biossegurança relacionadas ao novo coronavírus das instituições refletem os padrões internacionais orientados provisoriamente pela OMS e seguem também os requisitos mínimos necessários para melhores práticas com produtos biológicos em laboratório contidos na 3ª edição do Manual de Biossegurança Laboratorial da OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

O SARS-CoV-2 é classificado como agente biológico do grupo de risco 3 (NB-3), estratificação essa que está dentro dos quatro níveis de biossegurança (NB-1, NB-2, NB-3 e NB-4) que são crescentes no maior grau de contenção e complexidade do nível de proteção (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). Essa classifi-

cação representa que esse agente biológico “pode causar doenças humanas graves e apresenta um risco de infecção sério para os funcionários e que pode apresentar um risco de propagação para a comunidade, embora geralmente haja profilaxia ou tratamento eficaz disponível” (CODE OF PRACTICE, 2020, p. 8).

A atribuição de um agente a um nível de biossegurança para trabalho de laboratório deve ser baseada em avaliação de risco que considere o grupo de risco, bem como outros fatores para estabelecer o nível de biossegurança apropriado, de acordo com o especificado para cada um dos quatro níveis de biossegurança supracitados (NB1, NB2, NB3 e NB4) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004).

De acordo com a orientação provisória emitida pela OMS (2020), o trabalho laboratorial não propagativo, como diagnóstico e saúde (saúde pública, clínicos ou hospitalares) envolvendo SARS-CoV-2, deve ser conduzido em uma instalação com procedimentos equivalentes, no mínimo, ao Nível de Biossegurança 2 (BSL-2/ NB2). Enquanto o trabalho de propagação envolvendo SARS-CoV-2 deve ser conduzido em um laboratório de nível de contenção 3 (BSL-3/NB3), com pressão do ar negativa para a atmosfera (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

O Laboratório NB3, ou de contenção, destina-se ao trabalho com microrganismos do Grupo de Risco 3 e com altas concentrações de microrganismos do Grupo de Risco 2, que representam um risco aumentado de disseminação de aerossóis (WORLD

HEALTH ORGANIZATION, 2004). Assim, o SARS-CoV-2, devido à sua elevada patogenicidade e infecciosidade do SARS-CoV-2, precisa ser manuseado em condições de NB3, o que tem dificultado o desenvolvimento de vacinas e terapêuticas em instituições que não possuem esse nível de biossegurança em suas instalações (NIE *et al.*, 2020).

No entanto, o estudo com partículas virais pseudotipadas (pseudovírus) podem ser outra opção para pesquisas pré-clínicas que não necessitem do NB3 (NIE *et al.*, 2020; YUAN *et al.*, 2020). Embora o sistema de pseudovírus não represente os mecanismos de evasão e imunopatologia exclusivos do SARS-CoV-2, ou coronavírus relacionados (CLEARY *et al.*, 2020; YUAN *et al.*, 2020), esse pode ser manipulado na instalação NB2. Além disso, os pseudovírus são ferramentas virológicas úteis devido à sua segurança e versatilidade e têm sido aplicados para examinar a eficácia ou imunogenicidade de vacinas em vírus emergentes e reemergentes (HUANG *et al.*, 2020).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a pandemia imposta pelo SARS-CoV-2, a comunidade científica tem enfrentado muitos desafios. Felizmente, os modelos animais envolvendo diferentes espécies podem minimizar esses conflitos, ajudando a responder às questões essenciais da fisiopatologia da Covid-19, incluindo transmissão, resposta imuno-infla-

matéria do hospedeiro ao SARS-CoV-2, bem como para ajudar a estabelecer a segurança e eficácia de potenciais agentes terapêuticos, vacinas e testes diagnósticos.

No entanto, é preciso cautela na análise dos resultados, uma vez que, nos modelos animais observados, o desafio foi mimetizar o estado grave da Covid-19 em humanos. Além disso, o uso de diferentes cepas virais, dosagens e vias de desafio nesses modelos resultaram em conclusões distintas e até controversas. Nesse sentido, para a escolha do modelo, deve-se considerar o propósito do estudo, como transmissão viral, patogênese, terapia ou vacina, respeitando sempre o nível de biossegurança adequado.

Com relação aos níveis de biossegurança, os ensaios que utilizam manejo do vírus demandam alto custo; requerem instalações complexas e mão de obra qualificada. Ensaios clínicos amparados por esses resultados pré-clínicos permitirão padronizar ensaios e protocolos para testar possíveis intervenções preventivas e terapêuticas para conter o avanço da infecção pelo SARS-CoV-2 entre humanos.

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, K. G. *et al.* The proximal origin of Sars-CoV-2. *Nature medicine*, v. 26, n. 4, p. 450-452, 2020. DOI 10.1038/s41591-020-0820-9.

BANACH, M. *et al.* Brief recommendations on the management of adult patients with familial hypercholesterolemia during the Covid-19 pandemic. *Pharmacological research*, v. 158, p. 104.891, 2020. DOI 10.1016/j.phrs.2020.104891.

BAO, L. *et al.* The pathogenicity of Sars-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. *Nature*, v. 583, n. 7818, p. 830-833, 2020. DOI 10.1038/s41586-020-2312-y 2.

BERBERT, L. R. *et al.* Biomodelos e a covid-19: estado da arte e tendências de uso. *RESBCAL*, São Paulo, v. 8 n.1, p. 19-32, 2020.

BROOK, C. E. *et al.* Accelerated viral dynamics in bat cell lines, with implications for zoonotic emergence. *Elife*, v. 9, p. e48.401, 2020. DOI 10.7554/eLife.48401.

CHAN, J. F.-W. *et al.* Simulation of the clinical and pathological manifestations of Coronavirus Disease 2019 (Covid-19) in a golden Syrian hamster model: implications for disease pathogenesis and transmissibility. *Clinical Infectious Diseases*, v. 71, n. 9, p. 2.428-2.446, 2020a. DOI 10.1093/cid/ciaa325

CHAN, J. F.-W. *et al.* Surgical mask partition reduces the risk of noncontact transmission in a golden Syrian hamster model for Coronavirus Disease 2019 (Covid-19). *Clinical Infectious Diseases*, v. 71, n. 16, p. 2.139-2.149, 2020b. DOI 10.1093/cid/ciaa644.

CHANDRASHEKAR, A. *et al.* Sars-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques. *Science*, v. 369, n. 6.505, p. 812-817, 2020. DOI 10.1126/science.abc4776.

CHU, H. *et al.* Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of Sars-CoV-2 and Sars-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of Covid-19: an observational study. *The Lancet Microbe*, v. 1, n. 1, p. e14-e23, 2020. DOI 10.1016/S2666-5247(20)30004-5.

CLEARY, S. J. *et al.* Animal models of mechanisms of Sars-CoV-2 infection and Covid-19 pathology. *British journal of pharmacology*, v. 177, n. 21, p. 4851-4865, 2020. DOI 10.1111/bph.15143.

CODE OF PRACTICE FOR THE SAFETY, HEALTH AND WELFARE AT WORK(BIOLOGICAL AGENTS). *Regulations 2013 and 2020 (S.I. n. 572 of 2013 as amended by S.I. n. 539 of 2020)*. Disponível em: https://www.hsa.ie/eng/publications_and_forms/publications/biological_agents/cop_biological_agents_2020.pdf. Acesso em: 30 abr. 2021.

COLAVITA, F. *et al.* Sars-CoV-2 isolation from ocular secretions of a patient with COVID-19 in Italy with prolonged viral RNA detection. *Annals of Internal Medicine*, v. 173, n. 3, p. 242-243, 2020. DOI 10.7326/M20-1176.

COSTELA-RUIZ, V. J. *et al.* SARS-CoV-2 infection: the role of cytokines in COVID-19 disease. *Cytokine & growth factor reviews*, 2020.

CORBETT, K. S. *et al.* Evaluation of the mRNA-1273 vaccine against Sars-CoV-2 in nonhuman primates. *New England Journal of Medicine*, v. 383, n. 16, p. 1544-1555, 2020. DOI 10.1056/NEJMoa2024671.

DENG, W. *et al.* Primary exposure to Sars-CoV-2 protects against reinfection in rhesus macaques. *Science*, v. 369, n. 6,505, p. 818-823, 2020. DOI 10.1126/science.abc5343.

DIAS, H. G. *et al.* Neutralizing antibodies for Sars-CoV-2 in stray animals from Rio de Janeiro, Brazil. *Plos one*, v. 16, n. 3, p. e0248578, 2021. DOI 10.1371/journal.pone.0248578.

DINNON, K. H. *et al.* A mouse-adapted Sars-CoV-2 model for the evaluation of Covid-19 medical countermeasures. *BioRxiv*, 2020. DOI 10.1101/2020.05.06.081497.

ENKIRCH, T.; VON MESSLING, V. Ferret models of viral pathogenesis. *Virology*, v. 479, p. 259-270, 2015. DOI 10.1016/j.virol.2015.03.017.

FENG, Liqiang *et al.* An adenovirus-vectored Covid-19 vaccine confers protection from Sars-COV-2 challenge in rhesus macaques. *Nature communications*, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2020. DOI 10.1038/s41467-020-18077-5.

FINCH, C. L. *et al.* Characteristic and quantifiable Covid-19-like abnormalities in CT-and PET/CT-imaged lungs of Sars-CoV-2-infected crab-eating macaques (*Macaca fascicularis*). *bioRxiv*, 2020. DOI 10.1101/2020.05.14.096727.

GALLO, O. *et al.* The central role of the nasal microenvironment in the transmission, modulation, and clinical progression of Sars-CoV-2 infection. *Mucosal immunology*, p. 1-12, 2020.

GRETEBECK, L. M.; SUBBARAO, Kanta. Animal models for Sars and Mers coronaviruses. *Current opinion in virology*, v. 13, p. 123-129, 2015. DOI 10.1016/j.coviro.2015.06.009.

- GUEBRE-XABIER, M. *et al.* NVX-CoV2373 vaccine protects cynomolgus macaque upper and lower airways against Sars-CoV-2 challenge. *Vaccine*, v. 38, n. 50, p. 7.892-7.896, 2020. DOI 10.1016/j.vaccine.2020.10.064.
- GUPTA, A. *et al.* Extrapulmonary manifestations of Covid-19. *Nature medicine*, v. 26, n. 7, p. 1.017-1.032, 2020. DOI 10.1038/s41591-020-0968-3.
- HABTEMARIAM, S. *et al.* Should we try the antiinflammatory natural product, celastrol, for Covid-19? *Phytotherapy Research*, 2020. DOI 10.1002/ptr.6711.
- HAMER, S. A. *et al.* Sars-CoV-2 B. 1.1. 7 variant of concern detected in a pet dog and cat after exposure to a person with Covid-19, USA. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2021.
- HASSAN, A. O. *et al.* A Sars-CoV-2 infection model in mice demonstrates protection by neutralizing antibodies. *Cell*, v. 182, n. 3, p. 744-753. e4, 2020. DOI 10.1016/j.cell.2020.06.011.
- HE, J. *et al.* Molecular mechanism of evolution and human infection with Sars-CoV-2. *Viruses*, v. 12, n. 4, p. 428, 2020. DOI 10.3390/v12040428.
- HUANG, S-W. *et al.* Assessing the application of a pseudovirus system for emerging Sars-CoV-2 and re-emerging avian influenza virus H5 subtypes in vaccine development. *Biomedical Journal*, v. 43, n. 4, p. 375-387, 2020.
- IMAI, M. *et al.* Syrian hamsters as a small animal model for Sars-CoV-2 infection and countermeasure development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 117, n. 28, p. 16587-16595, 2020. DOI 10.1073/pnas.2009799117.
- ISRAELOW, B. *et al.* Mouse model of Sars-CoV-2 reveals inflammatory role of type I interferon signaling. *Journal of Experimental Medicine*, v. 217, n. 12, 2020. DOI 10.2139/ssrn.3628297.
- JIANG, R-D *et al.* Pathogenesis of Sars-CoV-2 in transgenic mice expressing human angiotensin-converting enzyme 2. *Cell*, v. 182, n. 1, p. 50-58. e8, 2020. DOI 10.1016/j.cell.2020.05.027.
- JOYNER, M. J. *et al.* Convalescent plasma antibody levels and the risk of death from covid-19. *New England Journal of Medicine*, 2021. DOI 10.1056/NEJMoa2031893.
- KIM, Y. *et al.* Infection and rapid transmission of Sars-CoV-2 in ferrets. *Cell host & microbe*, 2020. DOI 10.1016/j.chom.2020.03.023.

LE BRAS, A. Sars-CoV-2 causes Covid-19-like disease in cynomolgus macaques. *Lab Animal*, v. 49, n. 6, p. 174-174, 2020. DOI 10.1038/s41684-020-0571-8.

LE, T. T. *et al.* The Covid-19 vaccine development landscape. *Nat Rev Drug Discov*, v. 19, n. 5, p. 305-306, 2020. DOI 10.1038/d41573-020-00073-5.

LI, M-Y. *et al.* Expression of the Sars-CoV-2 cell receptor gene ACE2 in a wide variety of human tissues. *Infectious Diseases of Poverty*, v. 9, p. 1-7, 2020a. DOI 10.1186/s40249-020-00662-x.

LI, Y. *et al.* Physiological and pathological regulation of ACE2, the Sars-CoV-2 receptor. *Pharmacological Research*, p. 104.833, 2020b. DOI 10.1016/j.phrs.2020.104833.

LU, S. *et al.* Comparison of nonhuman primates identified the suitable model for Covid-19. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2020. DOI 10.1038/s41392-020-00269-6.

LU, S. *et al.* Effective treatment of Sars-CoV-2-infected rhesus macaques by attenuating inflammation. *Cell Research*, v. 31, n. 2, p. 229-232, 2021. DOI 10.1038/s41422-020-00414-4.

LUTZ, C. *et al.* Covid-19 preclinical models: human angiotensin-converting enzyme 2 transgenic mice. *Human Genomics*, v. 14, p. 1-11, 2020. DOI 10.1186/s40246-020-00272-6.

MA, Y. *et al.* Sars-CoV-2 infection aggravates chronic comorbidities of cardiovascular diseases and diabetes in mice. *Animal Models and Experimental Medicine*, v. 4, n. 1, p. 2-15, 2021. DOI 10.1002/ame2.12155.

MALIK, Y. A. Properties of coronavirus and SARS-CoV-2. *The Malaysian Journal of Pathology*, v. 42, n. 1, p. 3-11, 2020.

MERCADO, N. B. *et al.* Single-shot Ad26 vaccine protects against Sars-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature*, v. 586, n. 7.830, p. 583-588, 2020. DOI 10.1038/s41586-020-2607-z.

NEWMAN, A. *et al.* First reported cases of Sars-CoV-2 infection in companion animals - New York, March/April 2020. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 69, n. 23, p. 710, 2020.

NATIONAL HEALTH AND MEDICAL RESEARCH COUNCIL (AUSTRALIA); AUSTRALIAN RESEARCH COUNCIL. Australian code for the care and use of

animals for scientific purposes. *National Health and Medical Research Council*, 2013. Disponível em: <https://www.nhmrc.gov.au/about-us/publications/australian-code-care-and-use-animals-scientific-purposes>. Acesso em: 30 jan. 2021.

NIE, J. *et al.* Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for Sars-CoV-2. *Emerging Microbes & Infections*, v. 9, n. 1, p. 680-686, 2020.

RABI, F. A. *et al.* Sars-CoV-2 and coronavirus disease 2019: what we know so far. *Pathogens*, v. 9, n. 3, p. 231, 2020.

RAHIM, R. A.; MUHAMMAD, N. The pursuit of covid-19 animal models. *IJUM Medical Journal Malaysia*, v. 19, n. 2, 2020. DOI 10.31436/imjm.v19i2.1610

RATHNASINGHE, R. *et al.* Comparison of transgenic and adenovirus hACE2 mouse models for Sars-CoV-2 infection. *Emerging Microbes & Infections*, v. 9, n. 1, p. 2.433-2.445, 2020. DOI 10.1080/22221751.2020.1838955.

RICHARD, M. *et al.* Sars-CoV-2 is transmitted via contact and via the air between ferrets. *Nature Communications*, v. 11, n. 1, p. 1-6, 2020. DOI 10.1038/s41467-020-17367-2.

ROCKX, B. *et al.* Comparative pathogenesis of Covid-19, Mers, and Sars in a nonhuman primate model. *Science*, v. 368, n. 6.494, p. 1.012-1.015, 2020. DOI 10.1126/science.abb7314.

SHI, J. *et al.* Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to Sars–coronavirus 2. *Science*, v. 368, n. 6,494, p. 1,016-1.020, 2020a. DOI 10.1126/science.abb7015.

SHI, R. *et al.* A human neutralizing antibody targets the receptor-binding site of Sars-CoV-2. *Nature*, v. 584, n. 7.819, p. 120-124, 2020b. DOI 10.1038/s41586-020-2381-y.

SIA, S. F. *et al.* Pathogenesis and transmission of Sars-CoV-2 in golden hamsters. *Nature*, v. 583, n. 7.818, p. 834-838, 2020. DOI 10.1038/s41586-020-2342-5.

SINGH, A. *et al.* A comprehensive review of animal models for coronaviruses: Sars-CoV-2, Sars-CoV, and Mers-CoV. *Virologica Sinica*, p. 1-15, 2020. DOI 10.1007/s12250-020-00252-z.

SINGH, D. K. *et al.* Responses to acute infection with Sars-CoV-2 in the lungs of rhesus macaques, baboons and marmosets. *Nature Microbiology*, v. 6, n. 1,

p. 73-86, 2021. DOI 10.1038/s41564-020-00841-4.

SOY, M. *et al.* Cytokine storm in Covid-19: Pathogenesis and overview of anti-inflammatory agents used in treatment. *Clinical rheumatology*, v. 39, p. 2085-2094, 2020. DOI 10.1007/s10067-020-05190-5.

SUN, S-H. *et al.* A mouse model of Sars-CoV-2 infection and pathogenesis. *Cell host & microbe*, v. 28, n. 1, p. 124-133. e4, 2020. DOI 10.1016/j.chom.2020.05.020.

SUNGNAK, W. *et al.* Sars-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nature medicine*, v. 26, n. 5, p. 681-687, 2020.

SUREDA, A. *et al.* Endoplasmic reticulum as a potential therapeutic target for covid-19 infection management? *European journal of pharmacology*, v. 882, p. 173.288, 2020. DOI 10.1016/j.ejphar.2020.173288.

UNIVERSITY OF MICHIGAN. *Animal Care & Use program*. 2021. Covid-19: Guiding Principles for Working Safely with Research Animals in the Vivarium. Disponível em: <https://animalcare.umich.edu/announcements/covid-19-guiding-principles-working-safely-research-animals-vivarium>. Acesso em: 30 mar. 2021.

VALLE. S. (org.). *Webgrafia biossegurança em biotérios e laboratórios sobre o vírus Sars-COV-2 (Covid-19)*. 2020. Disponível em: <http://www.epsjv.fiocruz.br/webgrafia-em-biosseguranca-em-bioterios-e-laboratorios-sobre-o-virus-sars-cov-2>. Acesso em: 30 set. 2020.

VAN DOREMALEN, N. *et al.* ChAdOx1 nCoV-19 vaccine prevents Sars-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques. *Nature*, v. 586, n. 7830, p. 578-582, 2020. DOI 10.1038/s41586-020-2608-y.

WANG, Q. *et al.* Structural and functional basis of Sars-CoV-2 entry by using human ACE2. *Cell*, v. 181, n. 4, p. 894-904. e9, 2020. DOI 10.1016/j.cell.2020.03.045.

WOOLSEY, C. *et al.* Establishment of an African green monkey model for Covid-19. *BioRxiv*, 2020. DOI 10.1101/2020.05.17.100289.

WORLD HEALTH ORGANISATION STAFF. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Laboratory Biosafety Manual*. World Health Organization, 2004. Dispo-

nível em: <https://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf?ua=1>. Acesso em: 14 fev. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease 2019 (Covid-19): Interim guidance*, 2020. World Health Organization. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331138>. Acesso em: 30 set. 2020.

YINDA, C. K. *et al.* K18-hACE2 mice develop respiratory disease resembling severe Covid-19. *PLoS Pathogens*, v. 17, n. 1, p. e1009195, 2021. DOI 10.1371/journal.ppat.1009195

YU, J. *et al.* DNA vaccine protection against Sars-CoV-2 in rhesus macaques. *Science*, v. 369, n. 6505, p. 806-811, 2020b. DOI 10.1126/science.abc6284.

YU, P. *et al.* Age-related rhesus macaque models of Covid-19. *Animal Models and Experimental Medicine*, v. 3, n. 1, p. 93-97, 2020a. DOI 10.1002/ame2.12108.

YUAN, L. *et al.* Animal models for emerging coronavirus: progress and new insights. *Emerging Microbes & Infections*, v. 9, n. 1, p. 949-961, 2020. DOI 10.1080/22221751.2020.1764871.

ZHANG, Y.-Z.; HOLMES, E. C. A genomic perspective on the origin and emergence of Sars-CoV-2. *Cell*, v. 181, n. 2, p. 223-227, 2020. DOI 10.1016/j.cell.2020.03.035.

ZHENG, J. *et al.* Covid-19 treatments and pathogenesis including anosmia in K18-hACE2 mice. *Nature*, v. 589, n. 7843, p. 603-607, 2021. DOI 10.1126/10.1038/s41586-020-2943-z.

CAPÍTULO 5 [<doi>10.51996/9788574853994.cap5</doi>](https://doi.org/10.51996/9788574853994.cap5)

MODELOS ANIMAIS PARA O ESTUDO DA SEPSE

*Ayrles Fernanda Brandão da Silva*¹

Resumo: Sepsé é uma disfunção orgânica decorrente de uma resposta desregulada do hospedeiro a uma infecção e consiste em um problema de saúde pública com alta taxa de mortalidade em pacientes hospitalizados. Devido às suas características multifatoriais, a completa compreensão de sua fisiopatologia e a pesquisa de possíveis substâncias terapêuticas necessitam de estudos detalhados em modelos animais. Neste capítulo, serão abordados os modelos de investigação de sepsé, com foco na utilização de ratos e camundongos. Os principais modelos serão brevemente descritos, com foco nas características diferenciais de cada um, bem como em suas vantagens e desvantagens. O discernimento dos modelos possíveis de serem empregados é importante, na escolha do método de estudo que mais se enquadra na pergunta que se deseja responder experimentalmente e para a compreensão mais aprofundada dos fatores envolvidos no processo de sepsé e choque séptico estudado.

Palavras-Chave: Lipopolissacarídeo. *Salmonella* Typhimurium. CLP. Casp.

¹ Pesquisadora na Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil. *E-mail* para correspondência: ayrles-brandao@gmail.com

ANIMAL MODELS FOR SEPSIS STUDY

Abstract: Sepsis is an organ dysfunction resulting from a dysregulated host response to an infection. This syndrome is a public health issue associated with a high mortality rate in hospitalized patients. A complete understanding of sepsis pathophysiology and investigating possible therapeutic substances require detailed studies in animal models. In this chapter, sepsis models will be discussed, highlighting models that use rats and mice. The main models used will be briefly described, focusing on the differential characteristics of each one and their advantages and disadvantages. The knowledge of animal models of sepsis available for research is relevant to both the choice of the study method that best responds experimentally to the question raised and to deepen the understanding of the factors involved in sepsis and septic shock studied.

Keywords: Lipopolysaccharide. *Salmonella* Typhimurium. CLP. CASP.

1 INTRODUÇÃO

Sepsis é definida como uma disfunção orgânica causada por uma resposta desregulada do hospedeiro a um processo infeccioso (KIM; CHOI, 2020; LIN; XU; ZHANG, 2020; MAKIC; BRIDGES, 2018; SINGER *et al.*, 2016). Essa infecção pode ser causada por bactérias, vírus, fungos ou protozoários (MACHADO *et al.*, 2019). A resposta inflamatória associada ao desenvolvimento de disfunção

em um ou mais órgãos e sua progressão para um estado de hipotensão persistente, sem resposta à ressuscitação volêmica e com necessidade de utilização de vasopressores é classificada como choque séptico (MACHADO *et al.*, 2017; 2019; SILVA *et al.*, 2019b).

O termo sepse severa, comumente utilizado em trabalhos mais antigos, foi considerado redundante. Essa e outras mudanças nos conceitos básicos de sepse ocorreram na conferência de consenso (Sepsis-3) da *Society of Critical Care Medicine* com a *European Society of Critical Care Medicine*, em 2016 (SINGER *et al.*, 2016). Entretanto, essas alterações não agradaram a toda a comunidade científica. Uma das justificativas é que, apesar de não haver alteração na abordagem clínica da sepse, há descuido na identificação precoce da patologia e estratificação da gravidade, o que é importante para definir o tratamento.

Ainda, as resoluções da Sepsis-3 passaram a desconsiderar as diferentes expressões fenotípicas da gravidade do choque séptico. Pelo conceito mais recente, as formas de choque vasoplégico e críptico passaram a ser classificadas como sepse e apenas o choque com disóxia é considerado como choque séptico (CARNEIRO; PÓVOA; GOMES, 2017).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a sepse como um problema mundial de saúde, em 2017. Essa enfermidade ocorre com alta frequência em pacientes hospitalizados, causando milhões de mortes por ano em todo o mundo (REINHART *et al.*, 2017). Características gerais do paciente, como idade e sexo,

e características relacionadas à sepse, como local da infecção e número de órgãos com disfunção, são importantes determinantes da mortalidade em pacientes com sepse (MECATTI; MESSIAS; DE OLIVEIRA CARVALHO, 2020; RANZANI *et al.*, 2019).

Segundo Fleischmann *et al.* (2016), o número estimado de casos de sepse no mundo é de 31,5 milhões, com mortalidade estimada em 5,3 milhões de casos ao ano (FLEISCHMANN *et al.*, 2016). Em países considerados de baixa renda, a taxa de mortalidade pode chegar a 80% dos pacientes que desenvolvem sepse (KIM; CHOI, 2020). Um estudo epidemiológico comparativo verificou que a taxa de mortalidade de pacientes hospitalizados com sepse é similar, entre o Brasil e a Inglaterra. Essa taxa é de 41,4%, no Brasil, e de 39,3%, na Inglaterra. Entretanto, o Brasil apresentou maior prevalência de pacientes com características gerais associadas ao alto risco de morte, como idade avançada e comorbidades (RANZANI *et al.*, 2019).

Um estudo observacional denominado de *Spread* (do inglês, *Sepsis Prevalence Assessment Database*) foi realizado em 227 Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), distribuídas em todo o território brasileiro. Foi demonstrado que 30,2% dos leitos das UTIs analisados estavam ocupados por pacientes com sepse ou choque séptico, com uma incidência de sepse estimada em 36,3 casos por 1.000 pacientes-dia no país. A letalidade foi de 50% e 60% nos pacientes com sepse e choque séptico, respectivamente (MACHADO *et al.*, 2017).

Diante da importância dessa disfunção orgânica, neste capítulo, serão abordados os principais modelos de investigação de sepse que utilizam ratos e camundongos. Com isso, objetiva-se fornecer ferramentas para a escolha correta dos métodos experimentais a serem utilizados na pesquisa científica e viabilizar melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da sepse.

2 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE

A sepse inicia-se com a ativação da resposta imune inata pelo reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs, do inglês *Pathogen-associated-molecular patterns*) pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRR, do inglês *Pattern recognition receptors*) nas células do hospedeiro. A família de receptores semelhantes a Toll (TLR, do inglês *Toll-like receptors*) são os principais PRR descritos e capazes de reconhecer proteínas contidas em bactérias, fungos filamentosos e leveduras (COHEN, 2002).

Outros receptores PRRs envolvem as proteínas de reconhecimento de peptídeoglicanos (PGRPs, do inglês *Peptidoglycan-recognition proteins*) (LIU *et al.*, 2001) e os receptores desencadeadores expressos nas células mieloides (TREM-1, do inglês *Triggering receptor expressed on myeloid cells*) (BOUCHON; DIETRICH; COLONNA, 2000).

Com a interação entre o patógeno e as células do hospedeiro, ocorre a ativação de diversas cascatas de sinalização intracelular

e a liberação de mediadores pró e anti-inflamatórios, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina (IL)-1, IL-6 e IL-10. Dessa forma, a sepse apresenta-se inicialmente como um processo inflamatório, com aumento da concentração de mediadores da inflamação. Entretanto, com a progressão da patologia, ocorre uma mudança para um perfil anti-inflamatório, imunossupressor (OBERHOLZER; OBERHOLZER; MOLDAWER, 2001). Vários trabalhos sugerem que as fases pró-inflamatórias e a imunossupressão ocorrem simultaneamente, com intensidades que variam de acordo com as características do hospedeiro e do patógeno (HOTCHKISS; KARL, 2003; HOTCHKISS; MONNERET; PAYEN, 2013).

Durante o desenvolvimento da sepse, há uma falência da migração de neutrófilos para o foco infeccioso, possivelmente devido a uma diminuição do rolamento e da adesão dos neutrófilos nas células endoteliais (ALVES-FILHO *et al.*, 2008; BENJAMIM; FERREIRA; CUNHA, 2000). Essa falência da migração de neutrófilo está combinada com a captura inadequada dessas células nos pulmões (ALVES-FILHO *et al.*, 2008) e é mediada pelos altos níveis de citocinas e quimiocinas que induzem a produção sistêmica de óxido nítrico (ALVES-FILHO *et al.*, 2005, 2008; BENJAMIM; FERREIRA; CUNHA, 2000). A falência na migração também pode ser devida a um aumento dos níveis de proteínas de fase aguda no soro, as quais podem inibir a interação entre o neutrófilo e o endotélio (ALVES-FILHO *et al.*, 2008).

O óxido nítrico é considerado uma molécula com propriedades tanto protetoras como deletérias, dependendo da quantidade

liberada, e responsável pela vasodilatação e pela modulação da adesão de leucócitos e plaquetas no endotélio, e faz parte de todas as fases da defesa do organismo (BOGDAN, 2001). Entretanto, o alto nível de óxido nítrico produzido por macrófagos, neutrófilos, ou outras células ativadas, além de ser tóxico para microrganismos, parasitas e células tumorais, pode induzir à disfunção cardíaca e lesar células saudáveis (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

Segundo Schoenmakers, Reitsma e Spek (2005), o processo de coagulação e o processo inflamatório estão inter-relacionados como parte do sistema imune inato e essa relação é realçada no processo de infecções sistêmicas (SCHOENMAKERS; REITSMA; SPEK, 2005). As citocinas pró-inflamatórias são os principais mediadores envolvidos na ativação da coagulação.

Esses mediadores podem elevar o número de plaquetas, iniciar a coagulação e impedir a fibrinólise (ESMON, 2005). A indução da expressão do fator tecidual por citocinas e endotoxinas, em células endoteliais e mononucleares, ativa uma cascata proteolítica que resulta na conversão de protrombina em trombina, a qual quebra o fibrinogênio, produzindo fibrina (AMARAL; OPAL; VINCENT, 2004; COHEN, 2002).

Além da indução do processo de coagulação, durante a progressão da sepse, a cascata anticoagulante é inibida pelos altos níveis do inibidor do ativador de plasminogênio (AMARAL; OPAL; VINCENT, 2004), o que evita a produção de plasmina a partir do plasminogênio, resultando em mais fibrina e sua reduzida remo-

ção, levando à deposição de fibrina nos vasos sanguíneos e consequente falência de órgãos (COHEN, 2002).

As alterações na microcirculação conduzem a um suprimento de oxigênio inadequado aos tecidos e à disfunção celular. Esse suprimento inadequado, associado à produção de espécies reativas de oxigênio, provoca danos aos órgãos do hospedeiro, com surgimento de disfunções no miocárdio, no endotélio, no fígado e em diversos outros órgãos (MECATTI; MESSIAS; DE OLIVEIRA CARVALHO, 2020). Os danos causados ao fígado se desenvolvem no início do processo infeccioso e estão associados a uma baixa sobrevivência dos pacientes (LIU *et al.*, 2020; RECKNAGEL *et al.*, 2012).

Por ser doença multifatorial, o processo de sepse é uma das situações clínicas mais difíceis de ser reproduzida em modelos animais (MAIER *et al.*, 2004). Vários estudos têm sido realizados para compreender melhor os mecanismos fisiopatológicos da sepse e investigar compostos potencialmente eficazes para o seu tratamento. Assim, várias espécies animais têm sido utilizadas nos estudos.

3 ESPÉCIES ANIMAIS UTILIZADAS NO ESTUDO DA SEPSE

Segundo Chen *et al.* (2019), a escolha da espécie animal ideal deve considerar as características biológicas e a exequibilidade dos experimentos (CHEN; WELTY-WOLF; KRAFT, 2019). Assim, a sepse induzida no animal deve levar a mudanças semelhantes às que ocorrem nos humanos. Essas mudanças incluem o desen-

volvimento dos sintomas característicos da sepse; a ativação de vias moleculares semelhantes às ativadas em humanos; e o desenvolvimento das desordens. Ainda, o modelo animal deve ser adequado à infraestrutura disponível; aos fatores econômicos; e à possibilidade de obter a quantidade de amostra biológica necessária para o estudo.

As primeiras espécies animais utilizadas foram ratos e camundongos (CHEN; WELTY-WOLF; KRAFT, 2019); com a vantagem de ter baixo custo e fácil e rápida procriação. Também têm sido utilizadas técnicas de engenharia genética para a produção de animais geneticamente modificados, de acordo com determinados objetivos, como os animais *knockout*. Essas técnicas permitem o estudo de genes específicos durante o desenvolvimento da sepse.

Esses fatores, dentre outros, fazem com que esses animais continuem sendo os mais utilizados na pesquisa. Entretanto, essa prática apresenta algumas desvantagens, como o pequeno volume de sangue obtido e a dificuldade de monitorar as características hemodinâmicas. Ainda, o perfil de citocinas apresentado por pequenos roedores pode diferir do apresentado por humanos (FINK, 2014).

Animais maiores podem ser utilizados no estudo da sepse, como coelhos, cachorros, ovelhas e porcos, pois superam muitas das limitações observadas no uso experimental de pequenos roedores. Entretanto, diferenças fisiológicas entre esses animais e os humanos ainda são evidentes e podem significativamente alterar

a susceptibilidade ou resistência à sepse induzida (CHEN; WELTY-WOLF; KRAFT, 2019). Ainda, o emprego desses animais na pesquisa gera maior custo e necessita de completa infraestrutura para manutenção e reprodução.

Por fim, modelos que utilizam outros primatas que não o homem, como babuínos, macacos e chimpanzés, foram desenvolvidos para superar as limitações dos modelos apresentados anteriormente (KESHARI *et al.*, 2017; TAYLOR; KINASEWITZ; LUPU, 2012). Esses primatas apresentam anatomia muito semelhante à dos humanos e uma resposta hemodinâmica e inflamatória à sepse induzida similar (HAUDEK *et al.*, 2003).

Além disso, têm sido utilizados no estudo de órgãos específicos, cuja disfunção causada por infecções pode progredir para sepse, como os pulmões e o trato urinário (KRAFT *et al.*, 2014; REYES *et al.*, 2016). Entretanto, o custo de manutenção e reprodução desses animais dificulta a exequibilidade de procedimentos experimentais. O manuseio requer habilidades mais específicas do pesquisador e é extremamente necessário o cuidado com doenças que podem ser transmissíveis ao homem, como a tuberculose e o vírus da herpes B (CHEN; WELTY-WOLF; KRAFT, 2019; ZANOTTI-CAVAZZONI; GOLDFARB, 2009). Por fim, esses animais são mais resistentes às endotoxinas do que os humanos (CHEN; WELTY-WOLF; KRAFT, 2019).

4 MODELOS EXPERIMENTAIS DE SEPSE

Diversos modelos experimentais de indução da sepse têm sido utilizados, na tentativa de compreender melhor as alterações que ocorrem e com vistas a identificar possíveis agentes terapêuticos. Os principais modelos que utilizam pequenos roedores podem ser agrupados em: (i) modelos de indução da sepse por administração de uma toxina, como o lipopolissacarídeo (LPS) e zimosan; (ii) modelos de indução de sepse por administração de patógenos viáveis; e (iii) modelos de sepse induzida pela alteração da barreira protetora endógena do animal, permitindo a translocação bacteriana (BURAS; HOLZMANN; SITKOVSKY, 2005).

4.1 Modelo de Sepse Induzida pela Administração de Lipopolissacarídeo Bacteriano

O LPS é um constituinte da parede celular de bactérias gram-negativas. A administração desse composto induz uma endotoxemia com consequente inflamação sistêmica em camundongos e ratos e é amplamente utilizada para estudar as disfunções observadas durante a sepse (AMORIM *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2020). A administração de LPS em modelos murinos ativa vias metabólicas intracelulares por receptores semelhantes a Toll 4 (TLR4) na superfície de leucócitos (PFALZGRAFF; WEINDL, 2019). Essa ativação estimula a cascata de coagulação e induz um aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias no plasma e baço dos animais.

Dentre essas citocinas, as principais analisadas são o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α); a interleucina-6 (IL-6); e os interferons (IFN) tipo I. Ocorre também um aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 (AMORIM *et al.*, 2020). O LPS também induz a inflamação por mecanismos independentes de TLR4, como pela ativação de receptores intracelulares a Caspase-11 em roedores e a Caspase-4/5 em humanos (CHENG *et al.*, 2017; DENG *et al.*, 2018; PFALZGRAFF; WEINDL, 2019; RATHINAM; ZHAO; SHAO, 2019).

Nesse modelo, também é possível observar alterações hemodinâmicas e termorreguladoras, com diminuição na pressão arterial e aumento da temperatura corporal. Essas mudanças estão associadas a alterações cardiovasculares e disfunções vasculares, com taquicardia, aumento do tônus simpático, diminuição do tônus cardíaco parassimpático e hiporesponsividade vascular a vasoconstritores (AMORIM *et al.*, 2020).

Na indução experimental da sepse, a administração de LPS nos animais pode ser realizada por via endovenosa ou intraperitoneal. Ocorre então o desenvolvimento de uma resposta não letal, ou letal, que é dependente da dose de LPS utilizada, das vias de administração e do peso dos animais. Assim, aconselha-se realizar um experimento de sobrevivência inicial para verificar as doses exatas a serem utilizadas no animal selecionado.

O LPS é reconhecidamente um estimulador do sistema imunológico e amplamente utilizado no estudo das reações inflamatórias decorrentes de um processo infeccioso. Esse modelo é de

simples execução e fácil padronização. Entretanto, diferentemente do que acontece no processo de sepse em humanos, o LPS induz o sistema imunológico de forma rápida e transiente, causando principalmente injúria vascular (CHEN; WELTY-WOLF; KRAFT, 2019). Isso ocorre porque as moléculas administradas podem ser neutralizadas por anticorpos, o que torna o efeito indutor passageiro. Dessa forma, a utilização de uma única toxina pode não refletir por completo o complexo processo de sepse que ocorre em humanos.

4.2 Modelo de Sepse Induzida pela Administração de Bactérias Viáveis

Em outro modelo experimental, são utilizados microrganismos viáveis para a indução da sepse. Diversos patógenos têm sido estudados, como *Salmonella Typhimurium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dentre outros (RUBINS; POMEROY, 1997; SILVA et al., 2019a; SPYROPOULOS et al., 2020). Assim, a resposta imunológica do hospedeiro, gerada a partir da infecção, varia de acordo com o microrganismo utilizado e com os fatores de virulência de cada um, não havendo um mecanismo único. Entretanto, de forma geral, eles induzem uma inflamação sistêmica pela sua capacidade de se multiplicar no hospedeiro e evadir-se da resposta imune gerada.

Segundo Herrero-Fresno e Olsen (2018), *Salmonella enterica serovar Typhimurium* é o principal microrganismo escolhido para o estudo de infecções sistêmicas (HERRERO-FRESNO; OLSEN,

2018). De fato, o uso desse patógeno em infecções experimentais, sua virulência e seu mecanismo de evasão da resposta imune do hospedeiro têm sido extensivamente detalhados (KURTZ; GOGGINS; MCLACHLAN, 2017; LAROCK; CHAUDHARY; MILLER, 2015).

A infecção experimental de camundongos por *Salmonella Typhimurium*, por via intraperitoneal, induz a migração de neutrófilos para o foco infeccioso; alterações nas cascatas de coagulação; modificações no perfil de liberação de citocinas e óxido nítrico; e dano ao fígado e baço dos animais (LIMA-FILHO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2012; RAMOS et al., 2012; SILVA et al., 2016). Mais recentemente, foi demonstrada a consequência dessa infecção na microcirculação, que induz deformações nos eritrócitos, da eritose e da hiperativação das plaquetas, sem alteração da viscosidade total do sangue (SILVA et al., 2019a).

Em pequenos roedores, o grau de severidade da sepse varia de acordo com a dose do patógeno utilizada. As duas principais são a dose letal 100 (DL_{100}) e a dose sub-letal 50 (DL_{50}), que correspondem a uma mortalidade de 100% e 50% dos animais, respectivamente. Por exemplo, em experimentos com camundongos (*Mus musculus*) desafiados com *S. Typhimurium* são utilizadas 10^7 unidades formadoras de colônia (UFC) por mL para uma dose letal e 10^5 UFC/mL para uma dose sub-letal, com mortalidade observada nos primeiros sete dias pós-infecção (MUOTIALA; MÄKELÄ, 1990; SILVA et al., 2016, 2019a).

Esses modelos de indução da sepse, que utilizam bactérias viáveis, requerem habilidades técnicas de microbiologia para o cultivo e preparo das bactérias nas doses corretas. Além disso, apresentam como desvantagem resposta variável, dependendo do microrganismo utilizado, da quantidade de microrganismos inoculada, da via de administração e do modelo animal (CAW-THRAW et al., 2011; BURAS; HOLZMANN; SITKOVSKY, 2005; RUBINS; POMEROY, 1997; SILVA; COHEN, 1992). Dessa forma, é necessária uma padronização inicial do protocolo experimental. Outra desvantagem é que o inóculo de um número elevado de bactérias pode induzir uma intoxicação devido à alta concentração de endotoxinas e não o desenvolvimento de uma infecção (GARRIDO; FIGUEIREDO; SILVA, 2004).

Em contrapartida, esse modelo apresenta a vantagem de induzir uma resposta do hospedeiro à infecção experimental, enquanto no modelo de indução de sepse por administração de uma toxina são observados, principalmente, os efeitos deletérios das citocinas (MAIER et al., 2004).

4.3 Modelos de Sepse Induzidos pela Ruptura da Barreira Protetora Endógena do Animal

Nesses modelos, ocorre a exposição da cavidade estéril do animal a microrganismos, pela indução de material contaminado liberado de compartimentos não estéreis (BURAS; HOLZMANN; SITKOVSKY, 2005). As principais técnicas são o modelo de ligadura

e perfuração do ceco (CLP, do inglês *Caecal ligation and puncture*) e Peritonite por *stent* em cólon ascendente (Casp, do inglês, *Colon ascendent stent peritonitis*).

O modelo de CLP mimetiza a sepse abdominal em humanos induzida por diversas bactérias (CHEN; WELTY-WOLF; KRAFT, 2019). Em termos práticos, essa técnica consiste na realização de uma laparotomia para exposição do ceco. É, então, realizada uma ligadura próxima da válvula ileocecal e a perfuração da porção cecal obstruída. Esse processo leva à liberação, no peritônio, de conteúdo fecal contido no intestino do animal (BURAS; HOLZMANN; SITKOVSKY, 2005). A perfuração realizada pode levar à formação de abscesso para conter a infecção (MAIER *et al.*, 2004).

Esse modelo apresenta algumas desvantagens importantes, pois a resposta induzida pode ser variável, de acordo com a flora microbiana do hospedeiro; o volume de conteúdo fecal extravasado; o número de perfurações realizado; e a espécie animal utilizada. Além disso, devido à possibilidade de formação de abscessos, é possível que uma droga em estudo induza a formação do abscesso e sua ação seja confundida com um efeito no processo de sepse (BURAS; HOLZMANN; SITKOVSKY, 2005).

Entretanto, o perfil de citocinas observado torna esse modelo, e o modelo de Casp, os que mais se assemelham com o observado na sepse em humanos (REMICK *et al.*, 2000; REMICK; WARD, 2005; ZANTL *et al.*, 1998). Por fim, a gravidade do quadro infeccioso pode ser controlada ao alterar o número e tamanho das perfura-

ções feitas. Esse fato permite ampliar o tempo de estudo/sobrevida do animal de poucas horas para dias.

O modelo de Casp também representa um modelo murinho de sepse polimicrobiana, por consistir em um procedimento cirúrgico no qual é realizada uma laparotomia. Um *stent* é então colocado no cólon ascendente para permitir o extravasamento de conteúdo fecal para o peritônio e consequente infecção.

Uma comparação direta entre CLP e Casp foi realizada por Maier *et al.* (2004) e observado que, oito horas após a cirurgia, em ambos os modelos, ocorreu indução de infiltrado neutrofílico na túnica muscular, na serosa e no tecido adiposo circundante do intestino. Entretanto, apenas o modelo de Casp induz um grande acúmulo de infiltrado celular no lúmen. Em análise do fígado, características histológicas de infecção e inflamação foram mais pronunciadas no modelo de Casp do que de CLP.

Ainda, os autores demonstraram que Casp apresenta características de infecção sistêmica, com foco séptico persistente e indução de liberação aumentada de citocinas séricas, com o passar do tempo, principalmente IL-10. Finalmente, verificou-se que o modelo de CLP reflete a formação de abscesso intra-abdominal, enquanto o Casp se assemelha ao processo de peritonite difusa (MAIER *et al.*, 2004).

O modelo de Casp possui a vantagem de ser reprodutível, de acordo com o diâmetro do Stent utilizado, pois a severidade da infecção induzida, refletida na mortalidade dos animais, é diretamente correlacionada ao diâmetro do *stent* (MAIER *et al.*, 2004),

não apresentando tanta variabilidade quanto a que foi observada em CLP. Em oposição, o modelo de Casp necessita de um procedimento cirúrgico mais elaborado, o que demanda uma equipe de profissionais mais especializados.

A Figura 1 resume as principais características dos modelos animais (murinos) antes descritos, com algumas de suas vantagens e desvantagens. Entretanto, uma desvantagem comum à maioria dos modelos animais é que o desenvolvimento da sepse costuma ser rápido e com breve resolução, ou morte rápida do hospedeiro. Devido a esse fator, experimentalmente, o tratamento, geralmente, é realizado antes, ou imediatamente após a indução da sepse. Isso não reflete a prática clínica em que os pacientes iniciam o tratamento dias após o aparecimento dos sintomas (BURAS; HOLZMANN; SITKOVSKY, 2005).

Figura 1 – Diferentes modelos animais para o estudo da sepse. Lipopolissacarídeo (LPS); Modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP); Vantagens (+); Desvantagens (-)



Fonte: Elaborada pela autora.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os modelos animais têm sido desenvolvidos na tentativa de compreender melhor os complexos processos que ocorrem no desenvolvimento da sepse. Conforme demonstrado, há diferenças específicas em cada modelo e em relação ao processo que ocorre em humanos. Esse fato dificulta a descrição de um modelo único como o ideal para o estudo da sepse.

Entretanto, é fato que os modelos experimentais têm permitido uma evolução no conhecimento da fisiopatologia da sepse, bem como na identificação de potenciais compostos a serem utilizados na clínica para minimizar a severidade dessa doença. Para isso, é necessário o entendimento de como cada modelo pode ser utilizado, dentro de suas limitações intrínsecas, e o cuidado na extrapolação da eficácia dos resultados experimentais de animais para humanos.

REFERÊNCIAS

- ALVES-FILHO, J. C. *et al.* Failure of neutrophil migration toward infectious focus in severe sepsis: a critical event for the outcome of this syndrome. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, p. 223-226, 2005. DOI 10.1590/s0074-02762005000900038.
- ALVES-FILHO, J. C. *et al.* The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock*, v. 30, n. 7, p. 3-9, 2008. DOI 10.1097/SHK.0b013e3181818466.
- AMARAL, A.; OPAL, S. M.; VINCENT, Jean-Louis. Coagulation in sepsis. *Intensive Care Medicine*, v. 30, n. 6, p. 1.032-1.040, 2004. DOI 10.1007/s00134-004-2291-8.
- AMORIM, M. R. *et al.* Baroreceptor denervation reduces inflammatory status but worsens cardiovascular collapse during systemic inflammation. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2020. DOI 10.1007/s00134-004-2291-8
- BENJAMIM, C. F.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. d Q. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 182, n. 1, p. 214-223, 2000. DOI 10.1086/315682
- BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology*, v. 2, n. 10, p. 907-916, 2001. DOI 10.1038/ni1001-907.
- BOUCHON, A.; DIETRICH, J.; COLONNA, M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *The Journal of Immunology*, v. 164, n. 10, p. 4991-4995, 2000. DOI 10.4049/jimmunol.164.10.4991.

BURAS, J. A.; HOLZMANN, B.; SITKOVSKY, M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 4, n. 10, p. 854-865, 2005. DOI 10.1038/nrd1854

CARNEIRO, A. H.; PÓVOA, P.; GOMES, J. A. Dear Sepsis-3, we are sorry to say that we don't like you. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, v. 29, n. 1, p. 4-8, 2017. DOI 10.5935/0103-507X.20170002.

CAWTHRAW, S. *et al.* Gene expression profiles induced by Salmonella infection in resistant and susceptible mice. *Microbes and Infection*, v. 13, n. 4, p. 383-393, 2011. DOI 10.1016/j.micinf.2011.01.001.

CHEN, L.; WELTY-WOLF, K. E.; KRAFT, B. D. Nonhuman primate species as models of human bacterial sepsis. *Lab Animal*, v. 48, n. 2, p. 57-65, 2019. DOI 10.1038/s41684-018-0217-2.

CHENG, K. T. *et al.* Caspase-11-mediated endothelial pyroptosis underlies endotoxemia-induced lung injury. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 127, n. 11, p. 4.124-4.135, 2017. DOI 10.1172/JCI94495.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, v. 420, n. 6917, p. 885-891, 2002. DOI 10.1038/nature01326.

DENG, M. *et al.* The endotoxin delivery protein HMGB1 mediates caspase-11-dependent lethality in sepsis. *Immunity*, v. 49, n. 4, p. 740-753. e7, 2018. DOI 10.1016/j.immuni.2018.08.016.

ESMON, C. T. The interactions between inflammation and coagulation. *British Journal of Haematology*, v. 131, n. 4, p. 417-430, 2005. DOI 10.1111/j.1365-2141.2005.05753.x

FINK, M. P. Animal models of sepsis. *Virulence*, v. 5, n. 1, p. 143-153, 2014. DOI 10.4161/viru.26083

FLEISCHMANN, C. *et al.* Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. Current estimates and limitations. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 193, n. 3, p. 259-272, 2016. DOI 10.1164/rccm.201504-0781OC.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: O simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000. DOI 10.1590/s0104-42302000000300012.

GARRIDO, A. G. *et al.* Experimental models of sepsis and septic shock: An overview. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 19, n. 2, p. 82-88, 2004. DOI 10.1590/s0102-86502004000200001.

HAUDEK, S. B. *et al.* Lipopolysaccharide dose response in baboons. *Shock*, v. 20, n. 5, p. 431-436, 2003. DOI 10.1097/01.shk.0000090843.66556.74.

HERRERO-FRESNO, A; OLSEN, J. E. Salmonella Typhimurium metabolism affects virulence in the host - A mini-review. *Food Microbiology*, v. 71, p. 98-110, 2018. DOI 10.1016/j.fm.2017.04.016

HOTCHKISS, R. S.; KARL, I. E. The pathophysiology and treatment of sepsis. *New England Journal of Medicine*, v. 348, n. 2, p. 138-150, 2003. DOI 10.1056/NEJMra021333.

HOTCHKISS, R. S.; MONNERET, G.; PAYEN, D. Sepsis-induced immunosuppression: From cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, v. 13, n. 12, p. 862-874, 2013. DOI 10.1038/nri3552.

KESHARI, R. S. *et al.* Inhibition of complement C5 protects against organ failure and reduces mortality in a baboon model of Escherichia coli sepsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 114, n. 31, p. E6390-E6399, 2017. DOI 10.1073/pnas.1706818114.

KIM, M-H.; CHOI, J.-H. An update on sepsis biomarkers. *Infection & Chemotherapy*, v. 52, n. 1, p. 1-18, 2020. DOI 10.3947/ic.2020.52.1.1

KRAFT, B. D. *et al.* Development of a novel preclinical model of pneumococcal pneumonia in nonhuman primates. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 50, n. 5, p. 995-1004, 2014. DOI 10.1165/rcmb.2013-0340OC.

KURTZ, J. R.; GOGGINS, J. A.; MCLACHLAN, J. B. Salmonella infection: Interplay between the bacteria and host immune system. *Immunology letters*, v. 190, p. 42-50, 2017. DOI 10.1016/j.imlet.2017.07.006.

LAROCK, D. L.; CHAUDHARY, A.; MILLER, S. I. Salmonellae interactions with host processes. *Nature Reviews Microbiology*, v. 13, n. 4, p. 191-205, 2015. DOI 10.1038/nrmicro3420.

LI, W. *et al.* LPS induces active HMGB1 release from hepatocytes into exosomes through the coordinated activities of TLR4 and caspase-11/GSD-

MD signaling. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 229, 2020. DOI 10.3389/fimmu.2020.00229.

LIMA-FILHO, J. V. *et al.* Proteins from latex of *Calotropis procera* prevent septic shock due to lethal infection by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 129, n. 3, p. 327-334, 2010. DOI 10.1016/j.jep.2010.03.038.

LIN, Y.; XU, Y; ZHANG, Z. Sepsis-Induced Myocardial Dysfunction (SIMD): The pathophysiological mechanisms and therapeutic strategies targeting mitochondria. *Inflammation*, p. 1-17, 2020. DOI 10.1007/s10753-020-01233-w.

LIU, C. *et al.* Peptidoglycan recognition proteins a novel family of four human innate immunity pattern recognition molecules. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 37, p. 34686-34694, 2001. DOI 10.1074/jbc.M105566200.

LIU, J. *et al.* HSPA12A attenuates lipopolysaccharide-induced liver injury through inhibiting caspase-11-mediated hepatocyte pyroptosis via PGC-1 α -dependent acyl-CoA oxidase expression. *Cell Death & Differentiation*, p. 1-17, 2020. DOI 10.1038/s41418-020-0536-x.

MACHADO, F. R. *et al.* The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, Spread): An observational study. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 17, n. 11, p. 1180-1189, 2017. DOI 10.1016/S1473-3099(17)30322-5.

MACHADO, F. R. *et al.* Roteiro de implementação de protocolo assistencial gerenciado de sepse. Programa de melhoria de qualidade. *Instituto Latino Americano de Sepse*, v. 5, p. 39, 2019.

MAIER, S. *et al.* Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock*, v. 21, n. 6, p. 505-512, 2004. DOI 10.1097/01.shk.0000126906.52367.dd.

MAKIC, M. B. F.; BRIDGES, E. C. E. Managing sepsis and septic shock: current guidelines and definitions. *AJN The American Journal of Nursing*, v. 118, n. 2, p. 34-39, 2018. DOI 10.1097/01.NAJ.0000530223.33211.f5.

MECATTI, G. C.; MESSIAS, M. C. F.; CARVALHO, P. de O. Lipidomic profile and candidate biomarkers in septic patients. *Lipids in Health and Disease*, v. 19, p. 1-9, 2020. DOI 10.1186/s12944-020-01246-2.

MUOTIALA, A.; MÄKELÄ, P. H. The role of IFN- γ in murine *Salmonella typhimurium* infection. *Microbial Pathogenesis*, v. 8, n. 2, p. 135-141, 1990. DOI 10.1016/0882-4010(90)90077-4.

OBERHOLZER, A.; OBERHOLZER, C.; MOLDAWER, L. L. Sepsis syndromes: Understanding the role of innate and acquired immunity. *Shock* (Augusta, Ga.), v. 16, n. 2, p. 83-96, 2001. DOI 10.1097/00024382-200116020-00001.

OLIVEIRA, R. SB *et al.* Inflammation induced by phytoimmunomodulatory proteins from the latex of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) protects against *Salmonella* infection in a murine model of typhoid fever. *Inflammation Research*, v. 61, n. 7, p. 689-698, 2012. DOI 10.1007/s00011-012-0460-8.

PFALZGRAFF, A.; WEINDL, G. Intracellular lipopolysaccharide sensing as a potential therapeutic target for sepsis. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 40, n. 3, p. 187-197, 2019. DOI 10.1016/j.tips.2019.01.001.

RAMOS, M. V. *et al.* Proteins derived from latex of *C. procera* maintain coagulation homeostasis in septic mice and exhibit thrombin- and plasmin-like activities. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 385, n. 5, p. 455-463, 2012. DOI 10.1007/s00210-012-0733-3.

RANZANI, O. T. *et al.* A comparison of mortality from sepsis in Brazil and England: The impact of heterogeneity in general and Sepsis-Specific patient characteristics. *Critical Care Medicine*, v. 47, n. 1, p. 76-84, 2019. DOI 10.1097/CCM.0000000000003438.

RATHINAM, V. AK; ZHAO, Yue; SHAO, F. Innate immunity to intracellular LPS. *Nature Immunology*, v. 20, n. 5, p. 527-533, 2019. DOI 10.1038/s41590-019-0368-3.

RECKNAGEL, P. *et al.* Liver dysfunction and phosphatidylinositol-3-kinase signalling in early sepsis: experimental studies in rodent models of peritonitis. *PLoS medicine*, v. 9, n. 11, 2012. DOI 10.1371/journal.pmed.1001338.

REINHART, K. *et al.* Recognizing sepsis as a global health priority - a WHO resolution. *New England Journal of Medicine*, v. 377, n. 5, p. 414-417, 2017. DOI 10.1056/NEJMp1707170.

REMICK, D. G. *et al.* Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: Lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture.

re. *Shock* (Augusta, Ga.), v. 13, n. 2, p. 110-116, 2000. DOI 10.1097/00024382-200013020-00004.

REMICK, D. G.; WARD, P. A. Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis. *Shock*, v. 24, p. 7-11, 2005. DOI 10.1097/01.shk.0000191384.34066.85.

REYES, L. F. *et al.* A non-human primate model of severe pneumococcal pneumonia. *PloS One*, v. 11, n. 11, 2016. DOI 10.1371/journal.pone.0166092.

RUBINS, J. B.; POMEROY, C. Role of gamma interferon in the pathogenesis of bacteremic pneumococcal pneumonia. *Infection and Immunity*, v. 65, n. 7, p. 2975-2977, 1997. DOI 10.1128/iai.65.7.2975-2977.1997

SCHOENMAKERS, S. H. H. F.; REITSMA, P. H.; SPEK, C. Arnold. Blood coagulation factors as inflammatory mediators. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, v. 34, n. 1, p. 30-37, 2005. DOI 10.1016/j.bcmed.2004.09.001.

SILVA, A. F. B. *et al.* Comparison of immunomodulatory properties of manno-se-binding lectins from *Canavalia brasiliensis* and *Cratylia argentea* in a mice model of *Salmonella* infection. *International Immunopharmacology*, v. 31, p. 233-238, 2016. DOI 10.1016/j.intimp.2015.12.036.

SILVA, A. F. B. *et al.* Erythrocytes morphology and hemorheology in severe bacterial infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 114, 2019a. DOI 10.1590/0074-02760190326.

SILVA, A. T.; COHEN, J. Role of interferon- γ in experimental gram-negative sepsis. *Journal of Infectious Diseases*, v. 166, n. 2, p. 331-335, 1992. DOI 10.1093/infdis/166.2.331.

SILVA, E. P. da *et al.* Survival analysis of patients with sepsis in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 52, 2019b. DOI 10.1590/0037-8682-0121-2019b.

SINGER, M. *et al.* The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *Jama*, v. 315, n. 8, p. 801-810, 2016. DOI 10.1001/jama.2016.0287.

SPYROPOULOS, V. *et al.* Initial immune response in *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albicans* Bacteremia. *Inflammation*, v. 43, n. 1, p. 179-190, 2020. DOI 10.1007/s10753-019-01108-9.

TAYLOR JR, F. B.; KINASEWITZ, G. T.; LUPU, F.. Pathophysiology, staging and therapy of severe sepsis in baboon models. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 16, n. 4, p. 672-682, 2012. DOI 10.1111/j.1582-4934.2011.01454.x.

ZANOTTI-CAVAZZONI, S. L.; GOLDFARB, R. D. Animal models of sepsis. *Critical Care Clinics*, v. 25, n. 4, p. 703-719, 2009. DOI 10.1016/j.ccc.2009.08.005

ZANTL, N. *et al.* Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis. *Infection and Immunity*, v. 66, n. 5, p. 2.300-2.309, 1998. DOI 10.1128/IAI.66.5.2300-2309.1998

CAPÍTULO 6 <doi>10.51996/9788574853994.cap6</doi>

MODELOS ANIMAIS DE INVESTIGAÇÃO COM DOENÇAS METABÓLICAS

*Marisa Jadna Silva Frederico*¹

*Eduardo Rochete Ropelle*²

*Dennys Esper Cintra*³

Resumo: Modelos animais têm desempenhado, historicamente, papel crítico na exploração e caracterização da fisiopatologia das doenças e identificação de alvos, bem como na avaliação de novos agentes e tratamentos terapêuticos *in vivo*. O diabetes *mellitus* consiste em um grupo de distúrbios metabólicos caracterizados pela hiperglicemia. Para evitar complicações tardias do diabetes e os custos relacionados, são necessários prevenção primária e tratamento precoce. Devido a seus sintomas crônicos, novas estratégias de tratamento precisam ser desenvolvidas, considerando a eficácia limitada das terapias atuais. Neste capítulo, consta uma visão geral das características fisiopatológicas do diabetes tipo 1, do tipo 2 e da obesidade derivada de suas complicações, em modelos

1 Universidade Federal do Ceará (UFC), Faculdade de Medicina, Departamento de Farmacologia e Fisiologia, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), Laboratório de Farmacologia Bioquímica, Fortaleza, CE, Brasil. **E-mail para correspondência:** marisafrederico@ufc.br

2 Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas, Laboratório de Biologia Molecular do Exercício, Limeira, SP, Brasil.

3 Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas, Laboratório de Genômica Nutricional, Limeira, SP, Brasil.

animais, utilizando camundongos ou ratos. Os modelos apresentados são ratos diabéticos não obesos (NOD); diabéticos induzidos quimicamente e por dieta; camundongo *Swiss* como modelo não genético de obesidade; e, por último, modelo genético de obesidade com camundongos ObR. O uso desses modelos não é isento de limitações, portanto as vantagens e desvantagens com as principais aplicações desses modelos animais de doença metabólica foram abordadas nesta revisão.

Palavras-Chave: Diabetes. Obesidade. Medicina translacional. Modelos animais.

ANIMAL MODELS RESEARCH FOR METABOLIC DISEASES

Abstract: Animal models have historically played a vital role in the characterization of the pathophysiology of diseases, identification of targets, and evaluation of new agents and treatments in vivo. Diabetes mellitus consists of a group of metabolic disorders characterized by hyperglycemia. To avoid late complications of diabetes and related costs, primary prevention and early treatment are necessary. Due to their chronic symptoms, new treatment strategies need to be developed, considering the limited efficacy of the current therapies. This chapter presents an overview of the pathophysiological characteristics of type 1 and type 2 diabetes and obesity concerning their complications in animal models using mice or rats. The models shown are non-obese

diabetic rats (NOD), chemically and diet-induced diabetic rats, a non-genetic model of obesity with *Swiss* mice, and a genetic model of obesity with *ObR* mice. Since all experimental models possess limitations, the advantages and disadvantages of these animal models' main applications for metabolic diseases have also been addressed herein.

Keywords: Diabetes. Obesity. Translational medicine. Animal models.

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes Melito ou *Mellitus* (DM) é um dos mais importantes problemas de saúde mundial. Estima-se que quase metade de todas as pessoas (49,7%) que vive com diabetes não seja diagnosticada. Além disso, existem 374 milhões de pessoas com tolerância à glicose diminuída. No ano de 2017, em todo o mundo, havia 451 milhões de pessoas com diabetes, entre 18 e 99 anos, tendo sido registradas, nesse mesmo ano, aproximadamente 5 milhões de mortes no mundo atribuídas à doença. O gasto global em saúde com pessoas com a doença, nessa faixa etária e nesse ano, foi estimado em US\$ 850 bilhões. Projeta-se que a incidência de pessoas com diabetes aumente para 693 milhões, até 2045 (CHO *et al.*, 2018).

A obesidade já é considerada epidemia mundial, independentemente das condições econômicas e sociais. A obesidade é um fator de risco significativo para o desenvolvimento do Diabetes

Melito tipo 2 (DM2), que pode gerar impacto negativo sobre a sua progressão e tratamento, levando a um aumento da morbidade e mortalidade entre pacientes obesos com diabetes (LIVINGSTON; KO, 2005). Embora nem todos os indivíduos obesos desenvolvam diabetes *nem* todos os indivíduos diabéticos sejam obesos, a prevalência do excesso de peso ou obesidade entre adultos diabéticos corresponde a 85% (HARRINGTON *et al.*, 2015).

O DM é uma doença metabólica crônica caracterizada por uma falta relativa, ou absoluta, de insulina, resultando em hiperglicemia. Uma variedade de complicações surge da hiperglicemia crônica, como nefropatia, neuropatia, retinopatia e aumento do risco de doenças cardiovasculares.

A classificação do DM, atualmente, está baseada na etiologia da doença e a divide clinicamente em: (1) DM tipo 1 (DM1), deficiência de insulina por destruição autoimune das células β ou de natureza idiopática; (2) DM2, em que ocorre a perda progressiva de secreção insulínica combinada com resistência à insulina; (3) DM gestacional, em que a hiperglicemia de graus variados é diagnosticada durante a gestação, na ausência de critérios de DM prévio; e (4) outros tipos de DM, como: monogênicos tipo Mody (do inglês, *Maturity-onset diabetes of the young*; diabetes neonatal; secundário a endocrinopatias ou a doenças do pâncreas exócrino; ou a infecções ou medicamentos (CARRACHER; MARATHE; CLOSE, 2018).

O DM1 é uma doença complexa que envolve uma combinação de fatores como suscetibilidade genética, desregulação imunológica e exposição a estímulos ambientais. É considerada uma doença

autoimune e sua ocorrência é mais comum em crianças e adultos jovens (HYTTINEN *et al.*, 2003). A triagem preliminar de moléculas antidiabéticas, geralmente, é realizada em modelos animais; no entanto, devido à etiologia complicada, é difícil encontrar o modelo animal preditivo e de analogia com a doença em humanos.

Além disso, os animais usados para estudar o DM1 são altamente endogâmicos, devido aos acasalamentos consistirem na união entre roedores geneticamente semelhantes (consanguinidade). Desse modo, a relevância do modelo para o DM1 em humanos tem sido questionada (PHILLIPS; TRUCCO; GIANNOUKAKIS, 2011).

A deficiência na produção de insulina, no DM1, pode ocorrer por uma variedade de mecanismos diferentes, desde a extirpação química das células beta até o desenvolvimento espontâneo do diabetes autoimune. Por outro lado, o manejo da doença via monitoramento da glicose no sangue e administração exógena de insulina é árduo e dispendioso, o que, paralelamente aos esforços meticulosos para regular a glicose no sangue, pode resultar em eventos de hiper e hipoglicemia associados a comorbidades sistêmicas (BEN NASR *et al.*, 2015; TAO *et al.*, 2010).

O DM2 está associado à resistência à insulina e à falta de compensação adequada pelas células beta, o que leva a uma deficiência relativa de insulina (SOLOMON *et al.*, 2008). No DM2, vários modelos animais foram desenvolvidos para entender a fisiopatologia do diabetes e suas complicações (CALCUTT *et al.*, 2009).

Além disso, vários modelos animais são obesos, refletindo a condição humana em que a obesidade está intimamente ligada ao desenvolvimento do DM2. A maioria desses modelos tende a apresentar anormalidades em um único gene ou em vários genes relacionados à obesidade, intolerância à glicose ou resistência à insulina, levando a altos níveis de glicose no sangue (KAWANO *et al.*, 1999). Esses incluem modelos de resistência à insulina ou insuficiência de células beta.

O crescimento e a progressão das complicações diabéticas são afetados por vários fatores, incluindo obesidade, resistência à insulina, hiperglicemia e hiperlipidemia (CALCUTT *et al.*, 2009). Diversos estudos clínicos e epidemiológicos demonstraram que, na obesidade, o tecido adiposo apresenta um estado de inflamação crônica de baixo grau (FAIN, 2006). A expressão aberrante do fator de necrose tumoral - alfa (TNF- α , do inglês *Tumor necrosis factor*) na obesidade, produzido principalmente pelos adipócitos, interfere na ação da insulina e contribui para o desenvolvimento da resistência à insulina, representando uma ligação entre inflamação, obesidade e resistência à insulina (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1995).

Para os modelos experimentais de DM2, há maior similaridade com a doença em humanos, quando comparados aos modelos do DM1, o que facilita a busca ou o refinamento de alvos terapêuticos. Portanto, ambos os tipos de distúrbios endócrinos representam doenças bastante complexas, com o envolvimento de diferentes sistemas corporais. Nessa base, modelos animais devem ser

cuidadosamente selecionados para investigações sobre diabetes, dependendo de quais aspectos da doença estão sendo estudados.

No Quadro 1, são apresentadas as aplicações dos modelos experimentais de doenças metabólicas DM1, DM2 e de obesidade, com destaque para as principais vantagens e desvantagens de cada modelo. Neste capítulo, é apresentada uma visão geral das características fisiopatológicas do diabetes tipo 1, do tipo 2 e da obesidade em relação às suas complicações em modelos animais utilizando camundongos ou ratos.

Quadro 1 – Principais vantagens e desvantagens e aplicações dos modelos experimentais de doenças metabólicas

Modelo	Vantagens	Desvantagens
Modelo espontâneo NOD (genético)	Modelo para complicações diabéticas, triagem terapêutica de medicamentos candidatos nas várias etapas desta patologia e para o estudo do mecanismo molecular do DM1. Destruição subclínica de células beta anterior ao desenvolvimento dos sintomas do DM1. Sintomas clínicos desenvolvidos de forma abrupta e semelhante ao DM1 (hiperglicemia, poliúria e polidipsia). Modelo para estudar as interações da genética e do ambiente na expressão de doenças em seres humanos (MORDES <i>et al.</i> , 2004)	Momento imprevisível do desenvolvimento da diabetes. Precisa de terapia com insulina para sobreviver a longos períodos.
Modelo induzido por aloxano para DM1 (não genético)	Sintomas clássicos de diabetes humano (hiperglicemia, glicosúria, poliúria, polidipsia e outros). Custos reduzidos	Faixa de dose efetiva muito estreita e facilmente induz à toxicidade renal. Recuperação espontânea, ineficaz para triagem de novas moléculas com potencial anti-diabético

MODELOS ANIMAIS: DA LEGISLAÇÃO À EXPERIMENTAÇÃO CIENTÍFICA

<p>Modelo induzido por (STZ) para DM1 (não genético)</p>	<p>Várias espécies. Versatilidade para DM1 ou DM2. Insulina não necessária (dependente da dose). Custos reduzidos. Fácil de executar. Perda seletiva de células β (STZ/ aloxano); o restante das células das ilhotas permanece intacto. Triagem de novas moléculas antidiabéticas (LUIPPOLD <i>et al.</i>, 2012). Investigação de cardiomiopatia relacionada ao diabetes (BUGGER; ABEL, 2009)</p>	<p>Potencial para efeitos genotóxicos extrapancreáticos. A gravidade do diabetes <i>mellitus</i> varia de acordo com o modelo, com alguma cetose em desenvolvimento.</p>
<p>Modelo induzido por STZ para DM2 associado a dieta rica em gordura (não genético)</p>	<p>Fenótipo da síndrome metabólica associado à depleção gradual das células beta-pancreáticas. Triagem de novas moléculas antidiabéticas análogas das gliptinas (POUCHER <i>et al.</i>, 2012)</p>	<p>Efeitos da STZ podem ser reversíveis. A hiperglicemia é atingida pela destruição das células β. Toxicidade em outros órgãos. Variabilidade no desenvolvimento da hiperglicemia, também por espécie. Não há processos autoimunes</p>
<p>Camundongo Swiss submetido à dieta rica em gordura (não genético)</p>	<p>Múltiplas espécies. Interação genética e ambiental complexa. Semelhante ao homem, resultante da supernutrição e resistência à insulina.</p>	<p>Resposta heterogênea. Hiperglicemia ligeira em animais não modificados geneticamente ou quimicamente induzidos.</p>
<p>Camundongos ObR (genético)</p>	<p>Fenótipo da síndrome metabólica, semelhante à condição humana. O pâncreas também apresenta padrões semelhantes.</p>	<p>Fenótipos altamente endogâmicos e geneticamente determinados a partir de uma mutação monogênica no receptor de leptina. Perda de heterogeneidade humana. Necessita de insulina. Limitado e alto custo</p>

Legenda: diabetes *mellitus* (DM); diabéticos não obesos (NOD); mutante para o receptor de leptina (ObR); estreptozotocina (STZ)

Fonte: Elaborado pelos autores.

2 MODELOS DE DOENÇAS METABÓLICAS

Embora dados humanos sejam necessários para estudar a etiologia do DM1, os modelos espontâneos de roedores são os principais animais utilizados na pesquisa sobre diabetes.

2.1 DM1 Modelos Espontâneos – Camundongos NOD

Os camundongos NOD (do inglês *Non-Obese Diabetic*) apresentam o modelo mais favorecido para o estudo da etiopatogenia do DM1. Semelhante aos seres humanos, alguns animais em linhagens de roedores podem ser diabéticos. Quando esses animais diabéticos são criados seletivamente entre si (consanguinidade), uma porcentagem maior desenvolve diabetes. Esses animais são criados repetidamente, causando um enriquecimento gradual de genes até que atinjam uniformidade nas características genéticas.

Esses modelos mostram semelhanças significativas em loci gênicos; influências ambientais; bem como patogênese da doença em relação ao DM1 humano. Os camundongos NOD mostram os mesmos sintomas clínicos de diabetes (hiperglicemia, poliúria e polidipsia) observados em seres humanos. Além disso, sofrem destruição subclínica de células beta antes dos sintomas do DM surgirem abruptamente, marcando o início do diabetes, e evidenciando uma similaridade genética.

Nos seres humanos e nos ratos NOD, a insulite que inicia o processo da doença é dirigida por células T destrutivas. As células T induzem necrose nas células beta pancreáticas, pela liberação de citocinas inflamatórias, como a interleucina 1 beta (IL-1 β), interferon gama (IFN- γ) e o TNF- α . Foi relatado que uma molécula anti-inflamatória associada à insulina, a Beta-galactosil-ceramida sulfatada (sulfato), parece oferecer proteção contra essa destruição.

Também em camundongos NOD, essa molécula demonstrou inibir o desenvolvimento do diabetes tipo 1 (BUSCHARD, 2011). As semelhanças entre NOD e seres humanos também se estendem a fatores ambientais. Semelhante aos seres humanos, os camundongos NOD apresentam defeitos no desenvolvimento das células T *Natural Killer* (NKT). Além disso, a superexpressão das células NKT impede que os camundongos NOD transgênicos desenvolvam diabetes (ACHARJEE *et al.*, 2013; GOMBERT *et al.*, 1996).

Tanto os seres humanos propensos a diabetes *mellitus* tipo 1 quanto os ratos NOD mostram inflamação subclínica do intestino com exposição a uma dieta de glúten. A inflamação subclínica aumenta o nível de células T efetoras e acelera o processo de desenvolvimento de DM1. As outras semelhanças entre os dois são o rápido início do diabetes *mellitus* tipo 1, a capacidade de resposta à imunomodulação e a suscetibilidade à tireoidite clínica (BUSCHARD, 2011).

Os camundongos NOD também têm limitações severas. Por exemplo, a suscetibilidade à autoimunidade na cepa NOD é influen-

ciada por muitos genes (COPPIETERS; VON HERRATH, 2009). Uma ligeira variação no complexo MHC pode alterar seu perfil de autoimunidade. O NOD H2g7 está ligado ao desenvolvimento do diabetes; contudo, não pode causar diabetes se for transferido para uma espécie diferente.

Para produzir a doença, a espécie precisa de um ambiente genético específico (isto é, Complexo Principal de Histocompatibilidade – MHC, do inglês *Major histocompatibility complex*) com um grande conjunto de genes suscetíveis ao desenvolvimento do DM1). A chance de ter a mesma combinação em seres humanos é quase nula (COPPIETERS; VON HERRATH, 2009).

Além disso, nos seres humanos, a distribuição da doença em ambos os sexos parece ser igual, enquanto, na linhagem NOD, as fêmeas (90%) são mais afetadas do que os machos (50%). Uma dissimilaridade significativa que critica o uso de camundongos NOD como modelo de diabetes *mellitus* tipo 1 é uma resposta imprevisível ao meio ambiente. Observa-se que a infecção pelo vírus pode reduzir a frequência do diabetes e, frequentemente, evitá-lo completamente.

Comparada aos seres humanos, a insulite é iniciada de 4 a 5 semanas antes. Além disso, devido à maior resistência à cetoacidose, o camundongo abertamente diabético NOD (no qual cerca de 90% das células beta pancreáticas são destruídas), pode sobreviver mais tempo do que os seres humanos com um nível semelhante de disfunção pancreática (BRITO-CASILLAS; MELIÁN; WÄGNER, 2016).

2.2 Método Químico Aloxano e Estreptozotocina para DM1 e DM2

A abordagem química da indução de DM1 em roedores envolve a injeção de produtos químicos para destruir especificamente as células beta das ilhotas de Langherans (agentes beta-citotóxicos). Inicialmente, o aloxano foi utilizado como agente beta-citotóxico para induzir sintomas de diabetes em camundongos e ratos.

Os animais tratados com aloxano expressaram os sintomas clássicos de diabetes humano (hiperglicemia, glicosúria, poliúria, polidipsia, e assim por diante) e foram amplamente utilizados na fase inicial da pesquisa no DM1 para induzir diabetes. O aloxano possui uma faixa de dose efetiva muito estreita e facilmente induz a toxicidade renal (GHASEMI; KHALIFI; JEDI, 2014), portanto, raramente é usado. Camundongos tratados com aloxano podem mostrar recuperação espontânea de uma condição diabética crônica, o que torna extremamente difícil a interpretação da eficácia terapêutica de um candidato a fármaco.

A estreptozotocina (STZ) é uma droga antibiótica derivada do *Streptomyces achromogenes* e estruturalmente possui analogia com a nitrosoureia (GHASEMI; KHALIFI; JEDI, 2014). Sua porção nitrosoureia causa danos às células β (SZKUDELSKI, 2012), enquanto a porção desoxiglucose é responsável pelo transporte da molécula nativa através das membranas celulares (GHASEMI; KHALIFI; JEDI, 2014).

Como a STZ usa o transportador de glicose 2 (GLUT2, do inglês *Glucose transporters*) para as células β pancreáticas (SZKUDELSKI, 2012), outros órgãos que expressam esse transportador, como rim, fígado e intestino, também são afetados (DEEDS *et al.*, 2011; GHASEMI; KHALIFI; JEDI, 2014). A STZ danifica as células por alquilação ou quebra de cadeias de DNA (OZTÜRK; ALTAN; YILDIZOĞLU-ARI, 1996). Em uma dose única alta, a STZ causa necrose rápida e maciça de células β , levando ao diabetes tipo 1 (KOLB, 1987).

Além disso, a administração de múltiplas doses baixas de STZ leva a danos parciais das células β , desencadeando um processo inflamatório, que acentua a perda de atividade das células β , um processo que se assemelha muito à patogênese do DM1 (FURMAN, 2015). Existem alterações metabólicas associadas à administração de STZ, geralmente observadas durante as primeiras duas a oito semanas após a exposição (MCNEILL, 2018).

Essas alterações manifestam-se como uma resposta trifásica aguda: (1) há hiperglicemia precoce devida à mobilização de glicogênio hepático entre 2h e 4h, sem aumento concomitante da insulina sérica; (2) hipoglicemia devida ao aumento do nível sérico de insulina entre 6h e 10h; e (3) hiperglicemia permanente que é observada 24 horas após a injeção, caracterizada por diminuição no conteúdo de insulina pancreática, poliúria, glicosúria e hiperglicemia. Embora as doses de STZ possam variar bastante, entre sexo e cepa, doses de STZ > 65 mg/kg são consideradas altas;

40-55mg/kg são moderadas; e < 35 mg/kg são baixas (GHASEMI; KHALIFI; JEDI, 2014).

As baixas doses de STZ causam leve comprometimento da secreção de insulina, que se assemelha mais aos estágios posteriores de DM2 (REED *et al.*, 2000). No entanto, o modelo de baixa dose de STZ não aborda o eixo de resistência à insulina normalmente observado no DM2 (ZHANG, Ming *et al.*, 2009).

Por outro lado, estudos indicaram que os animais alimentados em excesso por uma dieta rica em gordura desenvolveram resistência à insulina (FREDERICO *et al.*, 2011; HAN *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2016). Portanto, a associação de um modelo que incorpore uma dieta rica em gordura para induzir resistência periférica à insulina, seguido de baixa dose de STZ para atingir as células β pancreáticas, mimetiza o fenótipo e a patogênese do DM2 (ASRAFUZZAMAN *et al.*, 2017; REED *et al.*, 2000), tornando-se um excelente modelo de analogia e preditivo para triagem de novos candidatos a fármacos (POUCHER *et al.*, 2012).

2.3 Camundongo *Swiss* como Modelo não Genético de Obesidade

O camundongo SWR/J é popularmente conhecido como *Swiss albinus*, modelo amplamente utilizado em pesquisas. Quando atinge idade avançada, torna-se interessante para investigação de distúrbios pulmonares (BORNSTEIN; IWANAMI, 1971) e, nas fêmeas, há

predisposição aos tumores nas glândulas mamárias (DERINGER, 1970). Ainda, são susceptíveis à encefalomielite alérgica (LEVINE; SOWINSKI, 1973) e, com susceptibilidade intermediária, podem desenvolver aterosclerose, quando estimulados com dieta pró-aterogênica (~14 semanas de tratamento) (KIRK *et al.*, [s.d.]).

Ainda em 1975, um trabalho demonstrou a capacidade desse modelo em desenvolver diabetes tipo *insipidus*, a partir de uma incapacidade metabólica renal, impactando, de forma consecutiva, em sinais clínicos característicos do diabetes, como polidipsia e poliúria (KUTSCHER; MILLER; SCHMALBACH, 1975), e, também, poliúria associada ao envelhecimento (KUTSCHER; MILLER, 1974).

Mas apenas em 1994 esse modelo começou a ser explorado como possível instrumento de investigação de processos associados à obesidade. Para isso, West *et al.* (1994) identificaram *locis* específicos nos cromossomos 9 e 15, que apontavam para a existência de diversos genes candidatos à manifestação fenotípica da obesidade, quando expostos à dieta hiperlipídica (WEST *et al.*, [s.d.]). Assim, esse caráter “poligênico” de associação à obesidade chamou a atenção dos cientistas para o fato de esse animal apresentar comportamento semelhante ao dos seres humanos, no que tange ao desenvolvimento da obesidade.

Atualmente, vem sendo crescente a utilização do camundongo *Swiss* como modelo interessante de obesidade e comorbidades. Isso ocorre devido ao fato de o animal não possuir modificações genéticas artificiais/induzidas, que conferem características aberrantes aos

transgênicos tradicionais. Certamente, há outras vantagens na utilização de modelos transgênicos de obesidade e resistência à insulina, contudo, a existência de um modelo poligênico, que manifesta suas características quando exposto à dieta ocidental, pode mimetizar o processo obesogênico de grande parte da população humana.

Uma linhagem amplamente utilizada no mundo, no intuito de induzir a obesidade, é o clássico camundongo C57BL/6J. Trata-se de um animal do tipo *inbred*, ou isogênico, que acaba por desenvolver a obesidade, mas de forma muito sutil, quando comparado ao camundongo *Swiss*, um animal *outbred*, ou heterogêneo. Bowen *et al.* (2003) compararam essas duas linhagens em diversos aspectos, quando expostos à dieta ocidental, como a resposta de acordo com o gênero, peso, consumo alimentar, estoques adiposos, glicemia e insulina de jejum, leptinemia, entre outros parâmetros (BOWEN; MITCHELL; HARRIS, 2003).

Nesse trabalho, evidenciou-se que os machos de ambas as linhagens foram mais susceptíveis ao desenvolvimento da obesidade do que as fêmeas, quando expostos a dietas ricas em gordura. Ainda, observou-se que o grau de resistência à leptina era muito maior na linhagem *Swiss* do que nos C57BL/6J. Além disso, o depósito de gordura nos coxins adiposos (retroperitoneal, mesentérico e epididimal), glicemia e insulina de jejum reduziam menos nos camundongos *Swiss*, mesmo quando os animais eram tratados com doses diárias de leptina, infundida diretamente no terceiro ventrículo do hipotálamo (BOWEN; MITCHELL; HARRIS, 2003).

Outros resultados interessantes e mais detalhados, do ponto de vista metodológico, reforçam a utilização de camundongos *Swiss* como modelos experimentais de obesidade e resistência à insulina. Em 2014, um estudo comparou a linhagem *Swiss* à linhagem Balb-c, na tentativa de explicar parte da susceptibilidade do camundongo *Swiss* à obesidade (MORARI *et al.*, 2014). Os camundongos do tipo Balb-c foram escolhidos por serem resistentes ao desenvolvimento da obesidade quando expostos a dieta rica em gordura.

No comparativo, após tratamentos por curto prazo (duas semanas) com dieta hiperlipídica, apesar do tempo de tratamento não ter sido suficiente para induzir ganho de peso relevante, foi o bastante para que o grupo de pesquisadores identificasse que o excedente de ácidos graxos saturados oriundos da dieta eram capazes de ativar quimiocinas ainda na circulação.

Apesar de não haver ainda explicação detalhada sobre como ocorre essa ativação inicial, o trabalho foi efetivo em demonstrar que a quimiocina CX3CL1, conhecida como fractalquina, ou fractalkina (em inglês, *fractalkine*), é ativada ainda na circulação e, posteriormente, segue para o sistema nervoso central.

No hipotálamo, a fractalkina foi capaz de sensibilizar e ativar células microgliais residentes, induzindo o início do processo inflamatório que se estende aos neurônios hipotalâmicos, consecutivamente, levando os animais à perda do controle sobre a fome e também sobre o gasto energético (MORARI *et al.*, 2014).

De forma curiosa, mas não surpreendente, camundongos *Swiss*, ao serem tratados com dieta hiperlipídica, manifestam ganho de peso robusto; glicemia alterada em curto intervalo de tempo; entre outras alterações fenotípicas; entretanto, não são todos os animais expostos à dieta que manifestam tais fenótipos. Essa resposta não surpreende, justamente devido ao fato de os animais serem *outbred*, ou seja, heterogêneos. Tais camundongos são heterogêneos do ponto de vista genético, quando comparados uns com os outros da mesma espécie.

Por exemplo, camundongos do tipo C57BL/6J são homogêneos, ou seja, apresentam elevado grau de similaridade entre si, por isso, considerados clones. Nesse sentido, espera-se sempre resposta homogênea quanto à manifestação dos seus fenótipos, o que não é esperado no *Swiss*. De forma prática, se a dieta hiperlipídica for oferecida a 30 camundongos *Swiss*, entre 5 a 8 animais, 8 engordarão de forma exorbitante; 17 ganharão peso de forma significativa; enquanto aproximadamente 5 animais, mesmo expostos à dieta rica em gordura, terão ganho de peso irrelevante. Os números aqui citados são apenas ilustrativos, a fim de mostrar que a distribuição não segue uma curva gaussiana padrão.

Para explicar tais características, em 2016, Souza *et al.*, num elegante trabalho, demonstram os prováveis mecanismos moleculares orquestradores de tais incongruências (SOUZA *et al.*, 2016). Os pesquisadores decidiram estudar as duas extremidades responsáveis à dieta, ou seja, os animais que engordaram de forma

acentuada, comparados aos que não ganharam peso, mesmo sendo alimentados pelo mesmo período, com a mesma dieta.

Notou-se que os animais que ganhavam mais peso apresentavam dificuldade na clivagem do neurotransmissor POMC (pró-opiomelanocortina). A POMC é produzida por neurônios específicos no núcleo arqueado, na base do hipotálamo. São produzidos quando estimulados por hormônios como insulina e leptina. Ao serem produzidos, induzem sinapses que se projetam ao núcleo paraventricular hipotalâmico no intuito de estimularem outros neurotransmissores anorexigênicos. Contudo, sem a correta metabolização (clivagem) da POMC, seus efeitos sacietógenos e ativadores da termogênese não são observados.

No trabalho, demonstrou-se, dessa forma, que existem animais mais e menos propensos à obesidade, mesmo quando membros da mesma espécie. Contudo, a riqueza do modelo constitui-se justamente nesse ponto, pois, quando tais observações são extrapoladas aos humanos, observa-se que nem todos os indivíduos expostos a fatores ambientais, como o sedentarismo e dietas densamente energéticas, desenvolvem ganho de peso. A esse fenômeno, chama-se de “variabilidade genética”, e essa mesma variabilidade naturalmente encontrada nos humanos é também evidenciada no modelo experimental do camundongo *Swiss* (SOUZA *et al.*, 2016). Devido a essas características, esse modelo experimental apresenta preditividade e analogia com a doença em humanos.

2.4 Modelo Genético de Obesidade: Camundongo ObR

Os estudos sobre obesidade que utilizam modelo geneticamente definido (*obob*) foram iniciados ainda na década de 1950 (WOLFF, 1956), contudo, não eram conhecidos detalhes de seus aspectos genéticos. Atribuído à manifestação do fenótipo obeso, o camundongo foi chamado de *obob*, que apresenta uma mutação no receptor de leptina (ObR).

Ao longo da década de 1960, percebeu-se a manifestação de outro fenótipo, a resistência à insulina, o que ampliou enormemente sua utilização experimental como modelo clássico de DM2 (BATT; MIALHE, 1966). Ao longo das décadas seguintes, amplas investigações foram iniciadas para compreensão do modelo.

Em 1973, com apoio de aparato experimental complexo, a chamada parabiose, foi possível evidenciar nesse modelo uma substância capaz de controlar o peso pelo bloqueio do estímulo alimentar. A parabiose é um processo cirúrgico delicado, que une sistemicamente dois organismos, simulando gêmeos siameses, com as circulações venosa e arterial entre os animais interligadas. Após a recuperação do procedimento cirúrgico, os espécimes permanecem vivos e saudáveis.

No início da investigação, camundongos *obob* foram submetidos à parabiose com camundongos normais (eutróficos). Após alguns dias, os camundongos *obob* perderam peso, por reduzirem o ímpeto alimentar, enquanto o eutrófico manteve comportamento

normal. Nesse momento, foi constatado que havia alguma substância no organismo do animal eutrófico que circulou e alcançou a corrente sanguínea do animal obeso, e foi capaz de inibir seu apetite. Além disso, ficou obviamente claro que essa substância possuía receptor no animal *obob*.

Posteriormente, em outro teste de parabiose, camundongos normais foram acoplados a outro tipo de camundongo, também obeso, mas com característica marcante de diabetes, denominados *dbdb*. Surpreendentemente, os camundongos *dbdb* não perderam peso, mas os animais eutróficos perderam peso demais, a ponto de chegarem à inanição. Nessa parte do estudo, ficou claro que a espécie *dbdb* possuía uma substância circulante, de potencial anorexigênico, e em excesso.

Por fim, os pesquisadores realizaram parabiose entre os camundongos *dbdb* e *obob*. O resultado observado foi de redução no peso do animal *obob* e manutenção no peso do *dbdb*. Concluiu-se, portanto, que, de fato, o animal *obob* possuía receptor para a tal substância, e que o *dbdb* possuía a substância em elevada concentração, mas não tinha receptor para ela (COLEMAN, 1973). A partir desse conjunto de interpretações, as investigações subsequentes focaram na descoberta da tal substância e no seu receptor.

Apenas em 1994, o grupo de pesquisadores da Universidade Rockefeller, em Nova York/EUA, liderados por Jeffrey Friedman, conseguiu a real caracterização genética desse modelo experimental, e, consecutivamente, da substância (ZHANG *et al.*, 1994).

O grupo identificou a leptina, cujo nome vem do grego *leptos*, e significa magreza. Identificaram seu posicionamento cromossômico, sua homologia com humanos e a definição como hormônio.

Inicialmente, acreditaram ter descoberto a cura da obesidade, contudo, posteriormente, foi descoberto que o problema da obesidade não era a produção do hormônio, mas sim sua ação em seu receptor; o que torna esse modelo inviável para a busca de novas terapias para o tratamento da obesidade. Apesar da leptina ligar-se corretamente ao seu receptor, a transdução intracelular do seu sinal encontra-se prejudicada pela inflamação associada à obesidade (FREDERICH *et al.*, 1995; MÜNZBERG; MYERS, 2005).

Em resumo, o modelo experimental *obob* tem um padrão genético robusto de obesidade e de resistência à insulina, marcado pela produção incorreta do hormônio no camundongo. Esse modelo possui utilidade para o estudo da patogênese da obesidade e da resistência à insulina. O processo obesogênico pode ser intensificado pela dieta hiperlipídica, com associação de outras comorbidades, como a resistência à insulina (BATT; MIALHE, 1966); estresse de retículo endoplasmático; inflamação sistêmica, de caráter crônico e de baixo grau; neuroinflamação; estresse oxidativo; entre outros desfechos (Z *et al.*, 2020).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Camundongos não obesos diabéticos (NOD) representam o melhor modelo para complicações diabéticas; triagem tera-

pêutica de medicamentos candidatos nas várias etapas dessa patologia; e para o estudo do mecanismo molecular do DM1. Excelente para estudar as interações da genética e do ambiente na expressão de doenças em seres humanos. Apresenta limitações, como desenvolvimento da diabetes em momento imprevisível e a necessidade de terapia com insulina para os animais sobreviverem a longos períodos.

A injeção de produtos químicos para destruir especificamente as células beta das ilhotas de Langerhans, em roedores, apresenta fácil aplicação, baixo custo e sintomas clássicos de diabetes humano. O aloxano possui uma faixa de dose efetiva muito estreita e facilmente induz à toxicidade renal. Além disso, muitos animais apresentam recuperação espontânea, o que torna esse modelo de baixa preditividade para a descoberta de novas drogas.

Por outro lado, a STZ apresenta baixa toxicidade em relação ao aloxano, e pode ser utilizada experimentalmente para mimetizar ambos; DM1 e DM2. Além disso, a STZ associada à dieta rica em gordura é um modelo que apresenta estreita analogia com o DM2 em humanos, tornando-se um modelo de excelência para o estudo da patogênese e a investigação de terapias com potencial antidiabético.

O camundongo *Swiss*, quando exposto à dieta ocidental, mimetiza o processo obesogênico. O modelo apresenta a “variabilidade genética”, naturalmente encontrada nos humanos. Nesse modelo, os animais que ganhavam mais peso apresentavam dificuldade

na clivagem do neurotransmissor POMC (pró-opiomelanocortina), fator que diminuiu a resposta de saciedade. Dessa forma, o modelo torna-se relevante para o estudo do DM2 e terapias farmacológicas.

Nos modelos genéticos de obesidade, os camundongos *ObR* destacam-se para o estudo da patogênese da obesidade e resistência à insulina. O modelo é marcado pela produção incorreta do hormônio leptina em camundongos; o que causa obesidade. Contudo, em humanos, essa causa corresponde a menos de 5% dos problemas de obesidade da população, o que torna o modelo com baixa preditividade para a triagem de novas terapias farmacológicas.

A medicina translacional baseia-se na extrapolação correta dos resultados obtidos nesses modelos animais para o uso em humanos. Dessa forma, o conhecimento específico das características de cada modelo experimental citado pode se tornar ferramenta importante para o desenvolvimento de novas terapias e da prevenção do DM1, DM2 e da obesidade.

REFERÊNCIAS

ACHARJEE, S. *et al.* Understanding type 1 diabetes: Etiology and models. *Canadian Journal of Diabetes*, v. 37, n. 4, p. 269-276, ago. 2013. DOI 10.1016/j.jcjd.2013.05.001.

ASRAFUZZAMAN, M. *et al.* Animal models for assessing the impact of natural products on the aetiology and metabolic pathophysiology of Type 2 diabetes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 89, p. 1.242-1.251, 1^o maio 2017. DOI 10.1016/j.biopha.2017.03.010.

BATT, R.; MIALHE, P. Insulin resistance of the inherently obese mouse - obob [22]. *Nature*, v. 212, n. 5.059, p. 289-290, 1966. DOI 10.1038/212289a0.

BEN NASR, M. *et al.* The rise, fall, and resurgence of immunotherapy in type 1 diabetes. *Pharmacological Research*, v. 98, p. 31-38, ago. 2015. DOI 10.1016/j.phrs.2014.07.004.

BORNSTEIN, M. B.; IWANAMI, H. Experimental allergic encephalomyelitis: Demyelinating activity of serum and sensitized lymph node cells on cultured nerve tissues. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, v. 30, n. 2, p. 240-8, abr. 1971.

BOWEN, H.; MITCHELL, T. D.; HARRIS, R. B. S. Method of leptin dosing, strain, and group housing influence leptin sensitivity in high-fat-fed weanling mice. 2003. DOI 10.1152/ajpregu.00431.2002.-High-fat.

BRITO-CASILLAS, Y.; MELIÁN, C.; WÄGNER, A. M. Study of the pathogenesis and treatment of diabetes mellitus through animal models. *Endocrinología y Nutrición: organo de La Sociedad Espanola de Endocrinología y Nutricion*, v. 63, n. 7, p. 345-353, set. 2016. DOI 10.1016/j.endonu.2016.03.011.

BUGGER, H.; ABEL, E. D. Rodent models of diabetic cardiomyopathy. *Disease Models & Mechanisms*, v. 2, n. 9-10, seq. *Perspective*, p. 454-466, 1 set. 2009. DOI 10.1242/dmm.001941.

BUSCHARD, K. What causes type 1 diabetes? Lessons from animal models. *APMIS*, v. 119, n. s132, p. 1-19, 2011. DOI 10.1111/j.1600-0463.2011.02765.x.

CALCUTT, N. A. *et al.* Therapies for hyperglycaemia-induced diabetic complications: From animal models to clinical trials. *Nature Reviews. Drug Discovery*, v. 8, n. 5, p. 417-429, maio 2009. DOI 10.1038/nrd2476.

CARRACHER, A. M.; MARATHE, P. H.; CLOSE, K. L. International Diabetes Federation 2017. *Journal of Diabetes*, v. 10, n. 5, p. 353-356, maio 2018. DOI 10.1111/1753-0407.12644.

CHO, N. H. *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 138, p. 271-281, 2018. DOI 10.1016/j.diabres.2018.02.023.

COLEMAN, D. L. Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia*, v. 9, n. 4, p. 294-298, ago. 1973. DOI 10.1007/BF01221857.

COPPIETERS, K. T.; VON HERRATH, M. G. Histopathology of type 1 diabetes: old paradigms and new insights. *The Review of Diabetic Studies*: RDS, v. 6, n. 2, p. 85-96, 2009. DOI 10.1900/RDS.2009.6.85.

DEEDS, M. C. *et al.* Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models: *Laboratory Animals*, 1 jul. 2011. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1258/la.2010.010090>. Acesso em: 15 jun. 2020. DOI 10.1258/la.2010.010090.

DERINGER, M. K. Mammary tumors in strains BL-LyDe and SWR-LyDe mice. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 45, n. 2, p. 215-8, ago. 1970.

FAIN, J. N. Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. *Vitam Horm*, v. 74, p. 443-77, 2006. DOI 10.1016/S0083-6729(06)74018-3.

FREDERICH, R. C. *et al.* Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nature Medicine*, v. 1, n. 12, p. 1.311-4, dez. 1995.

FREDERICO, M. J. *et al.* Short-term inhibition of SREBP-1c expression reverses diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, v. 46, n. 11, p. 1.381-1.388, nov. 2011. DOI 10.3109/00365521.2011.613945.

FURMAN, B. L. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Current Protocols in Pharmacology*, v. 70, n. 1, p. 5.47.1-5.47.20, 2015. DOI 10.1002/0471141755.ph0547s70.

GHASEMI, A.; KHALIFI, S.; JEDI, S. Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes (review). *Acta Physiologica Hungarica*, v. 101, n. 4, p. 408-420, dez. 2014. DOI 10.1556/APhysiol.101.2014.4.2.

GOMBERT, J.-M. *et al.* Early quantitative and functional deficiency of NK1+-like thymocytes in the NOD mouse. *European Journal of Immunology*, v. 26, n. 12, p. 2989-2998, 1996. DOI 10.1002/eji.1830261226.

HAN, L. K. *et al.* Platycodi radix affects lipid metabolism in mice with high fat diet-induced obesity. *J Nutr*, v. 130, n. 11, p. 2.760-4, 2000.

HARRINGTON, D. M. *et al.* Cardiometabolic Risk Factor Response to a Lifestyle Intervention: A Randomized Trial. *Metab Syndr Relat Disord*, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25569324>. Acesso em: 01 de julho de 2020. DOI 10.1089/met.2014.0112.

HOTAMISLIGIL, G. S. *et al.* M. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*, v. 95, n. 5, p. 2409-15, 1995. DOI 10.1172/JCI117936.

HYTTINEN, V. *et al.* Genetic liability of type 1 diabetes and the onset age among 22,650 young Finnish twin pairs: a nationwide follow-up study. *Diabetes*, v. 52, n. 4, p. 1.052–1.055, abr. 2003. DOI 10.2337/diabetes.52.4.1052.

KAWANO, K. *et al.* Examination of the pathogenesis of diabetic nephropathy in OLETF rats. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v. 61, n. 11, p. 1.2191.228, nov. 1999. DOI 10.1292/jvms.61.1219.

KIRK, E. A. *et al.* Hyper- and hypo-responsiveness to dietary fat and cholesterol among inbred mice: Searching for level and variability genes. *J Lipid Res.*, v. 36, n. 7, p. 1522-1532, 1995.

KOLB, H. Mouse models of insulin dependent diabetes: Low-dose streptozocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes/Metabolism Reviews*, v. 3, n. 3, p. 751-778, 1987. DOI 10.1002/dmr.5610030308.

KUTSCHER, C. L.; MILLER, D. G. Age-dependent polydipsia in the SWR/J mouse. *Physiology and Behavior*, v. 13, n. 1, p. 71-79, 1974. DOI 10.1016/0031-9384(74)90308-4.

KUTSCHER, C. L.; MILLER, M.; SCHMALBACH, N. L. Renal deficiency associated with diabetes insipidus in the SWR/J mouse. *Physiology and Behavior*, v. 14, n. 6, p. 815-818, 1975. DOI 10.1016/0031-9384(75)90075-X.

LEVINE, S.; SOWINSKI, R. Experimental allergic encephalomyelitis in inbred and outbred mice. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), v. 110, n. 1, p. 139-43, 1 jan. 1973.

LIVINGSTON, E. H.; KO, C. Y. Effect of diabetes and hypertension on obesity-related mortality. *Surgery*, v. 137, n. 1, p. 16-25, 2005. DOI 10.1016/j.surg.2004.05.049.

LUIPPOLD, G. *et al.* Empagliflozin, a novel potent and selective SGLT-2 inhibitor, improves glycaemic control alone and in combination with insulin in streptozotocin-induced diabetic rats, a model of type 1 diabetes mellitus. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, v. 14, n. 7, p. 601-607, 1 jul. 2012. DOI 10.1111/j.1463-1326.2012.01569.x.

MCNEILL, J. H. *Experimental models of diabetes*. [S. l.]: Routledge, 2018. Disponível em: <https://www.taylorfrancis.com/books/9780203756386>. Acesso em: 15 jun. 2020. DOI 10.1201/9780203756386.

MORARI, J. *et al.* Fractalkine (CX3CL1) is involved in the early activation of hypothalamic inflammation in experimental obesity. *Diabetes*, v. 63, 1 nov. 2014. DOI 10.2337/db13-1495.

MORDES, J. P. *et al.* Rat Models of Type 1 Diabetes: Genetics, Environment, and Autoimmunity. *ILAR Journal*, v. 45, n. 3, p. 278-291, 1 jan. 2004. DOI 10.1093/ilar.45.3.278.

MÜNZZBERG, H.; MYERS, M. G. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nature Neuroscience*, v. 8, n. 5, p. 566-70, 26 maio 2005. DOI 10.1038/nn1454.

OZTÜRK, Y.; ALTAN, V. M.; YILDIZOĞLU-ARI, N. Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. *Pharmacological Reviews*, v. 48, n. 1, p. 69-112, mar. 1996.

PHILLIPS, B.; TRUCCO, M.; GIANNOUKAKIS, N. Current state of type 1 diabetes immunotherapy: incremental advances, huge leaps, or more of the same? *Clinical & Developmental Immunology*, v. 2011, p. 432-016, 2011. DOI 10.1155/2011/432016.

POUCHER, S. M. *et al.* Effects of saxagliptin and sitagliptin on glycaemic control and pancreatic β -cell mass in a streptozotocin-induced mouse model of type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*, v. 14, n. 10, p. 918-26, 2012. DOI 10.1111/j.1463-1326.2012.01619.x.

REED, M. J. *et al.* A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism*, v. 49, n. 11, p. 1.390=1.394, 1 nov. 2000. DOI 10.1053/meta.2000.17721.

SOLOMON, T. P. J. *et al.* Exercise and diet enhance fat oxidation and reduce insulin resistance in older obese adults. *Journal of Applied Physiology* (Bethes-

da, Md.: 1985), v. 104, n. 5, p. 1313-1319, maio 2008. DOI 10.1152/japplphysiol.00890.2007.

SOUZA, G. F. P. *et al.* Defective regulation of POMC precedes hypothalamic inflammation in diet-induced obesity. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 29.290, 4 set. 2016. DOI 10.1038/srep29290.

SZKUDELSKI, T. Streptozotocin–nicotinamide-induced diabetes in the rat. *Characteristics of the experimental model: Experimental Biology and Medicine*, 1 maio 2012. DOI 10.1258/ebm.2012.011372. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1258/ebm.2012.011372>. Acesso em: 15 jun. 2020.

TAO, B. *et al.* Estimating the cost of type 1 diabetes in the U.S.: a propensity score matching method. *PloS One*, v. 5, n. 7, p. e11.501, 9 jul. 2010. DOI 10.1371/journal.pone.0011501.

WEST, D. B. *et al.* Dietary obesity linked to genetic loci on chromosomes 9 and 15 in a polygenic mouse model. [S. l.: s. n.], [s. d.].

WOLFF, G. L. Some physiologic relationships between the obese (obob) genotype of the mouse and the Harding-Passey melanoma. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 16, n. 5, p. 1.231-47, abr. 1956.

ZHEN, J. *et al.* Hippocampal Lipocalin 2 Is Associated With Neuroinflammation and Iron-Related Oxidative Stress in Ob/Ob Mice. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, v. 79, n. 5, 2020. DOI 10.1093/JNEN/NLAA017.

ZHANG, Y. *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, v. 372, n. 6505, p. 425-32, 1 dez. 1994. DOI 10.1038/372425a0.

CAPÍTULO 7 <doi>10.51996/9788574853994.cap7</doi>

MODELOS ANIMAIS COM LESÃO HEPÁTICA

*Neuza Felix Gomes Rochette*¹

*Luciana Maia Moser*²

*Luiz Francisco Wemmerson Gonçalves Moura*³

*Igor Gomes Moreira*⁴

*Joanna de Freitas Rocha*⁵

*Mirele da Silveira Vasconcelos*⁶

*Dirce Fernandes de Melo*⁷

Resumo: O fígado é o principal órgão de desintoxicação do corpo e desempenha papel fundamental no equilíbrio de numerosos processos biológicos. O estabelecimento de modelos que induzem lesões hepáticas é de fundamental importância para a realização de pesquisas que envolvem o estudo da hepatoproteção, uma vez que tais modelos são cruciais para identificar novos alvos terapêuticos e potenciais, além de avaliar a eficácia e segurança de várias estratégias de tratamento. Neste capítulo, são abordados modelos animais experimentais para estudo da hepatoproteção com agen-

1 Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória/ES, Brasil. *E-mail* para correspondência: neuza felix@hotmail.com

2 Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Garanhuns/PE, Brasil.

3 Universidade Estadual do Ceará (Uece), Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio), Fortaleza/CE, Brasil.

4 Faculdade Terra Nordeste (FATENE), Caucaia/CE, Brasil.

5 Universidade Federal do Ceará (UFC), Departamento de Biologia, Fortaleza/CE, Brasil.

6 Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE), *campus* Baturité, Brasil.

7 Universidade Federal do Ceará (UFC), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Fortaleza/CE, Brasil.

tes tóxicos amplamente usados para indução de lesão hepática, dentre eles, etanol, paracetamol, tetracloreto de carbono e tioacetamida. Os fatores a serem considerados ao projetar um estudo com determinado modelo animal e agente tóxico também foram discutidos, além da análise dos modelos animais sugeridos, com as principais vantagens e limitações de cada método.

Palavras-Chave: Hepatotoxicidade. Etanol. Paracetamol. CCl₄. Tioacetamida.

ANIMAL MODELS WITH HEPATIC LESION

Abstract: The liver is the body's main detoxification organ and plays a key role in balancing numerous biological processes. The establishment of models that induce liver damage is of fundamental importance for carrying out research involving the study of hepatoprotection since such models are crucial to identify new therapeutic and potential targets and assess the effectiveness and safety of various treatment strategies. In this chapter, experimental animal models for the study of hepatoprotection with toxic agents widely used to induce liver damage were discussed, including ethanol, paracetamol, carbon tetrachloride, and thioacetamide. The factors related to study with a specific animal model and toxic agent also were presented. In addition, the main advantages and limitations of the suggested animal models were highlighted.

Keywords: Hepatotoxicity. Ethanol. Paracetamol. CCL₄. Thioacetamide.

1 INTRODUÇÃO

O fígado, um dos órgãos mais complexos e importantes do corpo humano, é responsável por diversas funções vitais, como a manutenção, o desempenho e a regulação da homeostase do corpo; a produção de bÍlis; o armazenamento de vitaminas, minerais, proteínas, desintoxicação do corpo e biotransformação de alimentos (INGAWALE; MANDLIK; NAIK, 2014; MCGILL; JAESCHKE, 2019).

Dessa forma, distúrbios hepáticos podem levar a várias alterações patológicas relevantes, do ponto de vista metabólico, como aumento do estresse oxidativo; necrose de células hepáticas; hepatite; esteatose; colestase; lesões vasculares; aumento dos marcadores de inflamação; e carcinoma hepatocelular (BHAKUNI *et al.*, 2016).

O fígado é especialmente suscetível à toxicidade por lesão induzida por medicamento, devido ao seu papel central no metabolismo das drogas. A Lesão Hepática Induzida por Medicamento (LHIM) é uma das principais causas de falhas de medicamentos em testes pré-clínicos e clínicos e pela retirada de medicamentos previamente aprovados por causar insuficiência hepática aguda (KAPLOWITZ, 2005). Além disso, a hepatotoxicidade é uma das principais causas de morbimortalidade e sua prevalência está aumentando continuamente (SINGH; DHADWAL; HARIKUMAR, 2015).

Para analisar a hepatotoxicidade, são necessários estudos com modelos experimentais, pois, apesar de o emprego de mo-

delos utilizando cultura primária de hepatócitos humanos (PHHs) ainda permanecer como padrão ouro para testes *in vitro* de hepatotoxicidade, uma vez que são ideais para criar modelos de fígado humano, suas funções específicas declinam rapidamente nos formatos convencionais de cultura, o que leva a uma baixa sensibilidade (<50%) para a previsão de LHIM (KHETANI *et al.*, 2015; LIN *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2008). Além disso, esses modelos apresentam limitação pelo fato de as células não estarem constantemente disponíveis; pela possibilidade de perderem sua atividade metabólica na cultura; e pela limitação de tipos de análises que podem ser realizados (RUOß *et al.*, 2020).

A utilização de modelo animal *in vivo*, por sua vez, possui alto grau de correlação com o que ocorre em seres humanos ao permitir que sejam medidos todos os parâmetros bioquímicos e histopatológicos, e inclusive analisar os efeitos dos sistemas nervoso central e imunológico no desenvolvimento de doenças hepáticas (DELGADO-MONTEMAYOR *et al.*, 2015). Além disso, tais modelos são cruciais para identificar novos alvos terapêuticos em potencial e avaliar a eficácia e segurança de várias estratégias de tratamento.

Apesar de o uso de animais como modelos para estudos científicos ser uma prática muito antiga (BECKER; RON, 2014), a sua utilização em inovações, como a invenção de antibióticos, novos métodos diagnósticos e técnicas cirúrgicas, quimioterapia, radioterapia e vacinação, vem salvando milhões de vidas e levou ao aumento significativo da expectativa média de vida da população

humana (LAMAS-PAZ *et al.*, 2018). Assim, os modelos animais são uma ferramenta importante para ciência, sobretudo na identificação de causas de lesões hepáticas.

Neste capítulo, são abordados modelos experimentais para estudo da hepatoproteção com agentes tóxicos amplamente usados para induzir lesão hepática, dentre eles, etanol, paracetamol, tetracloreto de carbono e tioacetamida. Discute-se quais são os fatores pertinentes para projetar um estudo com determinado modelo animal e agente tóxico, faz-se uma análise dos modelos animais sugeridos, com as principais vantagens e as limitações de cada método considerado.

2 MODELOS ANIMAIS DE HEPATOTOXICIDADE *IN VIVO*

Para estudar a atividade hepatoprotetora de qualquer composto, é necessário desenvolver um modelo (animal ou cultura de células) no qual a lesão hepática seja induzida (SALEHI *et al.*, 2016). Apesar de alguns autores acreditarem que os modelos animais nem sempre são bons preditores de LHIM relevante para o ser humano, devido a diferenças significativas específicas da espécie nas vias do metabolismo da droga, como enzimas metabolizadoras de medicamentos (OLSON *et al.*, 2020; MARTIGNONI *et al.*, 2006), o poder preditivo da hepatotoxicidade em experimentos com animais é de, pelo menos, 50% (WARE; KHETANI, 2017; OLSON *et al.*, 2000), o que faz dos modelos animais importantes ferramentas utilizadas frequentemente tanto no desenvolvimento

pré-clínico de novas drogas como para prever o comportamento metabólico de novos compostos em humanos, sobretudo na hepatoproteção (MARTIGNONI *et al.*, 2006).

Várias pesquisas estão em andamento sobre modelos hepatotóxicos, que podem ser induzidos quimicamente (por substâncias, medicamentos, metais etc.), geneticamente, por radiação, dentre outros fatores. Entretanto, é necessário desenvolver um modelo que imita diretamente a hepatotoxicidade humana (BEDI *et al.*, 2015).

Dentre os possíveis modelos animais que podem ser utilizados para estudos gerais, destacam-se os roedores e, dentre eles, os mais utilizados são:

- camundongos (*Mus musculus*);
- ratos (*Rattus norvegicus*);
- cobaias (*Cavia porcellus*);
- hamsters (*Mesocricetus auratus*).

No entanto, os ratos e os camundongos são os mais utilizados como modelo para o estudo específico de hepatotoxicidade (JAES-CHKE; XIE; MCGILL, 2014).

Os produtos químicos que causam lesões no fígado são chamados hepatotoxinas e podem ser: agentes químicos, como produtos químicos de laboratório (por exemplo, CCl_4); produtos químicos naturais (por exemplo, microcistina); produtos químicos industriais, como metais pesados (por exemplo, chumbo, arsênico); remédios

de ervas (por exemplo, cascara); medicamentos (por exemplo, paracetamol); tioacetamida; drogas imunossupressoras, anticâncer, antituberculose, anticoagulantes; anti-infecção viral; distúrbio autoimune; intoxicação (incluindo abuso de álcool); micotoxinas (como a aflatoxina); dentre outros. Até mesmo dietas desequilibradas podem causar hepatotoxicidade (PANDIT *et al.*, 2012; BEDI *et al.*, 2015).

Por ser um órgão metabolicamente muito ativo, várias enzimas são produzidas no fígado e, normalmente, distribuídas dentro de suas células e uma elevação sérica dessas enzimas pode ser considerada como biomarcador sensível da toxicidade hepática. Dentre esses marcadores enzimáticos, pode-se citar: alanina aminotransferase (ALT); aspartato amino transaminase (AST); fosfatase alcalina (ALP); glutamil transpeptidase (GGTP); lactato desidrogenase (LDL). Há, também, marcadores bioquímicos, como: perfil lipídico sérico; colesterol (CH); triglicerídeos (TG); lipoproteínas de alta densidade (HDL); lipoproteínas de baixa densidade (LDL); e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL); concentração de albumina; proteína total (TP); e o tempo de protrombina (PT); medidas da bilirrubina total sérica; bilirrubina na urina e ácido biliar (BHAKUNI *et al.*, 2016).

Dessa forma, o dano produzido em animais experimentais, devido à administração conhecida de diferentes doses de hepatotoxinas e a magnitude do dano ou proteção, é avaliado pelos diferentes marcadores bioquímicos e metabólicos, além de determinações histopatológicas (DELGADO-MONTEMAYOR *et al.*,

2015). Ressalta-se que, nos experimentos de hepatotoxicidade, os animais não devem ser eutanasiados com halotano, pois a substância causa lesão hepática e poderá se tornar um interferente na análise/pesquisa.

Etanol, paracetamol, tetracloreto de carbono (CCl_4) e tioacetamida são agentes tóxicos que têm sido amplamente utilizados para induzir lesões hepáticas em roedores e serão analisados quanto à sua utilização, seu controle e monitoramento.

2.1 Modelo Animal de Lesão Hepática Induzida por Etanol

O etanol é considerado um dos fatores de risco mais importantes para a lesão hepática induzida por drogas, mas seu papel exato não é totalmente compreendido. No entanto, sabe-se que seu metabolismo é responsável pela elevada produção de espécies reativas de oxigênio; redução do sistema de defesa antioxidante, com consequente aumento do estresse oxidativo, e a causa de esteatose, hepatite, fibrose e cirrose (SINGH; DHADWAL; HARIKUMAR, 2015).

O consumo agudo e crônico de etanol é um importante problema social, econômico e clínico em todo o mundo (GHOSH DAS-TIDAR *et al.*, 2018). Assim, modelos experimentais que simulam padrões de consumo de etanol por humanos e imitam o espectro e a severidade de patologia hepática induzida por etanol é fundamental para identificar novos mecanismos e alvos terapêuticos (LAMAS-PAZ *et al.*, 2018).

Ratos Wistar das variedades UChA e UChB (UCh/Universidade do Chile), modelo de alcoolismo experimental, são importantes para o estudo de características do alcoolismo humano. Denominou-se de UChA e UChB às linhagens puras de ratos Wistar com predisposição genética para baixo e alto consumos voluntários de etanol, respectivamente (TAMPIER; QUINTANILLA; MARDONES, 1994). Além dessas linhagens de ratos, os camundongos da linhagem C57BL/6 são geneticamente predispostos ao consumo voluntário de elevadas quantidades de etanol, enquanto os camundongos da linhagem BALB/c e DBA/2 apresentam baixa preferência pelo consumo de etanol (McCLEARN; RODGERS, 1961).

O modelo de ingestão aguda de uma ou múltiplas doses de etanol tem sido utilizado por muitos laboratórios para estudar a patogênese da lesão hepática alcoólica e doses de 4-6g de etanol/kg de peso corporal são as mais comumente usadas (PEREIRA *et al.*, 2006; JAMES *et al.*, 2012; GOMES-ROCHETTE *et al.*, 2019).

A dose aguda de etanol induz a disfunção mitocondrial, resposta inflamatória e o estresse oxidativo, mas, apesar da capacidade de induzir uma resposta inflamatória significativa, o modelo de ingestão aguda de etanol não tem sido amplamente utilizado, pois, muitas vezes, resulta apenas em uma discreta elevação das atividades das enzimas séricas alanina aminotransferase sérica (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Ainda assim, o modelo é útil para identificar mecanismos e metas que sejam distintos daqueles afetados pela ingestão crônica de etanol (MATHEWS *et al.*, 2014).

Além disso, o tempo para coleta de materiais biológicos é de suma importância e deve ser cuidadosamente analisado. Um exemplo é o estudo cinético utilizando dose aguda de etanol (5g/kg), que revelou que as atividades mais elevadas das enzimas ALT e AST foram alcançadas seis horas após a ingestão de etanol, enquanto a peroxidação lipídica no fígado ocorreu a partir da primeira hora, atingindo um pico máximo em três horas (GOMES-ROCHETTE *et al.*, 2019).

O modelo de consumo crônico de etanol *ad libitum* foi um dos primeiros modelos experimentais utilizados para o estudo de doenças alcoólicas em roedores. Nesse modelo, o etanol é administrado em água, servindo como única fonte de água potável, e dieta alimentar padrão. Além desse modelo ser simples de executar e a concentração precisa de etanol em água ser facilmente manipulada, o consumo “voluntário” de etanol com a dieta normal imita o padrão de consumo típico em humanos. Devido à sua grande flexibilidade, existem diferentes protocolos de estudos, em que a concentração de etanol pode variar de 10% a 40% (v/v) e o período de administração de 8 até 70 semanas, sem mortalidade significativa (BRANDON-WARNER *et al.*, 2012; COOK *et al.*, 2007).

Na maioria dos estudos, o modelo de alimentação *ad libitum* é suficiente para induzir danos no fígado, como esteatose e elevação das enzimas ALT e AST, mas sem lesões mais avançadas de fibrose ou cirrose (KEEGAN; MARTINI; BATEY, 1995; SONG *et al.*, 2016). A administração crônica de etanol (5ml/kg, por via oral)

em ratos, durante quatro semanas, causou peroxidação lipídica, infiltração por células mononucleares; aumentou os níveis séricos de ALT e AST; o que levou a danos no fígado (ELIWA *et al.*, 2014).

Além disso, em outro estudo, o consumo crônico de etanol a 12% em água (*ad libitum*-8,14 g de etanol/kg de peso corporal/dia), durante seis semanas, induziu alterações histopatológicas significativas no fígado: congestão, dilatação de veias, hiperplasia das células de Kupffer, esteatose e necrose focal dos hepatócitos (RADIC *et al.*, 2019).

Uma desvantagem a ser considerada é que a maioria dos roedores tem aversão natural ao etanol e tendem a consumi-lo apenas pelas calorias e não por desejo. Além disso, a taxa catabólica em roedores é cinco vezes mais rápida do que em humanos (HOLMES *et al.*, 1986), o que ocasiona menos danos em roedores em comparação aos humanos, após exposição ao etanol. Além dos efeitos do metabolismo do etanol, a diferença entre o sistema imunológico inato do homem e do camundongo deve ser cuidadosamente considerada (MESTAS *et al.*, 2004).

2.2 Modelo Animal de Lesão Hepática Induzida por Paracetamol

A lesão hepática induzida por drogas é uma etiologia importante da insuficiência hepática aguda. Mais de mil medicamentos comercializados podem causar lesões hepáticas graves (RUOß *et al.*, 2020). O paracetamol, ou acetaminofeno, é um medicamento analgésico e antipirético amplamente utilizado, seu uso em exc-

so, ou por tempo prolongado, causa efeitos hepatotóxicos (SINGH; DHADWAL; HARIKUMAR, 2015).

A overdose causada por drogas é a causa primária de insuficiência hepática aguda em vários países e, por isso, o modelo de toxicidade por paracetamol é considerado relevante. Ademais, uma das vantagens desse modelo é que se aproxima de situações do cotidiano (JAESCHKE; XIE; MCGILL, 2014; MCGILL; JAESCHKE, 2019).

A ligação covalente do N-acetil-p-benzoquinoneimina, metabólito reativo do paracetamol, com os grupos sulfidril de proteínas, causa depleção da glutathiona (GSH), peroxidação lipídica, resultando em lesões hepáticas e necrose por mecanismos variados (SINGH *et al.*, 2012). O paracetamol induz hepatotoxicidade aguda, dependendo da dosagem, através de diferentes vias de administração (ASIJA *et al.*, 2014; MCGILL; JAESCHKE, 2019).

Normalmente, os camundongos são submetidos a jejum de 12 a 16 horas, antes do tratamento com paracetamol (200-300mg/kg). O objetivo principal do jejum é reduzir a variação dos níveis hepáticos de GSH, garantindo que todos os animais tenham nível basal semelhante ao de GSH para glutathionilação e glicogênio para glucuronidação. No entanto, o jejum não é necessário, se forem administradas doses mais altas (400-600mg/kg) de paracetamol (MCGILL; JAESCHKE, 2019).

Atualmente, o camundongo é o melhor modelo disponível para estudos de sobredosagem com paracetamol, pois os mecanismos de toxicidade em camundongos e em seres humanos pa-

recem ser os mesmos (JAESCHKE; XIE; MCGILL, 2014; MCGILL; JAESCHKE, 2019). Por outro lado, os ratos têm menos ligação às proteínas mitocondriais do que os camundongos. Apesar de receberem doses muito mais elevadas, não há evidências de dano mitocondrial ou estresse oxidativo em ratos (MCGILL *et al.*, 2012). Convenientemente, os camundongos são geralmente mais fáceis de trabalhar do que outras espécies, e numerosos camundongos *knock-out* e transgênicos estão disponíveis para fins de pesquisa (MCGILL; JAESCHKE, 2019).

2.3 Modelo Animal de Lesão Hepática Induzida por Tetracloreto de Carbono (CCl₄)

O tetracloreto de carbono (CCl₄) é um reagente usado na química sintética e seus metabólitos levam a várias mudanças patológicas (BHAKUNI *et al.*, 2016). A toxicidade depende do seu metabolismo pelo citocromo P450 (CYP450) para formar os radicais livres triclorometil (CCl₃•) e triclorometilperoxil (OOCCL₃•). Ele é absorvido rapidamente, por qualquer via de exposição, e metabolizado principalmente pelo fígado, mas também pelos rins, pulmões e outros tecidos que contêm CYP450. Em doses baixas, são produzidos efeitos como perda da homeostase do cálcio, peroxidação lipídica e liberação de citocinas.

Em doses altas, ou se houver exposição mais longa, os efeitos são mais graves e podem resultar em fibrose, cirrose ou até

câncer (ASIJA *et al.*, 2014; DELGADO-MONTEMAYOR *et al.*, 2015). Assim, CCl₄ pode ser usado como modelo para o estudo da insuficiência hepática aguda e crônica (SING *et al.*, 2012; MCGILL; JAESCHKE, 2019).

A lesão hepática aguda pode ser causada pela administração oral ou subcutânea (SC) de CCl₄ (1,25ml/kg). Enquanto a administração de CCl₄ (1ml/kg S.C.), duas vezes por semana, durante oito semanas, provoca lesão hepática crônica e reversível; a administração de CCl₄ (1 ml/kg SC.), duas vezes por semana, durante doze semanas, produz lesão hepática crônica e irreversível. A elevação máxima de parâmetros bioquímicos é encontrada 24 horas após a administração de CCl₄ (ASIJA *et al.*, 2014). Além disso, a administração de CCl₄ é realizada como uma mistura 1:1 (v/v) em óleo mineral ou azeite.

Os ratos são os melhores animais para estudos de hepatotoxicidade por CCl₄, principalmente pelas semelhanças das respostas histopatológicas por CCl₄ em ratos e humanos (TESCHKE, 2018). No entanto, os camundongos são frequentemente usados por conveniência e, devido à sua disponibilidade, tanto *knockout* como transgênicos. Outro importante fator a ser considerado sobre a utilização do CCl₄ em ensaios de hepatoproteção, é sua capacidade de causar lesão hepática crônica e fibrose, o que pode ser útil e indicado em determinados tipos de ensaios (MCGILL; JAESCHKE, 2019).

2.4 Modelo Animal de Lesão Hepática Induzida por Tioacetamida

A tioacetamida é um composto organosulfurado sólido cristalino solúvel em água que serve como fonte de íons sulfeto na síntese de compostos orgânicos e inorgânicos. O mecanismo de toxicidade da tioacetamida é devido, principalmente, ao seu metabólito reativo, tioacetamida-S-óxido (SINGH *et al.*, 2012). Esse metabólito é responsável pelo aumento do estresse oxidativo; a peroxidação lipídica; redução do número de hepatócitos viáveis; redução do volume de bile e dos sais biliares; o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} ; e a obstrução da atividade mitocondrial (INGAWALE; MANDLIK; NAIK, 2014; SING *et al.*, 2015; BHAKUNE *et al.*, 2016).

A tioacetamida causa hepatotoxicidade em ratos e camundongos em doses ≥ 100 mg/kg, que podem ser induzidas pelas vias oral, intraperitoneal (I.P) e subcutânea (SC) e em diferentes tempos e diferentes concentrações (MCGILL; JAESCHKE, 2019; REIF *et al.*, 2004; PALACIOS *et al.*, 2008; AMIN *et al.*, 2012; ASIJA *et al.*, 2014).

Dose de 100mg/kg (SC) induziu dano hepático agudo após 48 horas de administração, causando congestão sinusoidal e inchaço hidrópico com aumento da mitose (ASIJA *et al.*, 2014). Tratamento crônico com tioacetamida (200 mg/kg, I.P.), três vezes por semana, durante oito semanas, induziu cirrose em ratos Sprague Dawley, com características típicas de cirrose humana (AMIN *et al.*, 2012).

Doses de 200mg/kg, I.P, duas vezes por semana, durante doze semanas, também induziu cirrose em ratos Wistar (REIF *et al.*, 2004). Administração de tioacetamida (200mg/kg), por via oral, durante dezesseis semanas, causou fibrose em camundongos (PALACIOS *et al.*, 2008).

A tioacetamida é usada rotineiramente para indução de fibrose hepática e cirrose (INGAWALE; MANDLIK; NAIK, 2014). Sua principal vantagem é produzir padrão histológico mais próximo ao da cirrose humana e com menor mortalidade. A principal desvantagem é o prolongado período de indução da cirrose (PASSOS *et al.*, 2010).

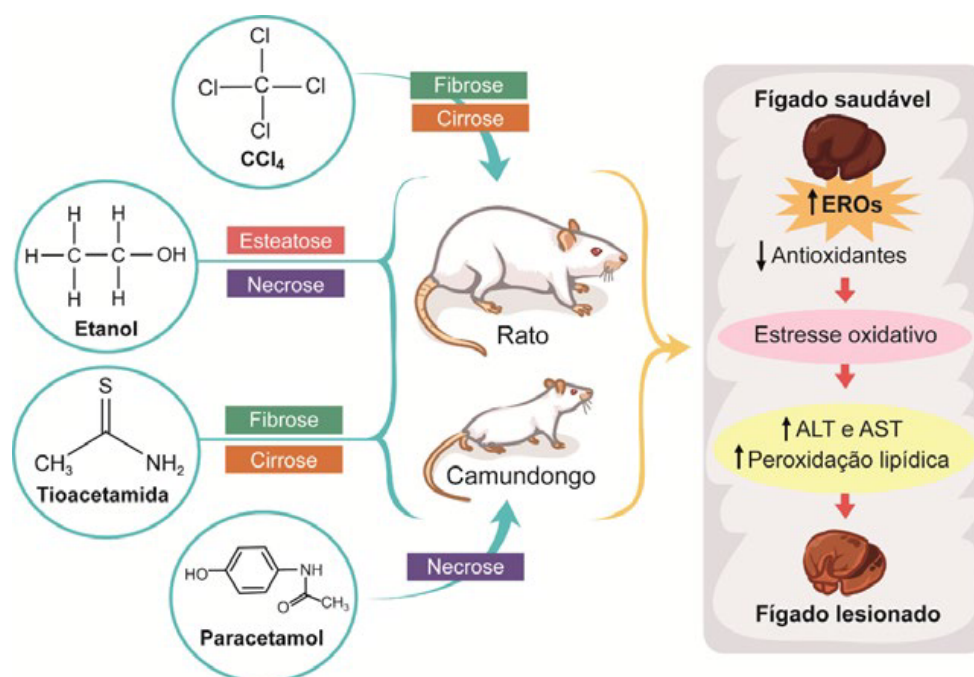
2.5 Como Avaliar o Modelo Animal e Ensaio Hepatotóxico mais Adequado

Não existe um modelo animal único que possua todos os atributos necessários para determinado estudo ou análise. Ao decidir sobre qual modelo utilizar, é pertinente escolhê-lo com base na natureza da pesquisa a ser realizada.

Para induzir a toxicidade, na maioria dos casos, os animais são tratados com altas doses do agente hepatotóxico de interesse. No entanto, o uso adequado desses modelos requer um entendimento básico dos mecanismos de toxicidade de cada um (MCGILL; JAESCHKE, 2019). Aqui abordamos modelos envolvendo roedores das espécies *Mus musculus* (camundongos) e *Rattus norvegicus* (ratos).

A Figura 1 ilustra os diferentes modelos experimentais de hepatotoxicidade abordados neste capítulo, e os efeitos dos quatro agentes hepatotóxicos (CCl_4 ; etanol; tioacetamida; e paracetamol) e seus principais danos no fígado.

Figura 1 – Diferentes modelos experimentais de hepatotoxicidade e os principais danos no fígado



Fonte: Elaborada por Joanna de Freitas Rocha.

Nota: As hepatotoxinas podem causar diversos danos ao fígado e o nível de lesão depende de vários fatores, dentre eles a natureza da hepatotoxina, a dose e o tempo de exposição, por exemplo. Tetracloreto de Carbono (CCl_4), etanol, tioacetamida e paracetamol aumentam as espécies reativas de oxigênio (EROs) e reduzem a capacidade antioxidante, levando ao estresse oxidativo, aumentam os marcadores de hepatotoxicidade e, conseqüentemente, causam várias lesões hepáticas. Os ratos são os melhores animais para estudos de hepatotoxicidade por CCl_4 . Enquanto os camundongos são mais adequados para hepatotoxicidade por paracetamol.

A formação de metabólitos reativos, ligação às proteínas, estresse oxidativo e mitocondrial são características comuns de quase todos os modelos de hepatotoxicidade (RAMACHANDRAN *et al.*, 2018). Os diferentes agentes hepatotóxicos possuem vantagens e desvantagens em relação ao seu uso, sobretudo em associação com alguns modelos animais, como analisados no Quadro 1.

Quadro 1 – Características de diferentes agentes hepatotóxicos

Agente Hepatotóxico	Modelo Animal	Alteração Metabólica	Vantagens	Desvantagens
CCl₄	Rato	Perda da homeostase do cálcio Peroxidação lipídica Liberação de citocinas Fibrose Cirrose Câncer	Histopatologia da toxicidade por CCl ₄ em ratos é semelhante à dos humanos	Diferenças associadas às isoformas CYP 450 em ratos e humanos
Etanol	Rato e Camundongo	Redução do sistema de defesa antioxidante Estresse oxidativo Disfunção mitocondrial Resposta inflamatória Elevação sérica ALT e AST Peroxidação lipídica	Fator de risco muito importante para lesão hepática O consumo é um problema social no mundo	Aversão natural ao álcool em ratos e camundongos Taxa metabólica em camundongos e ratos é 5 vezes mais rápida do que a de humanos Diferenças no sistema imunológico humano e de camundongos

Tioacetamida	Rato e Camundongo	<p>Estresse oxidativo</p> <p>Peroxidação lipídica</p> <p>↓ Número de hepatócitos viáveis,</p> <p>↓ Volume de bile e dos sais biliares</p> <p>↑ Concentração intracelular de Ca^{2+}</p> <p>Obstrução da atividade mitocondrial</p> <p>Fibrose</p> <p>Cirrose</p>	<p>Produz padrão histológico semelhante à cirrose humana em ratos e camundongos</p>	<p>Período de indução de cirrose prolongado</p>
Paracetamol	Camundongo	<p>Depleção de glutatiônica (GSH)</p> <p>Peroxidação lipídica</p> <p>Necrose</p>	<p>Causa primária de insuficiência hepática aguda em vários países</p> <p>Mecanismos de toxicidade semelhantes em camundongos e humanos</p>	<p>Parece não causar estresse oxidativo em ratos</p> <p>Padrão de proteínas mitocondriais diferentes em humanos</p>

Fonte: Elaborado pelos autores.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As doenças hepáticas representam uma das principais causas de morte, em todo o mundo. Assim, os estudos de doenças relacionadas ao metabolismo hepático, bem como o desenvolvimento de

medicamentos e o estudo de hepatoproteção, através de ensaios de hepatotoxicidade, mediados por numerosos agentes de indução de lesão hepática, com a utilização de modelos experimentais animais, são de extrema importância e necessários.

Neste capítulo, foram analisados dois modelos animais (ratos e camundongos) para estudos de hepatotoxicidade, abordando as principais características; limitações; importância; vantagens e desvantagens dos modelos experimentais de hepatotoxicidade induzidos pelos agentes de lesão hepática CCl_4 , etanol, tioacetamida e paracetamol.

De forma geral, as hepatotoxinas aumentam as espécies reativas de oxigênio; reduzem a capacidade antioxidante, levando ao estresse oxidativo; aumentam os marcadores bioquímicos de hepatotoxicidade e, conseqüentemente, causam lesões hepáticas. Apesar disso, cada uma delas têm mecanismos diferentes e causam danos diversos, dependendo do modelo animal utilizado.

Os modelos testados aqui mostraram diferentes perfis de atuação, enquanto o CCl_4 pode ser mais apropriado a testes em ratos e causa fibrose e cirrose, o paracetamol pode ser mais adequado em testes em camundongo e leva à necrose. Já o etanol pode ser testado em ratos e camundongos e causar lesões como esteatose e necrose, enquanto o agente tioacetamida também pode ser testado em ratos e camundongos e, dependendo da dose e do tempo de ação, pode produzir fibrose e cirrose.

Diante do que foi abordado, as informações apresentadas neste trabalho podem ajudar os pesquisadores a fazer uma seleção adequada de modelos animais para estudos de hepatoproteção. No futuro, para investigar os mecanismos de hepatotoxicidade em modelos animais, novas abordagens, incluindo a genômica, proteômica e metabolômica, podem ser relevantes e necessárias para uma visão mais integral do metabolismo.

REFERÊNCIAS

- AMIN, Z. A. *et al.* Protective role of phyllanthus niruri extract against thioacetamide-induced liver cirrhosis in rat model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2012, 2012.
- ASIJA, R. *et al.* Hepatoprotective models and screening methods: a review. *Journal of Drug Discovery and Therapeutics*, v. 2, n. 21, p. 49-56, 2014.
- BECKER, H. C.; RON, D. Animal models of excessive alcohol consumption: recent advances and future challenges. *Alcohol (Fayetteville, NY)*, v. 48, n. 3, p. 205, 2014.
- BEDI, O. *et al.* Herbal induced hepatoprotection and hepatotoxicity: a critical review. *Indian J Physiol Pharmacol*, v. 60, n. 1, p. 6-21, 2016.
- BHAKUNI, G. S. *et al.* Animal models of hepatotoxicity. *Inflammation Research*, v. 65, n. 1, p. 13-24, 2016.
- BRANDON-WARNER, E. *et al.* Chronic ethanol feeding accelerates hepatocellular carcinoma progression in a sex-dependent manner in a mouse model of hepatocarcinogenesis. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 36, n. 4, p. 641-653, 2012.
- COOK, R. T. *et al.* Thymocytes, pre-B cells, and organ changes in a mouse model of chronic ethanol ingestion - absence of subset-specific glucocorticoid-induced immune cell loss. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 31, n. 10, p. 1.746-1.758, 2007.

DELGADO-MONTEMAYOR, C. *et al.* Models of hepatoprotective activity assessment. *Medicina Universitaria*, v. 17, n. 69, p. 222-228, 2015.

ELIWA, H. *et al.* Evaluation of the therapeutic effect of whey proteins on the hepatotoxicity induced by paracetamol and alcohol coadministration in rats. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, v. 3, n. 2, p. 295-314, 2014.

GHOSH DASTIDAR, S. *et al.* Rodent models of alcoholic liver disease: role of binge ethanol administration. *Biomolecules*, v. 8, n. 1, p. 3, 2018.

GOMES-ROCHETTE, N. F. *et al.* Avaliação da peroxidação lipídica e das enzimas marcadoras de danos hepáticos em camundongos submetidos ao estresse alcoólico. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 50 (1 supl.1): S99-103, 2019.

HOLMES, R. S. *et al.* Biochemical and genetic studies on enzymes of alcohol metabolism: The mouse as a model organism for human studies. *Alcohol and Alcoholism*, v. 21, n. 1, p. 41-56, 1986.

INGAWALE, D. K.; MANDLIK, S. K.; NAIK, S. R. Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanism(s): A critical discussion. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 37, n. 1, p. 118-133, 2014.

JAESCHKE, H.; XIE, Y.; MCGILL, M. R. Acetaminophen-induced liver injury: From animal models to humans. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, v. 2, n. 3, p. 153-161, 2014.

JAMES, T. T. *et al.* Histone H3 phosphorylation (S10, S28) and phosphoacetylation (K9/S10) are differentially associated with gene expression in liver of rats treated in vivo with acute ethanol. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 340, p. 237-247, 2012.

KAPLOWITZ, N. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 4, n. 6, p. 489-499, 2005.

KEEGAN, A.; MARTINI, R.; BATEY, R. Ethanol-related liver injury in the rat: A model of steatosis, inflammation and pericentral fibrosis. *Journal of Hepatology*, v. 23, n. 5, p. 591-600, 1995.

KHETANI, S. R. *et al.* Microengineered liver tissues for drug testing. *Journal of Laboratory Automation*, v. 20, n. 3, p. 216-250, 2015.

LAMAS-PAZ, A. *et al.* Alcoholic liver disease: Utility of animal models. *World Journal of Gastroenterology*, v. 24, n. 45, p. 5.063-5.075, 2018.

LIN, C.; BALLINGER, K. R.; KHETANI, S. R. The application of engineered liver tissues for novel drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 10, n. 5, p. 519-540, 2015.

MARTIGNONI, M.; GROOTHUIS, G. M. M.; KANTER, R. de. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, v. 2, n. 6, p. 875-894, 2006.

MATHEWS, S. *et al.* Animals models of gastrointestinal and liver diseases. Animal models of alcohol-induced liver disease: Pathophysiology, translational relevance, and challenges. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 306, n. 10, p. G819-G823, 2014.

MCCLEARN, G. E.; RODGERS, David A. Genetic factors in alcohol preference of laboratory mice. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, v. 54, n. 2, p. 116, 1961.

MCGILL, M. R. *et al.* Acetaminophen-induced liver injury in rats and mice: Comparison of protein adducts, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the mechanism of toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 264, n. 3, p. 387-394, 2012.

MCGILL, M. R.; JAESCHKE, Hartmut. Animal models of drug-induced liver injury. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, v. 1.865, n. 5, p. 1.031-1.039, 2019.

MESTAS, J.; HUGHES, C. C. W. Of mice and not men: Differences between mouse and human immunology. *The Journal of Immunology*, v. 172, n. 5, p. 2.731-2.738, 2004.

OLSON, H. *et al.* Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 32, n. 1, p. 56-67, 2000.

PALACIOS, R. S. *et al.* Activation of hepatic stellate cells is associated with cytokine expression in thioacetamide-induced hepatic fibrosis in mice. *Laboratory Investigation*, v. 88, n. 11, p. 1.192-1.203, 2008.

PANDIT, A.; SACHDEVA, T.; BAFNA, P. Drug-induced hepatotoxicity: a review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 2, n. 5, p. 233-43, 2012.

- PASSOS, C. C. *et al.* Modelos experimentais para indução de cirrose hepática em animais: Revisão de literatura. *Biotemas*, v. 23, n. 2, p. 183-190, 2010.
- PEREIRA, B. S. *et al.* Atividade hepatoprotetora dos extratos etanólico e hexânico das folhas de *Momordica charantia*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 12, n. 3, p. 311-316, 2010.
- RADIC, I. *et al.* Protective effects of whey on rat liver damage induced by chronic alcohol intake. *Human & Experimental Toxicology*, v. 38, n. 6, p. 632-645, 2019.
- RAMACHANDRAN, A. *et al.* Mitochondrial dysfunction as a mechanism of drug-induced hepatotoxicity: Current understanding and future perspectives. *Journal of Clinical and Translational Research*, v. 4, n. 1, p. 75-100, 2018.
- REIF, S. *et al.* Treatment of thioacetamide-induced liver cirrhosis by the Ras antagonist, farnesylthiosalicylic acid. *Journal of Hepatology*, v. 41, n. 2, p. 235-241, 2004.
- RUOß, M. *et al.* Towards improved hepatocyte cultures: Progress and limitations. *Food and Chemical Toxicology*, p. 111-188, 2020.
- SALEHI, M. *et al.* Medicinal plants for management of gastroesophageal reflux disease: A review of animal and human studies. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, v. 23, n. 2, p. 82-95, 2017.
- SINGH, G.; DHADWAL, N.; HARIKUMAR, S. L. Experimental models for hepatotoxicity. *Asian J Pharm Clin Res*, v. 8, n. 2, p. 70-74, 2015.
- SINGH, R. *et al.* Different models of hepatotoxicity and related liver diseases: A review. *Int Res J Pharm*, v. 3, n. 7, p. 86-95, 2012.
- SONG, M. *et al.* Chronic alcohol consumption causes liver injury in high-fructose-fed male mice through enhanced hepatic inflammatory response. *Alcoholism: clinical and Experimental Research*, v. 40, n. 3, p. 518-528, 2016.
- TAMPIER, L.; QUINTANILLA, M. E. MARDONES, J. Acetaldehyde metabolism: Differences between UChA and UChB rats. *Alcohol and Alcoholism*, v. 29, n. 6, p. 751-755, 1994.
- TESCHKE, R. Liver injury by carbon tetrachloride intoxication in 16 patients treated with forced ventilation to accelerate toxin removal via the lungs: a clinical report. *Toxics*, v. 27, n. 6, 2018.
- XU, J. J. *et al.* Cellular imaging predictions of clinical drug-induced liver injury. *Toxicological sciences*, v. 105, n. 1, p. 97-105, 2008.

CAPÍTULO 8 <doi>10.51996/9788574853994.cap8</doi>

MODELOS ANIMAIS NO ESTUDO DO CÂNCER

Carolina de Araújo Viana¹

Resumo: O câncer é considerado uma doença crônica não transmissível resultante do acúmulo de múltiplas aberrações genéticas, que podem levar à transformação celular, ao seu crescimento, à proliferação e metástase, de forma descontrolada. A descoberta dessas aberrações e a compreensão de como podem contribuir para a fisiopatologia da doença, são necessárias para proporcionar novas abordagens de diagnóstico, bem como de terapia. Assim, a pesquisa científica é necessária para a definição dessas novas estratégias, seja para tratamentos ou diagnósticos, e, neste sentido, os modelos animais para estudos do câncer são essenciais. Apesar de apresentarem limitações para a modelagem do câncer humano, incluindo diferenças específicas das espécies e imperfeições no desenvolvimento do tumor humano, os modelos animais são fundamentais e necessários, nesses estudos. Dentre os modelos animais amplamente utilizados, os camundongos geneticamente modificados destacam-se e contribuíram significativamente para a compreensão da biologia do câncer que pode ser

¹ Centro Universitário UniFanor, Fortaleza, Ceará, Brasil. *E-mail* para correspondência: carolviana85@hotmail.com

evidenciada pela validação de funções gênicas, identificação de novos genes relacionados ao câncer e biomarcadores de tumores, pelos mecanismos moleculares e celulares subjacentes à iniciação de tumores, bem como por diversos processos dos estágios da tumorigênese e, dessa forma, são considerados como modelos pré-clínicos para testar novas estratégias terapêuticas. Apesar disso, nenhum modelo pode ser considerado superior em todos os aspectos e são necessárias abordagens combinatórias que usam vários sistemas como modelo para entender a complexidade dos cânceres humanos de forma mais ampla. Portanto, neste capítulo, são apresentados e caracterizados os principais modelos de camundongos utilizados na pesquisa científica do câncer.

Palavras-Chave: Câncer. Camundongos. Modelos. Animais Geneticamente Modificados. Xenoenxertos.

ANIMAL MODELS IN CANCER STUDY

Abstract: Cancer is a chronic non-communicable disease resulting from the accumulation of multiple genetic aberrations that can lead to cell transformation, allowing its uncontrolled growth, proliferation, and metastasis. The discovery of these aberrations and understanding how they can contribute to the pathophysiology of the disease is necessary for the development of new approaches to diagnosis and therapy. Accordingly, scientific research is essential for developing these new strategies, whether for treatments or diagnoses, and, in this sense, animal models for cancer studies are crucial.

Although animal models have limitations concerning the modeling of human cancer, including species-specific differences and imperfections in the development of human tumors, they are fundamental and necessary in these studies. Among the widely used animal models, genetically modified mice stood out and contributed significantly to understanding cancer biology. They can validate gene functions, identify new cancer genes and tumor biomarkers by the underlying molecular and cellular mechanisms to initiate tumors, and by several processes of the stages of tumorigenesis. Thus, they are preclinical models to test new therapeutic strategies. Despite this, no model can be regarded as superior in all aspects. It is necessary to use combinatorial approaches that use several model systems to understand the complexity of human cancers. Therefore, this chapter aims to present and characterize the main mouse models used in scientific cancer research.

Keywords: Cancer. Mouse. Models. Genetically Engineered Animals. Xenografts.

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença multifatorial que resulta do acúmulo de mutações genéticas, e traz como consequências diversos distúrbios de crescimento de células que perdem seu grau de diferenciação ou especialização, além de evadirem dos sinais fisiológicos para controle de divisão e morte celular, o que permite o seu crescimento anormal, a proliferação e metástase.

Dentre essas alterações, Hanahan e Weinberg (2000) enumeram seis, que são consideradas essenciais na fisiologia celular e possibilitam o crescimento tumoral: autossuficiência em sinais de crescimento; insensibilidade a sinais de inibição de crescimento; evasão de apoptose; potencial replicativo ilimitado; manutenção da angiogênese; invasão tecidual; e metástase. A compreensão de como ocorrem essas transformações e esses fatores contribuem para a fisiopatologia da doença é importante para garantir o diagnóstico e a terapia do câncer (CHEON; ORSULIC, 2011).

Os dados estatísticos confirmam que o câncer consiste em uma das principais causas de morte no mundo. Atualmente, mais de 19 milhões de pessoas são diagnosticadas com a doença e a estimativa era que essa taxa aumentasse para 20 milhões, até o final de 2021. Dessa forma, a detecção e o tratamento precoces são fatores indispensáveis para um melhor prognóstico (IARC, 2021; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017).

Por ser doença altamente disseminada, o câncer vem sendo estudado há muitos anos. O sistema de culturas de células *in vitro*, provenientes de tumores humanos, foi o primeiro modelo de estudo e por muito tempo esse sistema forneceu, e ainda fornece, informações valiosas sobre os mecanismos moleculares que controlam os processos cancerígenos.

Entretanto, o estudo de interações fisiopatológicas entre células tumorais e seu microambiente, aspectos importantes para a compreensão do desenvolvimento e da progressão tumoral, representavam uma clara limitação desse modelo (MENDES *et al.*,

2020). Por outro lado, o uso de modelos animais para estudar o câncer superou essa limitação, uma vez que permitiu recriar o desenvolvimento tumoral em um ambiente fisiopatológico, complexo e interativo, com as conseqüentes descoberta e validação pré-clínica de diversos tratamentos (DAY; MERLINO; VAN DYKE, 2015).

Modelos animais são ferramentas valiosas para o estudo da biologia e genética de cânceres humanos, bem como para a investigação pré-clínica de tratamentos e prevenção dessa doença. Os dados provenientes de diversos estudos permitiram conhecer melhor os mecanismos genéticos que regem a transformação maligna e a progressão do câncer (BOCK *et al.*, 2014).

Diversos modelos de animais podem ser usados na pesquisa do câncer, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (GOFFEAU *et al.*, 1996); a rã *Xenopus laevis* (NUTT, 2012); o nematódeo *Caenorhabditis elegans* (POTTS; CAMERON, 2011); o zebrafish - *Danio rerio* (WHITE; ROSE; ZON, 2013); e a mosca-das-frutas - *Drosophila melanogaster* (GONZALEZ, 2013). Assim, uma variedade de abordagens pode ser aplicada, dependendo do objetivo do estudo e o modelo animal ideal deve representar a doença humana o mais próximo possível. Além disso, sua viabilidade e seu custo também são fatores importantes a considerar. Nas últimas décadas, uma das espécies mais utilizadas nesses estudos foi o camundongo *Mus musculus* (CHEON; ORSULIC, 2011) e, dessa forma, neste tópico, estão descritos os principais modelos experimentais utilizando camundongos para a pesquisa do câncer.

2 CAMUNDONGOS: OS PRINCIPAIS MODELOS UTILIZADOS NA PESQUISA DO CÂNCER

Mais do que qualquer outro sistema modelo, os camundongos revolucionaram nossa capacidade de estudar a função dos genes *in vivo* e entender os mecanismos moleculares da patogênese do câncer. Como sistema modelo, esses roedores têm várias vantagens importantes sobre outros modelos de mamíferos: (a) são pequenos em tamanho; (b) tem manutenção barata; (c) reproduzem-se rapidamente, produzindo grandes ninhadas; e (d) podem ser manipulados geneticamente. Os avanços na manipulação genética de camundongos facilitaram a introdução de alterações genéticas definidas que podem ser controladas temporal e espacialmente, a fim de imitar fielmente a fisiopatologia dos cânceres humanos (CHEON; ORSULIC, 2011).

Além das características citadas anteriormente, destaca-se também que as linhagens de camundongos são altamente padronizadas; apresentam características conhecidas e monitoradas após várias gerações; além de compartilharem similaridades genéticas e fisiológicas com os humanos, permitindo que múltiplos aspectos da doença sejam estudados nesses modelos (HANN; BALMAIN, 2001).

Os principais modelos de estudo do câncer serão detalhados, desde tumores induzidos por cancerígenos, a modelos de xenoinxertos derivados de cultura de células, ou de xenoinxertos derivados de pacientes e os modelos modificados geneticamente. Ao

final, no Quadro 1, são destacadas as principais vantagens e desvantagens de cada modelo.

2.1 Modelos Induzidos por Cancerígenos

A carcinogênese é dividida em iniciação, promoção e progressão maligna do tumor. Vários agentes cancerígenos podem ser usados para induzir as etapas da carcinogênese, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, aminas aromáticas, N-nitrosaminas, aflatoxinas e outros, bem como agentes físicos (por exemplo, irradiação UV, radiação ionizante), ou agentes virais que apresentam um potencial carcinogênico, que não causam câncer por si só, mas podem causar quando em sinergismo com a atividade de outro agente cancerígeno (ABEL *et al.*, 2009).

Protocolos padronizados de várias etapas podem ser utilizados para induzir a carcinogênese de pele murina. Nesse modelo, os camundongos recebem, de forma subcutânea, uma dose única de um carcinógeno, como o hidrocarboneto aromático policíclico (por exemplo, dimetilbenz-[a]-antraceno) para iniciação, que induzirá danos genéticos irreversíveis, bem como alterações epigenéticas. Posteriormente, o promotor de tumor 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato é aplicado repetidamente, o que expande seletivamente clones de células iniciadas pela ativação direta da sinalização da proteína quinase C. Como consequência, as células do microambiente tumoral também são ativadas e reprogramadas (ABEL *et al.*, 2009).

Essas abordagens podem ser aplicadas em animais com diferentes origens genéticas e são frequentemente usadas para analisar medidas quimiopreventivas e identificar fatores de risco. Embora a resposta de camundongos e homens em relação a carcinógenos distintos seja diferente, em muitas situações, e a extrapolação do estudo experimental para a condição humana exija cautela, a relevância de tais modelos ainda prevalece.

2.2 Modelos de Xenoenxertos Derivados de Linhagens Celulares (CDX)

Os modelos de camundongos para estudos pré-clínicos co-evoluíram com o desenvolvimento da terapia do câncer. Os primeiros modelos foram construídos através do transplante de tumores murinos em camundongos hospedeiros imunocompetentes (DEVITA; CHU, 2008; TALMADGE *et al.*, 2007).

Durante os anos 1980, pesquisadores iniciaram os estudos para compreender os mecanismos de metástase utilizando linhagens celulares de tumores humanos e murinos. Investigações conduzidas por Fidler e Hart (1982) demonstraram que a metástase não é aleatória, mas seletiva e dependente do local da injeção, apoiando, dessa forma, o estabelecimento de modelos “ortotópicos” (TALMADGE *et al.*, 2007).

Desde então, os estudos têm se baseado em modelos de transplante de CDX (do inglês, *Cell-line derived xenograft*, nos quais os tumores se desenvolvem após injeção subcutânea de células can-

cerígenas humanas, cultivadas *in vitro*, em camundongos imunocomprometidos (DEVITA; CHU, 2008; TALMADGE *et al.*, 2007).

Modelos de camundongos provenientes de xenoenxerto de linhagens celulares de câncer humano, ou modelo CDX, ou de aloenxerto de células tumorais murinas, são os modelos de tumor *in vivo* mais usados na pesquisa. Esses modelos de transplante permitem a análise de possíveis genes relacionados ao câncer, bem como são frequentemente usados para testes pré-clínicos de diversas drogas (KERSTEN *et al.*, 2017).

Alguns estudos utilizando o modelo CDX tiveram evidente importância para o tratamento do câncer, como, por exemplo, o estudo de Prahallad *et al.* (2012), o qual forneceu informações sobre os mecanismos relacionados à resistência intrínseca do câncer colorretal (CRC) ao vemurafenib (inibidor seletivo de proliferação celular tumoral). Os resultados desse estudo levaram ao início de um ensaio clínico no qual os pacientes com CRC foram tratados com uma nova terapia combinada, ilustrando a utilidade dos modelos de xenotransplante no estabelecimento de novas estratégias de tratamento. Estudos com esse modelo também identificaram padrões de expressão gênica que elucidam a colonização metastática (BOS *et al.*, 2009), bem como revelaram que as células de câncer de mama, disseminadas, residem adjacentes aos vasos sanguíneos, o que pode fornecer dados de padrões de metástase (GHAJAR *et al.*, 2013).

Esses modelos apresentam fácil manutenção; podem ser produzidos por diversas configurações laboratoriais, e foram utili-

zados com sucesso para identificar grande diversidade de drogas citotóxicas, levando a tratamentos quimioterápicos que ainda predominam no acompanhamento clínico do câncer. Contudo, uma desvantagem desse modelo é o tempo médio para a descoberta e implantação de novos fármacos, desde a indução até a prática clínica, que é de aproximadamente 12 anos, além de apresentar um custo médio estimado de US\$ 0,5 a US\$ 2,0 bilhões (ADAMS; BRANTNER, 2006).

Embora o aloenxerto de células cancerígenas murinas possa ser realizado em hospedeiros imunocompetentes, o xenotransplante deve ser realizado em camundongos imunocomprometidos para evitar a rejeição, o que os torna menos adequados para o estudo dos papéis do sistema imunológico no desenvolvimento de tumores e na resposta à terapia (KERSTEN *et al.*, 2017).

A maioria das pesquisas contra o câncer falha na avaliação da eficácia das fases clínicas II e III, e essa observação indica que a prática pré-clínica padrão atual não está abordando de forma adequada os desafios complexos para o sucesso do tratamento, como, por exemplo, respostas imunes do hospedeiro, heterogeneidade do câncer e resistência a medicamentos. Conseqüentemente, o sistema não pode ser usado para otimizar uma infinidade de variáveis conhecidas, por influenciar os resultados terapêuticos, como terapias combinatórias, esquemas de dosagem e métodos de administração de medicamentos (AL-LAZIKANI; BANERJI; WORKMAN, 2012).

As linhagens de células cancerígenas contêm múltiplas mutações e ainda adquirem mais enquanto são cultivadas *in vitro* por longos períodos; dessa forma, esses modelos CDX não refletem a morfologia e heterogeneidade genética dos cânceres humanos de forma fidedigna e, portanto, são, na sua maioria preditores fracos de resposta clínica (KERSTEN *et al.*, 2017).

Apesar dessas desvantagens, os modelos CDXs continuam sendo valiosos na identificação de agentes citotóxicos; na avaliação primária da toxicidade de medicamentos; e na análise de mecanismos de resistência (TEICHER, 2006, GARRAWAY; JAÉNNE, 2012).

2.3 Modelos de Xenoenxerto Derivados de Pacientes (PDX)

Os xenoenxertos de tumores derivados de pacientes (PDTX, do inglês *Patient-derived tumor tissue xenografts*) são derivados de biópsias de tumor humano fresco, que são transplantadas em camundongos imunodeficientes. Diferentemente dos modelos de transplante de linhagens celulares, os tumores PDTX mantêm a heterogeneidade molecular, genética e histológica observada em pacientes com câncer, mesmo após algumas passagens em série em camundongos (HIDALGO *et al.*, 2014).

Em relação aos modelos CDX, camundongos imunocomprometidos de modelos PDX mimetizam mais fielmente as doenças humanas, uma vez que o tecido intacto humano preserva a arquitetura do tumor, além de ser transferido diretamente para os camundongos receptores, não é comprometido pela adaptação da

cultura celular *in vitro*. Resultados promissores nesses modelos foram demonstrados pela primeira vez no estudo de Fiebig *et al.* (1984) quando o uso de agentes quimioterapêuticos, como alcaloides e antimetabólitos provocaram respostas semelhantes em camundongos e pacientes (MATTERN *et al.*, 1988).

Os modelos PDTX podem ser ferramentas valiosas para definir novas formas terapêuticas, como demonstrado pelo rastreamento pré-clínico de medicamentos para câncer de pulmão (MERK *et al.*, 2011); câncer de mama (MARANGONI *et al.*, 2007); melanoma (GIROTTI *et al.*, 2016); câncer de próstata (QU *et al.*, 2014); e câncer colorretal (ZANELLA *et al.*, 2015).

Os tumores murinos induzidos pelo modelo PDX podem, nas primeiras passagens, reter a composição estromal e a heterogeneidade histológica e molecular característica dos pacientes. Como essas propriedades afetam criticamente as respostas terapêuticas e a especificidade dos biomarcadores, os modelos PDX constituem um modelo pré-clínico de abordagem para algumas das barreiras mais desafiadoras à terapia. Além disso, a especificidade do alvo permite a avaliação direta de terapêuticas específicas para humanos, como anticorpos, no desenvolvimento clínico (HIDALGO *et al.*, 2014; TENTLER *et al.*, 2012).

Para alguns tipos de câncer, como certos melanomas, câncer de pulmão e colorretal, as taxas de transplante podem chegar a 75% e o tempo necessário para o crescimento do tumor pode ser de dois a quatro meses. No entanto, essas características variam

amplamente, dependendo do tipo e da quantidade da amostra (por exemplo, tecido de biópsia fresco, aspirado por agulha fina, células tumorais circulantes), origem do tumor, propriedades moleculares e cepa receptora (TALMADGE *et al.*, 2007).

Em relação aos transplantes subcutâneos, os tumores transferidos ortotopicamente para os órgãos de origem têm mais probabilidade de manter características do microambiente tumoral. No entanto, a produção ortotópica de PDX é tecnicamente desafiadora e, para a maioria dos tipos de câncer, o crescimento e as respostas do tumor devem ser monitorados por meio de imagens longitudinais caras e muitas vezes trabalhosas. Assim, atualmente, os estudos terapêuticos pré-clínicos utilizam exclusivamente modelos subcutâneos (TALMADGE *et al.*, 2007).

Outra limitação desse modelo é que deve ser utilizado com o mínimo possível de passagens, devido às alterações que podem surgir e, portanto, os estudos terapêuticos são mais representativos nos modelos de poucas passagens. Isso se deve ao fato de os componentes do estroma humano serem mantidos por apenas duas a três passagens e, assim, os elementos do estroma murino passam a se tornar dominantes (ROSFJORD *et al.*, 2014).

Outro fator importante a ser considerado é a possibilidade de rejeição pelo sistema imune e, para contorná-la, os tumores cancerígenos humanos devem ser transplantados em camundongos imunocomprometidos. Dentre esses modelos receptores comumente usados, podem ser citados:

– Cepa Nude: Esses animais apresentam um gene recessivo autossômico no cromossomo 11, que causa, além da falta de pelos, um timo rudimentar ou a total ausência dele, o que faz com que os animais tenham deficiência na produção de linfócitos T. Em consequência disso, os animais não rejeitam transplantes de outras linhagens e sua susceptibilidade às infecções é muito alta.

– Cepa SCID: Os animais apresentam um gene recessivo autossômico, situado no cromossomo 16. Os camundongos mutantes apresentam o processo de reparo do DNA defeituoso, assim, os pedaços de DNA são ligados de forma errada. Dessa forma, esses animais não produzem imunoglobulinas dos tipos IgA, IgM ou IgG, ou apresentam mínimos níveis. Os órgãos linfoides apresentam-se bem inferiores ao tamanho normal. Timo, linfonodos e o baço estão completamente destituídos de linfócitos. Assim, estes animais são totalmente deficientes de linfócitos T e B e suas células esplênicas não respondem a estímulos de mitose para células B ou T; por essa razão, não rejeitam transplantes.

– Cepa NOD/SCID: Animais diabéticos não obesos (NOD, do inglês *Non-obese diabetic*) suscetíveis a diabetes com a mutação SCID. Os múltiplos defeitos de imunidade, exclusivos desse modelo, fornecem um excelente sistema de reconstituição com células hematopoiéticas humanas, resultando em modelos excepcionais para pesquisa de HIV-1 e terapia genética. Modelo útil para pesquisa de câncer em aumento da incidência de tumores, particularmente linfomas e tumores tímicos (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002).

Dada a complexa interferência entre os componentes imunes adaptativos, o sistema imunológico inato e as células cancerígenas, é importante destacar que os modelos PDTX podem fornecer dados clinicamente valiosos, embora sem a influência do sistema imunológico adaptativo, o que, infelizmente, não mimetiza o que de fato acontece em humanos (KERSTEN *et al.*, 2017), uma vez que os modelos PDTX devem ser desenvolvidos em camundongos imunocomprometidos, evitando assim a atividade antitumoral e pró-tumoral fornecida pelo sistema imunológico adaptativo.

Vale ressaltar que tecnologias para “humanizar” o sistema imunológico de camundongos imunocomprometidos transplantando células-tronco hematopoiéticas CD34+ humanas purificadas, bem como outras estratégias, têm sido desenvolvidas (LEGRAND *et al.*, 2009; SHULTZ *et al.*, 2014). No entanto, o alto custo dos camundongos receptores; as limitações na aquisição da medula óssea humana; a variabilidade do enxerto; e as demandas por técnicas, atualmente, impedem o uso desses modelos na descoberta terapêutica pré-clínica. Apesar das limitações e dos desafios para a aplicação pré-clínica de rotina, vários estudos utilizando o modelo PDX têm se mostrado eficazes (DAS THAKUR *et al.*, 2013; MALANEY; NICOSIA; DAVE 2014; GIROTTI *et al.*, 2015).

2.4 Modelos de Câncer de Camundongos Geneticamente Modificados (GEM)

No início dos anos 1980, os primeiros genes cancerígenos foram clonados em camundongos transgênicos, então denominados

oncomices (HANAHAN; WAGNER; PALMITER, 2007). O primeiro *oncomouse* foi um GEM com expressão transgênica do oncogene v-HRas (do inglês *Harvey rat sarcoma viral*) sob controle do promotor específico mamário MMTV (do inglês *Mouse mammary tumor virus*), tornando o camundongo propenso a desenvolver tumores mamários (SINN *et al.*, 1987). Com o incremento da tecnologia de *gene targeting*, em 1992, a predisposição ao câncer em camundongos *knockout* para genes supressores de tumor (TSG/*tumor suppressor genes*) também pôde ser estudada (FINLAY, 1992).

De todos os modelos de câncer murinos, os GEMs representam, de forma mais completa, o desenvolvimento do câncer; visto que a doença se manifesta desde a iniciação até a progressão, coevoluindo com o estroma intrínseco, além de possuírem um sistema imunológico intacto. No entanto, os modelos GEM são os mais desafiadores para se trabalhar, uma vez que as diferenças entre as espécies devem ser cuidadosamente consideradas. Por outro lado, esses modelos fornecem a possibilidade de administração de medicamentos, a resposta terapêutica e a expressão de biomarcadores para cânceres que evoluem dentro de seu microambiente natural (cânceres autóctones) (DAY; MERLINO; VAN DYKE, 2015).

Embora os *oncomices* e os camundongos TSG *knockout* tenham fornecido conhecimentos importantes, também apresentam limitações. Uma vez que os transgenes são expressos em todas as células de um tecido em particular e os TSGs em camundongos

knockout são inativados em todas as células do animal, esses modelos falham em imitar cânceres esporádicos, nos quais o acúmulo de eventos genéticos em uma única célula resulta na formação do tumor. Para contornar essa situação, foram desenvolvidos modelos de camundongos mais sofisticados, que permitem a inativação somática de supressores de tumores ou a ativação de oncogenes (mutantes) em GEMs condicionais (JONKERS; BERNIS, 2002).

Um dos primeiros exemplos é a geração de um modelo de câncer colorretal de camundongo usando a inativação somática do gene APC (do inglês *Adenomatous polyposis coli*) mediada por *Cre-loxP* (Recombinação Cre-Lox é uma tecnologia de recombinação sítio-específica, cujo nome vem do uso da enzima Cre-recombinase e sítios loxP). Com essa técnica, qualquer gene flanqueado pelos locais de recombinação do *loxP* será excluído após a ativação da *Cre*-recombinase.

Mutações no gene APC são responsáveis pela FAP (do inglês *Familial adenomatous polyposis*), uma doença caracterizada pelo aparecimento de milhares de adenomas colorretais (SHIBATA *et al.*, 1997). Ao introduzir mutações associadas a um tipo específico de câncer, pode-se gerar modelos de camundongos que imitam de perto as características histopatológicas, moleculares e clínicas dos tumores em pacientes (WALRATH *et al.*, 2010).

Embora possa ser aplicado para alterar a expressão de mais de um gene, o sistema *Cre-loxP* o faz de forma simultânea e, portanto, não imita completamente o acúmulo sequencial de mutações

durante a carcinogênese normal. Dessa forma, foi desenvolvido um sistema de indução de recombinase dupla que combina os sistemas de recombinação *Flp-FRT* e *Cre-loxP*, permitindo a manipulação genética sequencial da expressão gênica por dois sistemas de recombinação independentes.

A recombinação Flp-FRT é uma tecnologia cada vez mais usada para manipular o DNA de um organismo sob condições controladas *in vivo*. É análogo à recombinação *Cre-lox*, mas envolve a recombinação de sequências entre locais de alvo de reconhecimento de *flippase curta* (FRT) pela *flippase recombinase* (Flp). Essa abordagem proporciona o direcionamento independente de vias ou processos autônomos e não autônomos de células tumorais; a indução sequencial de mutações para modelar a carcinogênese em várias etapas e a validação genética de alvos terapêuticos em tumores autóctones (SCHOËNHUBER *et al.*, 2014).

Embora os GEMs tenham se mostrado ferramentas valiosas para a pesquisa do câncer, ainda existem aspectos que podem ser aprimorados. Uma grande limitação dos GEMs da linha germinativa é que o desenvolvimento e a validação desses modelos são demorados, laboriosos e caros. O número cada vez maior de mutações identificadas nos estudos de sequenciamento de câncer exige novas estratégias para o desenvolvimento de modelos de camundongos que possibilitem uma avaliação *in vivo* mais rápida de genes candidatos ao crescimento do câncer, bem como mutações relevantes em GEMs não germinativos (KERSTEN *et al.*, 2017).

Na pesquisa básica, inúmeros modelos de câncer do tipo GEM têm sido estudados, e muitos são usados atualmente em avaliações pré-clínicas. Embora nenhum modelo possa capturar perfeitamente a condição humana, vários modelos de GEM desenvolvem a doença cancerígena com notável semelhança molecular e patológica com os humanos.

De fato, vários estudos mostram que esse modelo, sendo bem projetado, pode contribuir para melhorar os ensaios clínicos, não apenas na identificação de terapias potenciais, mas também na previsão de efeitos positivos e negativos, em nível molecular. Uma das principais vantagens desse modelo é a flexibilidade de desenvolver animais com diferentes especificidades moleculares (DAY; MERLINO; VAN DYKE, 2015). No entanto, como a maioria dos GEMs estabelecidos foi criada para a terapia básica, muitos não modelam com precisão algumas doenças. Além disso, certas abordagens podem provocar anomalias indesejáveis. Portanto, a escolha do modelo apropriado para determinada pesquisa pré-clínica requer profunda compreensão da biologia e genética do câncer (DAY; MERLINO; VAN DYKE, 2015).

2.5 Modelos de Câncer de Camundongo Baseado em Células-Tronco Embrionárias

Para acelerar a geração de novos GEMs de câncer humano, as células-tronco embrionárias podem ser geneticamente alteradas e usadas para produzir modelos de GEMs não germinativos (HEYER

et al., 2010). Essas células tronco derivadas do GEM podem ser usadas para introduzir modificações genéticas adicionais nesse animal e ainda produzir camundongos quiméricos que mostram as mesmas características do GEM que o gerou, mas que agora contém a modificação genética adicional (HUIJBERS *et al.*, 2014).

Como exemplo para essa estratégia, pode ser citada a introdução do proto-oncogene *Met* (do inglês *Mesenchymal epithelial transition fator*) em um modelo de camundongo GEM, de câncer de mama associado a *BRCA1* (do inglês *Breast cancer 1* - gene humano pertencente à classe dos genes supressores de tumor), produzindo um novo modelo de camundongo para câncer de mama metaplásico deficiente em *BRCA1*. Enquanto os carcinomas mamários de camundongo com deficiência de *BRCA1* mostraram alta sensibilidade ao olaparib, inibidor clínico da *PARP* (poli *ADP-ribose polimerase*), os tumores mamários metaplásicos com deficiência de *BRCA1* foram resistentes (HENNEMAN *et al.*, 2015).

2.6 RNA de Interferência *in Vivo*

Várias tecnologias podem ser empregadas para projetar a linhagem germinativa de camundongos. Editando o genoma de células-tronco embrionárias, ou dos zigotos, os camundongos podem ser programados para a interrupção específica de genes supressores de tumores por meio de mutação direta ou expressão de RNAs de interferência (RNAi) e para expressão de oncogene em níveis fisiológicos ou análogos ao câncer (WALRATH *et al.*, 2010).

O uso de RNA de interferência (RNAi) permite o silenciamento reversível da expressão gênica, sem modificar o genoma e, portanto, pode ser usado como uma alternativa às abordagens de inativação de genes baseados em recombinação homóloga (ZENDER et al., 2008). Os testes genéticos baseados em RNAi provaram ser ferramentas poderosas para identificar e validar, de forma eficiente, os genes cancerígenos.

Essa estratégia foi usada com sucesso para identificar novos TSGs em modelos de camundongos de carcinoma hepatocelular e linfoma (BRIC et al., 2009) e para identificar genes envolvidos na resistência ao inibidor de tirosina-quinase (sorafenib) no câncer de fígado (RUDALSKA et al., 2014).

2.7 Edição de Genoma com a Tecnologia CRISPR/Cas9

Embora os métodos tradicionais utilizados para construir alterações genéticas específicas exijam prazos significativos, o recente desenvolvimento de abordagens rápidas direcionadas a sequências específicas, reduziu esse tempo para semanas, em vez de muitos meses. Em particular, a tecnologia CRISPR/Cas9 (do inglês *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, Cas9* - endonuclease) está acelerando a engenharia da linha germinativa (MOU et al., 2015).

O sistema CRISPR (repetições palindrômicas curtas interespaçadas regularmente agrupadas/Cas9) foi descoberto pela primeira vez como uma alternativa imunológica procariótica que con-

fere resistência a elementos genéticos estranhos, mas logo depois foi explorado para obter a edição de genes (JANSEN *et al.*, 2002). Ao usar RNAs específicos como guia (sgRNAs), a nuclease Cas9 pode ser direcionada para qualquer locus genômico, onde induz a clivagem da cadeia dupla do DNA alvo, levando ao nocaute genético (CONG *et al.*, 2013).

O sistema CRISPR/Cas9 também pode ser usado para introduzir mutações definidas ou locais de recombinação *loxP/FRT*, simplesmente cointroduzindo oligonucleotídeos que podem servir como modelo para o reparo da ruptura induzida por Cas9 (YANG; WANG; JAENISCH, 2014).

A tecnologia CRISPR/Cas9 é o sistema de escolha para modelagem rápida e eficiente de camundongos para a pesquisa do câncer, uma vez que provou ser excelente estratégia de *gene targeting* (SANCHEZ-RIVERA; JACKS, 2015). De fato, todas as combinações de alterações genéticas encontradas em tumores humanos, com essa tecnologia, podem ser rapidamente introduzidas na linha germinativa do camundongo, incluindo deleções gênicas (condicionais), mutações pontuais (WANG *et al.*, 2013) e translocações (TORRES *et al.*, 2014).

Outros grupos usaram com sucesso a tecnologia CRISPR/Cas9 para a edição somática de oncogenes e TSGs em camundongos. Esses esforços levaram a uma nova geração de modelos não germinativos de carcinoma hepatocelular (WEBER *et al.*, 2015); câncer de pulmão (PLATT *et al.*, 2014); câncer no cérebro (ZUCKERMANN *et al.*, 2015); dentre outros.

Embora extremamente poderosos, os sistemas baseados em CRISPR/Cas9 para edição *in vivo* de genes também podem ter algumas desvantagens. Um exemplo dessas possíveis desvantagens é que as estratégias atuais não são adequadas para validar o potencial oncogênico de oncogenes putativos, uma vez que sistemas baseados em CRISPRa (modificado para induzir a ativação do gene-alvo) podem ser usados para ativar a transcrição de genes-alvo (BRAUN *et al.*, 2016). Além disso, a Cas9 pode desencadear respostas imunes específicas, resultando na eliminação de células que expressam Cas9 (WANG *et al.*, 2015). Para contornar esse problema, experimentos devem ser realizados em animais ou camundongos imunodeficientes, projetados para desenvolver tolerância imunológica ao Cas9.

Embora os modelos GEM autóctones tenham grande utilidade, a maioria apresenta alto custo, prazos longos de criação, complexidade na criação ou dificuldades na obtenção da tumorigênese. A análise pré-clínica de lesões metastáticas é outro aspecto desafiador e os tumores primários surgem sem cronograma confiável, como ocorre nos seres humanos, e múltiplos tumores podem se desenvolver (DAY; MERLINO; VAN DYKE, 2015).

O advento da tecnologia CRISPR/Cas9, com a capacidade de executar edição genética com relativa facilidade e velocidade, aumentou significativamente o valor dos modelos de animais GEM de linhagens não germinativas. Vários grupos modificaram precisamente oncogenes e genes supressores de tumores diretamente

em células somáticas de camundongos adultos, melhorando significativamente a viabilidade e flexibilidade dessa abordagem de engenharia genética (CHEN *et al.*, 2015; PLATT *et al.*, 2014).

Quadro 1 – Vantagens e desvantagens de diferentes modelos de câncer em camundongos

Modelos	Vantagens	Desvantagens
Indução por carcinógenos	Tumores induzidos por carcinógenos químicos das próprias células do hospedeiro. O câncer assemelha-se ao câncer clínico humano.	Possíveis efeitos do carcinógeno sobre o comportamento do tumor. Possível perigo e risco de carcinógeno/seus metabólitos excretados nas fezes e na urina (para outros animais e o pesquisador). Longo tempo para indução.
Inoculação de linhagem celular (CDX - ectópico)	Rápido, barato, tecnicamente simples. Envolve células tumorais humanas. Facilidade de medição do volume do tumor.	Necessidade de hospedeiro imunocomprometido. Restrição de crescimento para alguns subtipos. Crescimento periférico do tumor. Limitação para doença na fase avançada.
Inoculação de linhagem celular (CDX - ortotópico)	Microambiente apropriado. Tamanho do tumor mensurável	Mais complexo tecnicamente em comparação a modelos ectópicos. Necessidade de hospedeiro imunocomprometido. Restrição de crescimento para alguns subtipos. Modelos apenas para a doença na fase avançada.
Xenoinxerto de tumor derivado do paciente (PDTX)	Possibilidade de implantação de células tumorais humanas ou fragmentos. Manutenção de características histopatológicas e perfis genéticos dos tumores originais do paciente.	Requer acesso ao material fresco do paciente. Custo relativamente alto. Necessidade de hospedeiro imunocomprometido. Substituição do estroma do rato pelo humano após passagens sucessivas. Tempo de indução prolongado.

GEMs convencionais	<p>Manutenção do microambiente natural. Sistema imunológico permanece intacto. Pode ser utilizado em estágios iniciais e tardios da progressão do tumor modelados. Pode ser metastático.</p>	<p>Não representatividade genética da doença humana. Possibilidade de ocorrer integração descontrolada do transgene. Falta controle temporal. Limitado para certas terapias (ex.: anticorpo monoclonal).</p>
GEMs condicionais	<p>Manutenção do microambiente natural. Sistema imunológico permanece intacto. Estágios iniciais e tardios da progressão do tumor. Histopatologia representativa. Iniciação tumoral controlada.</p>	<p>Baixa frequência de metástase. Extensos programas de reprodução envolvidos. Alto custo de tempo. Expressão/atividade indesejável em diferentes tecidos. Limitado para certas terapias (ex.: anticorpo monoclonal).</p>

Fonte: Elaborado pela autora.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo do câncer tem sido uma das áreas mais fascinantes da pesquisa científica e o aspecto mais interessante é a sua diversidade, incluindo o estudo sobre a origem e a localização da doença, os tipos de células envolvidas, os alvos moleculares de medicamentos; e as abordagens que podem ser adotadas para melhorar o diagnóstico e o tratamento. Além disso, a busca por medicamentos contra o câncer continua a evoluir rapidamente, utilizando vários recursos para a descoberta, o *design* e teste de medicamentos, com o objetivo final de tornar a doença curável.

Não está claro se é possível desenvolver modelos ideais de câncer em camundongos. Considerando as diferenças significativas entre as espécies de camundongos e os humanos, é improvável

vel que os modelos de camundongos substituam a pesquisa em amostras de tumores humanos, linhagens de células e pacientes. Atualmente, não existe um modelo ideal para estudar o câncer.

No entanto, os estudos têm sido muito eficientes para identificar genes e testar drogas anticancerígenas, mas apresentam heterogeneidade e complexidade; dependem de correlação e fornecem poucas informações sobre a função dos genes e mecanismos de desenvolvimento de tumores. Além disso, os modelos de camundongos são muito úteis no estudo da função dos genes e das vias específicas, que desempenham um papel na progressão do tumor; no entanto, não são os modelos ideais para testar drogas anticâncer. Portanto, são necessárias abordagens combinatórias que utilizem vários sistemas modelo para esclarecer a complexidade dos cânceres humanos e permitir a descoberta de novas terapias.

REFERÊNCIAS

- ABEL, E. L. *et al.* Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: Fundamentals and applications. *Nat Protoc*, v. 4, p. 1350-1362, 2009.
- ADAMS, C. P.; BRANTNER, V. V. Estimating the cost of new drug development: is it really 802 million dollars? *Health Aff. (Millwood)*, v. 25, p. 420-428, 2006.
- AI-LAZIKANI, B.; BANERJI, U.; WORKMAN, P. Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. *Nat. Biotechnol*, v. 30, p. 679-692, 2012.
- ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. *Animais de Laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. 388p.
- BOCK, B. C. *et al.* Mouse models of human cancer. *Cancer Research*, v. 74, p. 1-5, 2014.
- BOS, P. D. *et al.* Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature*, v. 459, p. 1.005-1.009, 2009.

BRAUN, C. J. *et al.* Versatile in vivo regulation of tumor phenotypes by dCas-9-mediated transcriptional perturbation. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 113, p. E3.892-E3.900, 2016.

BRIC, A. *et al.* Functional identification of tumor suppressor genes through an in vivo RNA interference screen in a mouse lymphoma model. *Cancer Cell*, v. 16, p. 324-335, 2009.

Chen, S. *et al.* Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis. *Cell*, v. 160, p. 1246-1260, 2015.

CHEON, D.-J.; ORSULIC, S. Mouse models of cancer. *Annu Rev Pathol*, v. 6, p. 95-119, 2011. DOI 10.1146/annurev.pathol.3.121806.154244.

CONG, L. *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, v. 339, p. 819-823, 2013.

DAS THAKUR, M. *et al.* Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance. *Nature*, v. 494, p. 251-255, 2013.

DAY, C. P.; MERLINO, G.; VAN DYKE, T. Preclinical mouse cancer models: A maze of opportunities and challenges. *Cell*, v. 163, n. 1, p. 39-53, 2015. DOI 10.1016/j.cell.2015.08.068

DEVITA, V. T.; CHU, E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res*, v. 68, p. 8.643-8.653, 2008.

FIDLER, I. J.; HART, I. R. Biological diversity in metastatic neoplasms: Origins and implications. *Science*, v. 217, p. 998-1003, 1982.

FIEBIG, H. H. *et al.* Comparison of tumor response in nude mice and in the patients. *Behring Inst. Mitt*, v. 74, p. 343-352, 1984.

FINLAY, C. A. p53 loss of function: Implications for the processes of immortalization and tumorigenesis. *BioEssays*, v. 14, p. 557-560, 1992.

GHAJAR, C. M. *et al.* The perivascular niche regulates breast tumour dormancy. *Nat Cell Biol*, v. 15, p. 807-817, 2013.

GIROTTI, M. R. *et al.* Application of sequencing, liquid biopsies, and patient-derived xenografts for personalized medicine in melanoma. *Cancer Discov*, v. 6, p. 286-299, 2015.

- GOFFEAU, A. *et al.* Life with 6000 genes. *Science*, v. 274, n. 546, p. 63-67, 1996.
- GONZALEZ, C. *Drosophila melanogaster*: A model and a tool to investigate malignancy and identify new therapeutics. *Nat Rev Cancer*, v. 13, p. 172-183, 2013.
- HANAHAN, D.; WAGNER, E. F.; PALMITER, R. D. The origins of oncomice: A history of the first transgenic mice genetically engineered to develop cancer. *Genes Dev*, v. 21, p. 2258-2270, 2007.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*, v. 100, n.1, p. 57-70, 2000.
- HANN, B., BALMAIN, A. Building validated mouse models of human cancer. *Curr Opin Biol*, v. 13, n. 6, p. 778-784, 2001.
- HENNEMAN, L. *et al.* Selective resistance to the PARP inhibitor olaparib in a mouse model for BRCA1-deficient metaplastic breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 112, p. 8409-8414, 2015.
- HEYER, J. *et al.* Non-germline genetically engineered mouse models for translational cancer research. *Nat Rev Cancer*, v. 10, p. 470-480, 2010.
- HIDALGO, M. *et al.* Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discov*, v. 4, p. 998-1013, 2014.
- HUIJBERS, I. J. *et al.* Rapid target gene validation in complex cancer mouse models using re-derived embryonic stem cells. *EMBO Mol Med*, v. 6, p. 212-225, 2014.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Global cancer observatory. 2021. Disponível em: <https://gco.iarc.fr>. Acesso em: 28 jul. 2021.
- JANSEN, R. *et al.* Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*, v. 43, p. 1565-1575, 2002.
- JONKERS, J.; BERNIS, A. Conditional mouse models of sporadic cancer. *Nat Rev Cancer*, v. 2, p. 251-265, 2002.
- KERSTEN, K. *et al.* Genetically engineered mouse models in oncology research and cancer medicine. *EMBO Mol Med*, v. 9, n. 2, p. 137-153, 2017. DOI 10.15252/emmm.201606857.
- LEGRAND, N. *et al.* Humanized mice for modeling human infectious disease: challenges, progress, and outlook. *Cell Host Microbe*, v. 6, p. 5-9, 2009.

- MALANEY, P.; NICOSIA, S. V.; DAVE, V. One mouse, one patient paradigm: New avatars of personalized cancer therapy. *Cancer Lett*, v. 344, p. 1-12, 2014.
- MARANGONI, E. *et al.* A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays. *Clin Cancer Res*, v. 13, p. 3989-3998, 2007.
- MATTERN, J. *et al.* Human tumor xenografts as model for drug testing. *Cancer Metastasis Rev*, v. 7, p. 263-284, 1988.
- MENDES, N. *et al.* Animal models to study cancer and its microenvironment *in* tumor microenvironment. *Adv Exp Med Biol, J. Serpa (ed.)* v. 1.219, p. 389-401, 2020. DOI 10.1007/978-3-030-34025-4_20.
- MERK, J. *et al.* Chemoresistance in nonsmall-cell lung cancer: can multidrug resistance markers predict the response of xenograft lung cancer models to chemotherapy? *Eur J Cardiothorac Surg*, v. 40, p. 29-33, 2011.
- MOU, H. *et al.* Precision cancer mouse models through genome editing with CRISPR-Cas9. *Genome Med*, v. 7, p. 53, 2015.
- NUTT, L. K. The xenopus oocyte: a model for studying the metabolic regulation of cancer cell death. *Sem Cell Dev Biol*, v. 23, p. 412-418, 2012.
- PLATT, R. J. *et al.* CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell*, v. 159, p. 440-455, 2014.
- POTTS, M. B.; CAMERON, S. Cell lineage and cell death: *Caenorhabditis elegans* and cancer research. *Nat Rev Cancer*, v. 11, p. 50-58, 2011.
- PRAHALLAD, A. *et al.* Unresponsiveness of colon cancer to BRAF (V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature*, v. 483, p. 100-103, 2012.
- QU, S. *et al.* Enhanced anticancer activity of a combination of docetaxel and Aneustat (OMN54) in a patient-derived, advanced prostate cancer tissue xenograft model. *Mol Oncol*, v. 8, p. 311-322, 2014.
- ROSFJORD, E. *et al.* Advances in patient-derived tumor xenografts: From target identification to predicting clinical response rates in oncology. *Biochem. Pharmacol*, v. 91, p. 135-143, 2014.
- RUDALSKA, R. *et al.* In vivo RNAi screening identifies a mechanism of sorafenib resistance in liver cancer. *Nat Med*, v. 20, p. 1.138-1.146, 2014.

- SÁNCHEZ-RIVERA, F. J.; JACKS, T. Applications of the CRISPR-Cas9 system in cancer biology. *Nat Rev Cancer*, v. 15, p. 387-395, 2015.
- SCHÖNHUBER, N. *et al.* A next-generation dual-recombinase system for time- and host-specific targeting of pancreatic cancer. *Nat Med*, v. 20, p. 1340-1347, 2014.
- SHIBATA, H. *et al.* Rapid colorectal adenoma formation initiated by conditional targeting of the Apc gene. *Science*, v. 278, p. 120-123, 1997.
- SHULTZ, L. D. *et al.* Human cancer growth and therapy in immunodeficient mouse models. Cold Spring Harb. *Protoc*, v. 2014, p. 694-708, 2014.
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*, v. 67, p. 7-30, 2017.
- SINN, E. *et al.* Coexpression of MMTV/v-Ha-ras and MMTV/c-myc genes in transgenic mice: Synergistic action of oncogenes in vivo. *Cell*, v. 49, p. 465-475, 1987.
- TALMADGE, J. E. *et al.* Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. *Am. J. Pathol*, v. 170, p. 793-804, 2007.
- TEICHER, B. A. Tumor models for efficacy determination. *Mol. Cancer Ther*, v. 5, p. 2.435-2.443, 2006.
- TENTLER, J. J. *et al.* Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nat. Rev. Clin. Oncol*, v. 9, p. 338-350, 2012.
- TORRES, R. *et al.* Engineering human tumour-associated chromosomal translocations with the RNA-guided CRISPR-Cas9 system. *Nat Commun*, v. 5, 2014.
- WALRATH, J. C. *et al.* Genetically engineered mouse models in cancer research. *Adv Cancer Res*, v. 106, p. 113-164, 2010.
- WANG, D. *et al.* Adenovirus-mediated somatic genome editing of Pten by CRISPR/Cas9 in mouse liver in spite of Cas9-specific immune responses. *Hum Gene Ther*, v. 26, p. 432-442, 2015.
- WANG, H. *et al.* One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, v. 153, p. 910-918, 2013.
- WEBER, J. *et al.* CRISPR/Cas9 somatic multiplex-mutagenesis for high-throughput functional cancer genomics in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 112, p. 13.982-13.987, 2015.

WHITE, R.; ROSE, K.; ZON, L. Zebrafish cancer: the state of the art and the path forward. *Nat Rev Cancer*, v. 13, p. 624-636, 2013.

YANG, H.; WANG, H.; JAENISCH, R. Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Nat Protoc*, v. 9, p. 1.956-1.968, 2014.

ZANELLA, E. R. *et al.* IGF2 is an actionable target that identifies a distinct subpopulation of colorectal cancer patients with marginal response to anti-EGFR therapies. *Sci Transl Med*, v. 7, p. 272-312, 2015.

ZENDER, L. *et al.* An oncogenomics-based in vivo RNAi screen identifies tumor suppressors in liver cancer. *Cell*, v. 135, p. 852-864, 2008.

ZUCKERMANN, M. *et al.* Somatic CRISPR/Cas9-mediated tumour suppressor disruption enables versatile brain tumour modelling. *Nat Commun*, v. 6, p. 7.391, 2015.

CAPÍTULO 9 <doi>10.51996/9788574853994.cap9</doi>

MODELOS ANIMAIS DE INVESTIGAÇÃO EM CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA

Thiago Antônio Moretti de Andrade

Daniela Santos Masson-Meyers¹

Naiara Alves

Bianca Scatolin

Resumo: Modelos animais são amplamente utilizados para o estudo da cicatrização cutânea. A escolha do modelo animal ideal, dos tipos de lesões e métodos, com suas especificidades, deve ser planejada antes das investigações, de acordo com a relevância e os critérios de adequação ao estudo, visto que, um modelo, apesar de representar situações reais, sempre deve ter suas limitações bem controladas. Diante disso, no presente capítulo, é destacado o modelo animal em camundongos e ratos, para investigar a cicatrização cutânea. Roedores são os animais mais utilizados em estudos de cicatrização tecidual, devido à facilidade de manuseio, ao baixo custo e ao curto ciclo de vida. Além disso, possuem rápido processo de cicatrização contrátil, o que torna possível avaliar, em dias, os eventos que ocorrem no organismo humano em semanas.

¹ Marquette University School of Dentistry, Milwaukee, Wisconsin, EUA. Os demais autores são vinculados ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biomédicas, Centro Universitário da Fundação Hermínio Ometto (FHO), Araras, São Paulo, Brasil. *E-mail* para correspondência: thiago.andrade@fho.edu.br

Palavras-Chave: Cicatrização cutânea. Lesão contrátil. Modelo Animal. Rato. Camundongo.

RESEARCH ANIMAL MODELS IN SKIN WOUND HEALING

Abstract: Animal models are widely used for the study of skin healing. According to relevance and criteria of suitability for the study, the choice of the ideal animal model, the types of lesions and methods with their specificities must be planned before investigations. A model also should always have its well-controlled limitations. Therefore, this chapter highlights the animal model in mice and rats in the research of skin healing. Rodents are the most used in tissue healing studies due to their ease of handling, low cost, and short life cycle. In addition, they have a fast contractile healing process, making it possible to evaluate in days the events that occur in the human organism in weeks.

Keywords: Cutaneous Healing. Contractile Lesion. Animal Model. Rat. Mouse.

1 INTRODUÇÃO

No presente capítulo, é destacado o modelo animal em camundongos e ratos, para investigar a cicatrização cutânea.

1.1 Cicatrização

Processo fisiológico importante para restaurar a integridade da pele pós-trauma, acidente ou procedimento cirúrgico, a cicatrização,

fisiologicamente, envolve três fases sobrepostas, quais sejam: inflamação, proliferação e remodelamento teciduais (LINDLEY *et al.*, 2016; MASSON-MEYERS *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2018).

Com a lesão, o colágeno subendotelial exposto e o fator tecidual ativam a agregação plaquetária, o que resulta na liberação de fatores quimiotáticos e de crescimento para a hemostasia. Neutrófilos, primeiros leucócitos a serem recrutados para o local da lesão, são responsáveis pela fagocitose.

No entanto, com a sua morte durante a fagocitose, devido à considerável liberação de enzimas e espécies reativas para matar o microrganismo, os neutrófilos são substituídos pelos macrófagos, que continuam a fagocitose, além de liberarem importantes citocinas (IL-1 β : interleucina 1 beta e TNF- α : fator de necrose tumoral alfa – principais pró-inflamatórias; IL-10: interleucina 10 e TGF- β : fator de crescimento transformador beta – citocinas anti-inflamatórias) e fatores de crescimento (VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular e FGF: fator de crescimento de fibroblastos) para estimular a formação do tecido de granulação (SINGH; YOUNG; MCNAUGHT, 2017; WANG *et al.*, 2018).

A inflamação, portanto, favorece a fase proliferativa, estimulando a angiogênese (formação do tecido de granulação), para melhorar o aporte nutricional e de oxigênio no tecido lesionado, uma vez que os leucócitos e fibroblastos estão em intensa atividade fagocítica e proliferativa. Ao mesmo tempo, há proliferação de fibroblastos, para acelerar a produção de matriz extracelular (MEC),

incluindo proteoglicanos, ácido hialurônico, colágeno tipo III e elastina, o que favorece a reepitelização e o fechamento da lesão (RODRIGUES *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2018).

Como fase final da cicatrização, o remodelamento leva à substituição do tecido de granulação por tecido conjuntivo denso, e à recomposição celular da epiderme. Nesse processo, metaloproteinases de matriz (MMPs) realizam a proteólise do colágeno tipo III (menos estável), ao mesmo tempo em que os fibroblastos promovem a síntese do colágeno tipo I (mais estável), impedindo a recidiva da lesão e fortalecendo a cicatriz.

Concomitantemente, a lesão contrai-se em direção ao seu centro, por meio de miofibroblastos derivados de fibroblastos de derme. O TGF- β 1 e o PDGF estimulam os miofibroblastos a produzirem actina, que faz tração nas bordas, além dos queratinócitos da epiderme, que liberam fator de crescimento de queratinócitos (KGF) para estimular a reepitelização associada à contração da lesão (LINDLEY *et al.*, 2016).

Devido à complexidade do processo de cicatrização cutânea e às particularidades dos diferentes modelos experimentais, estudos *in vitro* e *in vivo* são desenvolvidos para compreender os principais mecanismos envolvidos (ANSELL; HOLDEN; HARDMAN, 2012).

Os modelos *in vitro* auxiliam no estudo isolado de processos de cicatrização (BOYKO; LONGAKER; YANG, 2017). Entretanto, esses modelos não são capazes de esclarecer questões relacionadas a alterações locais e sistêmicas da cicatrização como vascularização

e resposta imune (IGNACIO; EL-AMIN; MENDENHALL, 2016). Os estudos *in vivo* utilizando animais de experimentação são essenciais para ilustrar os mecanismos multifatoriais, relacionados à fisiopatologia de cicatrização (DORSETT-MARTIN; WYSOCKI, 2008).

Diferentes modelos animais de cicatrização, como modelo de lesão por excisão (*full-thickness*), incisão, escoriação (dermo-abrasão), ou, ainda, lesão por pressão, ou queimadura (*partial-thickness*) estão bem estabelecidos e são úteis para o estudo da cicatrização (WILHELM; WILHELM; BIELFELDT, 2017). A partir desses modelos, também é possível investigar agentes cicatrizantes e avaliar a segurança e potenciais danos causados pela terapêutica estudada (ABDULLAHI; AMINI-NIK; JESCHKE, 2014). Resultados positivos, ao fim de testes pré-clínicos com animais, permitirá a continuidade da pesquisa, a partir de ensaios clínicos em humanos (IGNACIO; EL-AMIN; MENDENHALL, 2016). Portanto, é necessária a avaliação de modelos experimentais existentes para a escolha do ideal, de acordo com a finalidade do estudo (ZOMER; TRENTIN, 2018).

2 ESPÉCIES DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS USADOS NO ESTUDO DA CICATRIZAÇÃO

Inicialmente, deve-se considerar as diferenças e semelhanças entre a espécie do modelo animal a ser escolhida e o ser humano, para que o resultado obtido seja fidedigno (IGNACIO; EL-AMIN; MENDENHALL, 2016). As espécies mais utilizadas no estudo da

cicatrização *in vivo* são roedores (camundongos e ratos), coelhos e suínos (MASSON-MEYERS *et al.*, 2020). Roedores, por exemplo, são animais muito utilizados em experimentos de cicatrização pela facilidade de manuseio, pelo baixo custo e curto ciclo de vida.

Além disso, possuem rápido processo de cicatrização, assim, torna-se possível avaliar em dias os fatores que ocorrem em semanas no organismo humano (BOYKO; LONGAKER; YANG, 2017; DORSETT-MARTIN; WYSOCKI, 2008), o que, de certa forma, viabiliza o estudo sem comprometer os resultados, e estimar a situação real em humanos.

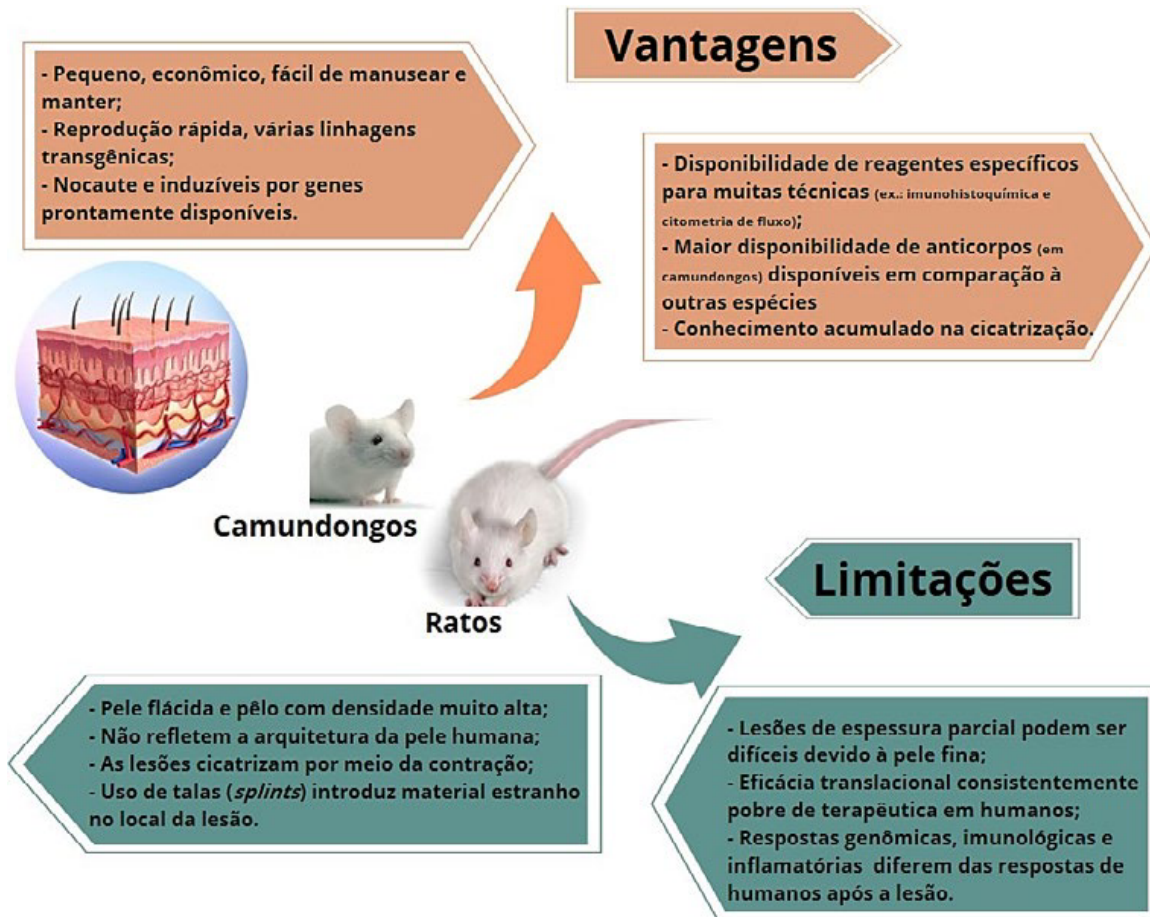
A fim de analisar a cicatrização cutânea aguda, os modelos experimentais mais utilizados são: incisional, excisional e queimadura. Para a avaliação do reparo tecidual de lesões crônicas, na qual a cicatrização é mais lenta, são utilizados modelos de úlcera por pressão, isquemia e lesão em animais hiperglicêmicos, por exemplo (IGNACIO; EL-AMIN; MENDENHALL, 2016).

Por outro lado, pelo fato de os modelos experimentais em camundongos e ratos serem os mais utilizados, existe uma variedade de reagentes específicos para essas espécies disponíveis no mercado, favorecendo as investigações e os experimentos. Além disso, muitos mecanismos de mutação gênica podem ser utilizados para avaliar situações específicas, inclusive fisiopatologia de determinadas doenças associadas ao reparo tecidual (GURTNER *et al.*, 2011). A disponibilidade de camundongos geneticamente modificados também traz contribuições significativas, ao

definir o impacto de vias genéticas específicas na cicatrização (GURTNER *et al.*, 2011).

Por fim, o modelo que demonstra ter correlação especial com a cicatrização humana é realizado em porcos (SULLIVAN *et al.*, 2001). No entanto, os gastos envolvidos; os requisitos de manutenção e manejo; além da falta de reagentes específicos, limitam a viabilização do seu estudo. Isso permite revisar a hipótese a ser testada, ou conduzir a seleção de espécies animais de menor custo e “mais fáceis” de trabalhar. Na Figura 1, estão resumidas as principais características, vantagens e limitações do estudo da cicatrização em modelo utilizando camundongos e ratos.

Figura 1 – Vantagens e limitações do estudo da cicatrização em modelo com camundongos e ratos



Fonte: Elaborada pelos autores.

3 ESTUDO DA CICATRIZAÇÃO EM CAMUNDONGOS

Neste tópico são apresentadas as similaridades e diferenças entre a cicatrização murina e humana, os modelos de cicatrização utilizando camundongos bem como suas vantagens e limitações.

3.1 Comparações com os Humanos

A cicatrização cutânea murina e a humana são similares, se comparadas às fases do processo: inflamação, proliferação e remodelamento (ZOMER; TRENTIN, 2018). Entretanto, nos camundongos, o processo difere quanto à contração mediada por miofibroblastos. Essa diferença deve-se, em parte, a uma extensa camada subcutânea de músculo estriado, chamada de pânículo carnoso, que não existe em humanos.

Essa camada muscular permite que a pele se mova independentemente dos tecidos mais profundos e ocasiona a rápida contração pós-lesão (CHEN; LONGAKER; GURTNER, 2013; DUNN *et al.*, 2013; GRADA; MERVIS; FALANGA, 2018; GURTNER *et al.*, 2011; ZOMER; TRENTIN, 2018). Em contraste, lesões humanas cicatrizam por meio de reepitelização e formação de tecido de granulação, diferenças importantes a serem consideradas ao avaliar a relevância translacional dos estudos em camundongos (GURTNER *et al.*, 2011).

Outra diferença observada entre camundongos e humanos está relacionada às características imunológicas peculiares, que incluem, por exemplo, marcadores fenotípicos de macrófagos. A glicoproteína adesiva F4/80, por exemplo, identifica macrófagos murinos e eosinófilos humanos. Em contraste, o receptor de manose de macrófago encontrado em macrófagos M2 murinos também consta em fibroblastos dérmicos e queratinócitos humanos (ZOMER; TRENTIN, 2018).

Células de Langerhans e linfócitos T CD8⁺ povoam a epiderme humana. A epiderme murina, além desses tipos celulares, contém uma população específica de células T $\gamma\delta$ fundamentais para a homeostase da pele e o reparo tecidual. Essas células secretam FGF-9 no microambiente lesionado, promovendo secreção adicional de FGF-9 por fibroblastos dérmicos levando à regeneração do folículo capilar, e podem explicar os folículos capilares em cicatrizes de camundongos, mas não em humanos (ZOMER; TRENTIN, 2018).

As citocinas inflamatórias e os receptores de citocinas na cicatrização estimulam a inflamação. A IL-1, por exemplo, regula citocinas inflamatórias humanas e murinas importantes na dor e hiperalgesia pós-lesões. Em resposta à IL-1, os queratinócitos e fibroblastos produzem quimiocinas derivadas de queratinócitos (CXCL1) em camundongos e IL-8 em humanos, além de outros mediadores inflamatórios e nociceptivos. Além disso, IL-8, CXCL-7, CXCL-11 e quimioatraente de monócitos que foram identificados em humanos, mas não em camundongos, regulam a angiogênese, a reepitelização e o remodelamento tecidual (ZOMER; TRENTIN, 2018).

3.2 Uso de Camundongos na Cicatrização

Incisões cirúrgicas e excisões de espessura total realizadas na pele dorsal de camundongos são os modelos de lesões mais populares. As localizações dorsais tendem a ser bastante úteis para evitar que o animal alcance e manipule a lesão. Para estudos pré-clínicos de terapêutica, cada camundongo pode receber duas lesões (GRADA; MERVIS; FALANGA, 2018).

Apesar de haver, na literatura, vários estudos utilizando o mesmo animal com mais de duas lesões, cada lesão é utilizada para diferentes tratamentos. Esse método não é adequado por causa de respostas sistêmicas, por isso, o ideal é utilizar um único tratamento em cada animal, ou seja, todas as lesões de cada animal devem ser tratadas com a mesma terapêutica, visando à redução do uso de animais e melhor aproveitamento, o que possibilita a coleta de maior quantidade de amostra para as diversas investigações.

Outros modelos de lesões em camundongos incluem pressão magnética induzida, redox manipulada, isquêmica, diabética, envelhecida, infectada, humanizada, ou xenoenxertada, e podem envolver a pele dorsal, orelha ou cauda – embora a maioria seja feita na região dorsal (ELLIOT *et al.*, 2018).

A maioria dos estudos usa camundongos C57BL/6 machos adultos, com idades entre 8-12 semanas e peso entre 20-30g. Camundongos machos são usados com mais frequência do que as fêmeas, pois o estado hormonal pode afetar os parâmetros da lesão (BIRCH; TOMLINSON; FERGUSON, 2005; DUNN *et al.*, 2013; TAN; WAHLI, 2013; WOSGRAU *et al.*, 2015). Recomenda-se que os camundongos sejam alojados individualmente, a fim de prevenir e reduzir as lesões de combate por outros animais do mesmo alojamento, interferindo no processo de cicatrização (BIRCH; TOMLINSON; FERGUSON, 2005; TAN; WAHLI, 2013; WOSGRAU *et al.*, 2015).

O modelo de lesão excisional de espessura total mantém a pele solta e a lesão fecha rapidamente pela união das bordas. Em

camundongos, pouco tecido de granulação é formado, que é substancialmente diferente da cicatrização da pele humana. Algumas estratégias, como o modelo com tala (*splint*) em que se usa um anel de silicone preso ao redor da lesão, podem prevenir a contração da sua margem.

Esse modelo é conveniente para analisar todas as fases da cicatrização, uma vez que evita efetivamente a contração do panículo carnoso e, então, se aproxima mais dos processos humanos de reepitelização e formação de novos tecidos. Essas lesões demoram mais para fechar, em comparação com os modelos sem talas (CHEN; LONGAKER; GURTNER, 2013; DUNN *et al.*, 2013; TAN; WAHLI, 2013; ZOMER; TRENTIN, 2018).

As incisões cirúrgicas podem ser criadas no dorso da linha média de cada lado da coluna vertebral de um camundongo anestesiado. A resistência à ruptura da lesão (força tensora da cicatriz) é um parâmetro importante estudado no modelo de lesão por incisão (TAN; WAHLI, 2013).

Outro modelo é a isquemia-reperfusão. Esse método não invasivo pode atingir uma lesão por pressão em estágio III. Acredita-se que a patogênese das lesões por pressão seja mediada por ciclos de isquemia seguidos por reperfusão. Dois discos magnéticos de cerâmica são colocados para “pinçar” a pele dorsal e aplicar 50mmHg de pressão, o que demonstrou diminuir o fluxo sanguíneo em 80%. Isso é seguido pela remoção dos ímãs, para permitir um período de lesão por reperfusão (CHEN; LONGAKER; GURTNER, 2013).

3.3 Vantagens e Limitações da Utilização de Camundongo na Cicatrização

O camundongo de laboratório continua sendo o modelo animal mais comumente utilizado em pesquisas científicas.

Vantagens: É pequeno, econômico; fácil de manusear e manter; tem reprodução rápida; apresenta numerosas linhas transgênicas, nocaute e induzíveis por genes prontamente disponíveis; há reagentes específicos de camundongo amplamente disponíveis para muitas técnicas, como imuno-histoquímica e citometria de fluxo – uma gama maior de anticorpos disponível para camundongo do que para rato – (BIRCH; TOMLINSON; FERGUSON, 2005); existe ampla base de conhecimento na cicatrização em camundongos, de anos de extensa pesquisa (CHEN; LONGAKER; GURTNER, 2013; GRADA; MERVIS; FALANGA, 2018; GURTNER *et al.*, 2011).

Os camundongos podem ser padronizados por idade, sexo, história e predisposição genética, e é possível o uso de um número relativamente alto de animais para validação estatística. Além disso, linhagens geneticamente modificadas foram desenvolvidas para investigar as vias moleculares de cicatrização (ZOMER; TRENTIN, 2018).

Limitações: possuem pele flácida e pelo com densidade muito alta, não refletem a arquitetura da pele humana; na ausência de intervenção externa (isto é, imobilização), as lesões cicatrizam

principalmente por meio da contração, eliminando a fase proliferativa robusta de cicatrização; o uso de talas para evitar a contração introduz material estranho no local da lesão; lesões de espessura parcial podem ser difíceis de fazer devido à pele fina; eficácia translacional consistentemente pobre de terapêutica em humanos; respostas genômicas, imunológicas e inflamatórias de camundongos diferem significativamente das respostas de humanos após a lesão (GRADA; MERVIS; FALANGA, 2018).

4 USO DE RATOS NA CICATRIZAÇÃO

Os modelos animais em cicatrização cutânea são para prever a resposta em humanos. É decepcionante que os resultados de estudos utilizando modelos de cicatrização *in vitro* e de pequenos animais mostrem apenas 57% e 53% de concordância, respectivamente, com resultados de estudos em humanos, enquanto o modelo em porcos, menos comumente usados, exibe o nível mais alto (78%) (SULLIVAN *et al.*, 2001).

Em nossos estudos, alguns critérios indicaram que ratos são mais adequados do que camundongos, para o estudo da cicatrização. Algumas diferenças entre eles são a pele e o tamanho. A pele do camundongo é mais fina e apresenta menos camadas de queratinócitos, cicatrizando em média em 7 dias; enquanto nos ratos é possível avaliar a cicatrização em 12 a 14 dias. O tamanho e a quantidade possível de lesões a serem causadas são proporcionais ao tamanho do animal, ou seja, diante da possibilidade de realizar

lesões menores no camundongo e de eles terem o processo cicatricial mais acelerado do que em ratos, torna-se inviável a inserção de várias lesões, ou em tamanhos maiores, em camundongos.

Diante disso, em experimentos que requerem quantidades mínimas de amostras para análises, o modelo com os camundongos torna-se mais viável. Entretanto, quando quantidades consideráveis de amostras são necessárias para as análises, ratos, ou até mesmo coelhos, são os mais adequados, por permitirem, inclusive, causar diversas lesões no mesmo animal, para melhor aproveitamento, desde que todas as lesões recebam o mesmo tratamento.

Todos os modelos informados anteriormente para o estudo da cicatrização em camundongos (incisão; excisão com ou sem tala; escoriação; queimadura; lesão por pressão magnética induzida; isquemia-reperfusão; diabetes e envelhecimento induzidos; lesão infectada; xenoenxerto; dentre outros), também são utilizados em ratos (GRADA; MERVIS; FALANGA, 2018; MASSON-MEYERS *et al.*, 2020), mas sempre devem ser consideradas as devidas vantagens e limitações entre camundongos e ratos.

Pragmaticamente, apesar da vontade de usar modelos com maior fidedignidade, as agências de financiamento muitas vezes favorecem abordagens reducionistas ou mecanicistas e, assim, impulsionam o uso de metodologias *in vitro* e modelos de pequenos animais geneticamente modificados (PASTAR *et al.*, 2018).

Além disso, a disponibilidade de ratos (mas principalmente camundongos) *knock out/knock in*, que fornecem diversa varieda-

de genética para interrogar hipóteses de pesquisa; facilidade de acesso; manuseio e baixo custo, em comparação com modelos de animais grandes, tornou populares os modelos de roedores. No entanto, os ratos também cicatrizam por contração se comparados com mamíferos de pele rígida (ou seja, humanos, suínos), ou áreas de alta tensão (ou seja, extremidades humanas e esterno e as extremidades distais de animais).

Além disso, discrepâncias significativas foram observadas no sistema imunológico e nos processos inflamatórios em resposta à lesão entre modelos de ratos e humanos (DRAKE, 2013; FINGLETON, 2008; JUNHEE SEOK *et al.*, 2013; WAGAR; DIFAZIO; DAVIS, 2018).

Sabendo que o processo inflamatório inicial pós-lesão direciona subsequente resposta de cicatrização, as diferenças genéticas no início e a manutenção dessa resposta devem ser consideradas (ARIFFIN *et al.*, 2016; JONES *et al.*, 2016; WAGAR; DIFAZIO; DAVIS, 2018;) (GREEK; MENACHE, 2013).

Ao contrário do modelo em ratos, os modelos de cicatrização em porcos têm várias vantagens exclusivas importantes, inclusive semelhanças anatômicas, fisiológicas e funcionais da pele de porco com a pele humana (SULLIVAN *et al.*, 2001). De fato, xenoenxertos de pele suína têm sido usados temporariamente, quando os autoenxertos não estavam disponíveis em humanos sobreviventes de queimaduras (YAMAMOTO *et al.*, 2018).

No entanto, surpreendentemente, poucos estudos utilizam modelos suínos em cicatrização. Alto custo; dificuldade de manu-

seio devido ao tamanho; necessidade de alojamento especial e operação; e requisitos de anestesia, podem limitar a acessibilidade de modelos de suínos para muitos pesquisadores.

Apesar do uso limitado desse modelo, em comparação com modelos em ratos na pesquisa de cicatrização, a contribuição do modelo em porco para avanços na cicatrização humana, conhecimento e aplicações clínicas, não devem ser subestimada (MEYER; SCHWARZ; NEURAND, 1978; SULLIVAN *et al.*, 2001; YAMAMOTO *et al.*, 2018).

A cicatrização fisiológica (aguda) é um processo dinâmico, com uma infinidade de fatores intrínsecos e extrínsecos documentados para impactar a taxa e a qualidade da cicatriz. Por comparação, as respostas patológicas que levam a lesões crônicas e cicatrizes patológicas são ainda mais complexas. Essa complexidade é difícil de capturar totalmente e replicar em modelos animais, devido à falta de comorbidades sobrepostas ou à influência de composição genética única entre as espécies.

Determinar o melhor modelo a ser utilizado depende, em grande parte, não apenas da hipótese a ser testada, mas também da validade, fidelidade e extrapolação para a prática clínica em humanos. Os melhores modelos equilibram o fenômeno isolado, separam as variáveis, e ainda possuem a necessária fidelidade para lidar com a complexidade da cicatrização. Apesar das limitações dos modelos animais, incorporando conhecimento dessas limitações em uma interpretação cuidadosa de dados, esses modelos

promovem o avanço do conhecimento do processo de cicatrização (PARNELL; VOLK, 2019).

Os modelos em ratos normalmente utilizados são de animais jovens e saudáveis, em ambientes controlados, uniformes, que são incapazes de desenvolver lesões associadas às comorbidades. Ainda não foi possível induzir uma lesão crônica em modelos animais nem o ambiente de fatores que contribuem para sua cronicidade de forma consistente e reproduzível, embora tenham sido publicados modelos desenvolvidos que incorporam muitas características de lesões crônicas que podem aumentar a compreensão sobre a patologia nessas lesões e sua resposta aos tratamentos (DHALL *et al.*, 2014).

A falta de um modelo de lesão crônica replicável, que represente a gama de patologias em humanos, enfatiza a necessidade de validação cruzada entre modelos animais e humanos, e ambos com lesão crônica, possibilitando estudos para refinar estes ou novos modelos e proporcionar melhores resultados de pesquisa translacional (GORDILLO *et al.*, 2013).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dado o fato de a utilidade translacional dos modelos em camundongos e ratos, para o estudo da cicatrização tecidual exibir valor preditivo inferior a 80%, considerando suas vantagens e limitações (GREEK; MENACHE, 2013), tem sido sugerido aos

pesquisadores a importância de: (1) determinar qual modelo é o mais adequado para usar em determinado estudo; (2) interpretar os resultados no contexto das limitações do modelo usado; e (3) desenvolver novos modelos, além de refinar os existentes, para otimizar a compreensão dos processos fisiológicos e patológicos, bem como a eficiência translacional.

Um modelo, apesar de representar situações reais, sempre deve ter suas limitações conhecidas e bem controladas, considerando o objetivo do estudo em sua investigação, bem como sua relevância na aplicação clínica em humanos, ainda que utilizado o modelo em roedores para investigar.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAHI, A.; AMINI-NIK, S.; JESCHKE, M. G. Animal models in burn research. *Cellular and molecular life sciences*, 2014.
- ANSELL, D. M.; HOLDEN, K. A.; HARDMAN, M. J. *Animal models of wound repair: Are they cutting it?* *Experimental Dermatology*, 2012.
- ARIFFIN, J. K. *et al.* The E3 ubiquitin ligase RNF144B is LPS-inducible in human, but not mouse, macrophages and promotes inducible IL-1 β expression. *Journal of Leukocyte Biology*, 2016.
- BIRCH, M.; TOMLINSON, A.; FERGUSON, M. W. J. *Animal models for adult dermal wound healing*. *Methods in molecular medicine*, 2005.
- BOYKO, T. V.; LONGAKER, M. T.; YANG, G. P. *Laboratory models for the study of normal and pathologic wound healing*. *Plastic and reconstructive surgery*, 2017.
- CHEN, J. S.; LONGAKER, M. T.; GURTNER, G. C. *Murine models of human wound healing*. *Methods in molecular biology*, 2013.
- DHALL, S. *et al.* Generating and reversing chronic wounds in diabetic mice by manipulating wound redox parameters. *Journal of Diabetes Research*, 2014.

DORSETT-MARTIN, W. A.; WYSOCKI, A. B. Rat Models of Skin Wound Healing. *In: CONN, P.M. Sourcebook of Models for Biomedical Research*. Humana Press, 2008. DOI 10.1007/978-1-59745-285-4_65.

DRAKE, A. C. *Of mice and men: what rodent models don't tell us*. Cellular and Molecular Immunology, 2013.

DUNN, L. *et al.* Murine model of wound healing. *Journal of Visualized Experiments*, 2013.

ELLIOT, S. *et al.* A modeling conundrum: murine models for cutaneous wound healing. *Journal of Investigative Dermatology*, 2018.

FINGLETON, B. *MMPs as therapeutic targets-Still a viable option?* Seminars in Cell and Developmental Biology, 2008.

GORDILLO, G. M. *et al.* *Preclinical models of wound healing: Is man the model?* PROCEEDINGS OF THE WOUND HEALING SOCIETY SYMPOSIUM. Advances in Wound Care, 2013.

GRADA, A.; MERVIS, J.; FALANGA, V. Research techniques made simple: animal models of wound healing. *Journal of Investigative Dermatology*, 2018.

GREEK, R.; MENACHE, A. Systematic reviews of animal models: Methodology versus epistemology. *International Journal of Medical Sciences*, 2013.

GURTNER, G. C. *et al.* Surgical approaches to create murine models of human wound healing. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011.

IGNACIO, G.; EL-AMIN, I.; MENDENHALL, V. Animal models for wound healing. *In: IGNACIO, G.; EL-AMIN, I.; MENDENHALL, V. Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. London: Elsevier, 2016.

JONES, C. N. *et al.* Microfluidic assay for precise measurements of mouse, rat, and human neutrophil chemotaxis in whole-blood droplets. *Journal of Leukocyte Biology*, 2016.

JUNHEE SEOK *et al.* *Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013.

LINDLEY, L. E. *et al.* *Biology and biomarkers for wound healing*. Plastic and reconstructive surgery, 2016.

MASSON-MEYERS, D. S. *et al.* Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment. *International Journal of Experimental Pathology*, 2020.

MEYER, W.; SCHWARZ, R.; NEURAND, K. The skin of domestic mammals as a model for the human skin, with special reference to the domestic pig. *Current problems in dermatology*, 1978.

PARNELL, L. K. S.; VOLK, S. W. The evolution of animal models in wound healing research: 1993-2017. *Advances in wound care*, 2019.

PASTAR, I. *et al.* Descriptive vs mechanistic scientific approach to study wound healing and its inhibition: Is there a value of translational research involving human subjects? *Experimental Dermatology*, 2018.

RODRIGUES, M. *et al.* *Wound healing: a cellular perspective.* *physiological Reviews*, 2019.

SINGH, S.; YOUNG, A.; MCNAUGHT, C. E. The physiology of wound healing Surgery (United Kingdom), 2017.

SULLIVAN, T. P. *et al.* *The pig as a model for human wound healing.* *Wound repair and regeneration*, 2001.

TAN, N. S.; WAHLI, W. *Studying wound repair in the mouse.* *Current Protocols in Mouse Biology*, 2013.

WAGAR, L. E.; DIFAZIO, R. M.; DAVIS, M. M. *Advanced model systems and tools for basic and translational human immunology.* *Genome Medicine*, 2018.

WANG, P. H. *et al.* Wound healing. *Journal of the Chinese Medical Association*, 2018.

WILHELM, K. P.; WILHELM, D.; BIELFELDT, S. *Models of wound healing: an emphasis on clinical studies.* *Skin Research and Technology*, 2017.

WOSGRAU, A. C. C. *et al.* Comparative experimental study of wound healing in mice: Pelnac versus integra. *PLoS ONE*, 2015.

YAMAMOTO, T. *et al.* *Skin xenotransplantation: historical review and clinical potential.* *Burns*, 2018.

ZOMER, H. D.; TRENTIN, A. G. Skin wound healing in humans and mice: challenges in translational research. *Journal of Dermatological Science*, 2018.

CAPÍTULO 10 <doi>10.51996/9788574853994.cap10</doi>

MODELOS ANIMAIS COM LESÃO GÁSTRICA

Francisco Clark Nogueira Barros¹

Glauber Cruz Lima²

Resumo: A morfologia e a fisiologia estomacais podem ser perturbadas por fatores exógenos, como infecções por *Helicobacter pylori*, estresse, álcool, tabagismo e anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). Tais fatores podem levar a patologias como gastrite, refluxo, úlcera gástrica e neoplasias. O tratamento contra gastrites e úlceras gástricas apresenta vários efeitos colaterais. Assim, é importante adotar estratégias de tratamento capazes de reduzir esses efeitos adversos. Os modelos de indução de lesões gástricas *in vivo* permitem a investigação de novas drogas para prevenção ou cura dessas patologias. Nesses modelos, os agentes indutores podem ser o etanol, AINEs e diferentes formas de estresse físico e mecânico. Neste capítulo, são descritos modelos rápidos e eficazes de indução de lesões gástricas para investigação do potencial gastroprotetor de moléculas bioativas. Os modelos de lesão gástrica induzida por etanol, AINEs, ligação pilórica e estresse por contenção hipotérmica, são apresentados, além dos seus mecanismos de ação sobre a fisiopatologia da doença.

1 Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, *campus* Juazeiro do Norte, Ceará, Brasil.
E-mail para correspondência: clark@ifce.edu.br

2 Faculdade Uninta Itapipoca, *campus* Itapipoca, Ceará, Brasil.

Palavras-Chave: Inflamação. Úlcera gástrica. Etanol. Antiinflamatório.

ANIMAL MODELS WITH GASTRIC LESION

Abstract: The stomach morphology and physiology may be disrupted by exogenous factors such as infection by *Helicobacter pylori*, stress, alcohol, smoking, and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID). Such factors might lead to pathologies such as gastritis, reflux, gastric ulcer, and neoplasm. Gastritis and gastric ulcer treatment present several side effects. Thus, the development of new treatment approaches capable of reducing these side effects is essential. The models of in vivo gastric lesion induction allow us to investigate new drugs to prevent or cure these pathologies. In these models, induction agents might be ethanol, NSAID, and different ways of physical and mechanical stress. This chapter describes fast and effective models of gastric lesion induction to investigate the gastroprotective potential of bioactive molecules. The gastric lesion models induced by ethanol, NSAID, pyloric ligation, and hypothermic restraint stress are highlighted, besides their mechanism of action in the physiopathology of the disease.

Keywords: Inflammation. Gastric Ulcer. Ethanol. Anti-Inflammatory.

1 INTRODUÇÃO

Úlcera gástrica é a denominação de uma lesão na mucosa gástrica, embora possa acometer outras regiões, como o esôfago

e duodeno, causada por um desequilíbrio entre fatores protetivos e agressores no estômago (FALCÃO *et al.*, 2008; HUNT *et al.*, 2015). Dentre os fatores lesivos, estão a secreção ácida; a enzima proteolítica pepsina; radicais livres derivados do oxigênio; endotelinas; e leucotrienos. Fatores exógenos como estresse; ingestão crônica de álcool; tabagismo; uso indiscriminado de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs); e infecções, principalmente por *Helicobacter pylori*, contribuem para o agravo. Os fatores de proteção incluem a camada protetora de muco do estômago, prostaglandinas, óxido nítrico, bicarbonato e agentes antioxidantes (AMARAL *et al.*, 2013; EISNER *et al.*, 2017; KHODER *et al.*, 2016).

Quando os fatores lesivos sobrepõem-se aos protetivos, o epitélio gástrico é exposto ao baixíssimo pH do suco gástrico e à pepsina, ocorrendo severa erosão. A lesão pode acometer a barreira mucosa gástrica em toda sua espessura, causando injúrias à camada muscular da mucosa, uma fina camada de músculo liso subjacente (GRAHAM; KHALAF, 2020). O mais frequente sítio de lesão estomacal é a curvatura menor, mas a ulceração pode ocorrer em qualquer região do estômago (FAZALDA; QURAISSIAH; NUR AZLINA, 2018).

As úlceras gástricas variam em diversos aspectos, como profundidade da penetração, tamanho, cronicidade e etiologia, e podem ser inicialmente assintomáticas, embora náuseas, dispnéia, vômitos e dores epigástricas sejam comuns (GUEVARA; COGDILL, 2020; NARAYANAN; REDDY; MARSICANO, 2018).

Contudo, a evolução da doença traz consigo complicações clínicas graves, como sangramento, perfuração e obstrução da saída gástrica (obstrução pilórica) (LANAS; CHAN, 2017; VERNON, 2019).

A infecção por *Helicobacter pylori* ou *H. pylori* e o uso crônico de AINEs, como aspirina e indometacina, são os principais fatores de risco para o desenvolvimento de úlcera gástrica. *H. pylori* é um patógeno com capacidade de causar infecção crônica em mais de 66% da população mundial (REYES & PENICHE, 2019). No entanto, somente algumas pessoas com este quadro desenvolvem as ulcerações, demonstrando que a susceptibilidade individual à virulência da bactéria e à toxicidade dos diferentes tipos de AINEs é um fator preponderante para desencadear o início da lesão da mucosa (LANAS & CHAN, 2017).

A descoberta da relação entre *H. pylori* e ulceração em 1982 rendeu um prêmio Nobel a Barry Marshall e Robin Warren em 2005 e revolucionou o tratamento e a prevenção da úlcera gástrica (WU, 2019). Atualmente, a primeira linha de tratamento antiulcerogênico envolve dois antibióticos e um inibidor da bomba de prótons (IBP), na chamada terapia tripla padronizada. Há ainda o recurso de utilizar um antiácido concomitante ao tratamento para aumentar sua eficácia. O aumento do pH intragástrico induz o estado de replicação da *H. pylori*, promovendo a efetividade dos antibióticos (HWANG *et al.*, 2015; MALFERTHEINER *et al.*, 2017; STRAND; KIM; PEURA, 2017; VERNON, 2019).

De fato, a terapia tripla padronizada mostrou-se bastante eficaz. Contudo, há um crescente aumento da resistência de *H. pylori* a muitos antibióticos. Ademais, o uso crônico de IBPs tem se mostrado ser cada vez mais problemático. Diversos estudos associam o uso prolongado de IBPs, por seis meses ou mais, a uma série de patologias e complicações derivadas. (LANAS; 2016; SCHNOLL-SUSSMAN; NIEC; KATZ, 2020).

Com o envelhecimento da população mundial; maior incidência de doenças crônicas; e o uso cada vez mais frequente e contínuo de AINEs, é recomendável a adoção de novas estratégias de tratamento, de forma a limitar o uso de antibióticos e IBPs e reduzir seus efeitos colaterais. Assim, neste capítulo, são descritos os principais modelos experimentais *in vivo* de lesão gástrica induzida capazes de mimetizar as características fisiopatológicas encontradas em úlceras gástricas, com destaque para as vantagens e desvantagens de cada modelo.

1.1 Histórico dos Modelos Animais com Úlcera Gástrica

Na experimentação animal, diversos modelos atendem à fisiopatologia das lesões gástricas. Os modelos de indução de úlcera gástrica *in vivo* foram desenvolvidos (OKABE; AMAGASE, 2005; ADINORTEY *et al.*, 2013) tanto para validação de terapias já consolidadas, quanto para a investigação de novas drogas para prevenção ou cura da úlcera gástrica.

O modelo animal mais usado atualmente em estudos *in vivo* é o murino; através de várias linhagens de ratos (*Rattus norvegicus*)

como Wistar, albinos híbridos e *Sprague–Dawley*; além de camundongos (*Mus musculus*), das linhagens de albinos suíços, suíços-Webster e Balb-C (BARBOSA DA LUZ *et al.*, 2021; BUENO *et al.*, 2021; FORMIGA *et al.*, 2021; HOSSEN *et al.*, 2021; MESIA-VELA *et al.*, 2007).

Nesses modelos, diversos procedimentos ou agentes indutores podem ser utilizados, como etanol, AINEs (principalmente a indometacina); ligação pilórica; estresse hipotérmico; dentre outros (ADINORTEY *et al.*, 2013). As principais vantagens do uso de etanol e AINEs, agentes indutores de lesões gástricas bastante utilizados na prospecção de novas drogas antiulcerogênicas, estão descritas na Figura 1. O modelo experimental utilizado continuamente há mais tempo, no entanto, é o da ligação pilórica (THABREW; ARAWWAWALA, 2016).

O método de ligação pilórica é usado com sucesso desde 1945, quando foi observado que animais mantidos por 18 horas com o piloro ligado desenvolveram úlcera gástrica, devido ao acúmulo de ácido no estômago (BRODIE, 1968; SHAY *et al.*, 1945). Após a consolidação do modelo de ligação pilórica, estudos acerca da úlcera experimental levaram ao desenvolvimento do modelo induzido por estresse (BRODIE, 1962; BRODIE, 1968).

Figura 1 – Principais vantagens do uso de etanol e AINEs em modelos de indução de lesões gástricas



Fonte: Elaborada pelos autores.

A imobilização foi, inicialmente, a forma mais comum de estresse (BRODIE; HANSON, 1960). Posteriormente, múltiplos estressores foram utilizados no intuito de criar lesões mais graves à mucosa gástrica. A combinação de agentes estressores também pode ser utilizada para amplificar a gravidade das lesões, como a combinação dos métodos de restrição e exposição ao frio (MURAKAMI *et al.*, 1985; SENAY; LEVINE, 1967). O papel fisiológico das prostaglandinas no estômago também foi investigado, para demonstrar a eficácia dessa classe de moléculas na prevenção

de úlcera gástrica contra agentes necrosantes, como álcool, HCl, NaOH, NaCl hipertônico e lesão térmica (ROBERT; NEZAMIS; LANCASTER; HANCHAR, 1979).

O mecanismo de ação da lesão gástrica induzida por etanol concentrado foi estudado em ratos por análises morfológica, videomicroscópica, histoquímica e farmacológica, sendo observado intenso efeito vascular, constrição venosa e dilatação arteriolar. Com base nesses resultados, um modelo padronizado de lesão gástrica induzida por etanol foi proposto (OATES; HAKKINEN, 1988).

O uso prolongado de AINEs, especialmente em doses elevadas, resulta em úlceras gástricas nos pacientes, conforme descrito inicialmente para a terapia com indometacina (LOVGREN; ALLANDER, 1964; TAYLOR *et al.*, 1968). A ação ulcerativa dessa droga levou ao desenvolvimento do método de indução de úlcera gástrica por indometacina (BHARGAVA *et al.*, 1973; SOMOGYI *et al.*, 1969).

2 MODELOS ANIMAIS COM LESÃO GÁSTRICA

2.1 Modelo de Lesão Gástrica Induzida por Etanol

O modelo de lesão gástrica induzida por etanol é bastante utilizado na prospecção de produtos naturais com potencial gastroprotetor (BUENO *at al.*, 2021; ALENCAR *et al.*, 2019; AL-QURAI SHY *et al.*, 2017; MAGALHÃES *et al.*, 2015; AMARAL *et al.*, 2013; DINIZ *et al.*, 2013; CHAVES *et al.*, 2013; WASMAN *et al.*, 2010; MONTEIRO

et al., 2007; FREIRE *et al.*, 2005). Esse método mimetiza, em animais, muitas características da ulceração gástrica encontrada em humanos, com rapidez, eficácia, baixo custo e fácil reprodutibilidade (ADINORTEY *et al.*, 2013; LA CASA *et al.*, 2000; SZABO; GOLDBERG, 1990; OATES; HAKKINEN, 1988; ROBERT *et al.*, 1979).

Nesse modelo experimental, os animais devem ser mantidos em jejum por 24 horas, com livre acesso à água, que deve ser retirada duas horas antes do experimento. Os animais são randomicamente separados em grupos e, uma hora antes da administração de etanol, pré-tratados com diferentes doses do composto testado. Um grupo pré-tratado com medicamento usado na úlcera gástrica, como o omeprazol, é opcional (AL-QARAWI *et al.*, 2005; CHATURVEDI *et al.*, 2018; FAHMY *et al.*, 2020; MAYER *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2009).

A administração de etanol é feita por gavagem e, dependendo do grau de sensibilidade dos animais, alguns ajustes em sua concentração são necessários, mas é recomendado o uso inicial de etanol 50%. Caso necessário, a administração de concentrações maiores pode ser testada. Após o tempo de incubação com o agente agressor, geralmente entre 30min e 60min, os animais são sacrificados e os estômagos retirados e abertos ao longo da curvatura maior.

A avaliação das lesões ocorre a partir de imagens da mucosa gástrica completamente estendida, usando um programa planimétrico que mensura a área ulcerada da mucosa (ABDELFATTAH *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2018; SOUSA *et al.*, 2016; CHEN *et al.*,

2005; MORIMOTO *et al.*, 1991; OATES; HAKKINEN, 1988). Uma variação possível desse método consiste na administração combinada de etanol e ácido clorídrico, nos animais testados (FORMIGA *et al.*, 2021; HOSSEN *et al.*, 2021; BRZOWSKI *et al.*, 1998; MIZUI; DOTUCHI, 1983).

O mecanismo de ação do etanol sobre a mucosa gástrica ainda não foi completamente elucidado, mas sabe-se que é um processo multifatorial que envolve danos diretos e indiretos (SZABO; GOLDBERG, 1990). As ações diretas incluem dano à camada de muco e à superfície das células da mucosa gástrica, com rompimento da membrana celular, desidratação e efeitos citotóxicos, com consequente propagação da cascata inflamatória, a qual é responsável pelos efeitos indiretos do etanol sobre a mucosa (ARAB *et al.*, 2015; ZHENG *et al.*, 2016).

A infiltração de leucócitos, desencadeada pela inflamação, leva à produção de espécies reativas de oxigênio, apoptose e produção e liberação de moléculas vasoconstritoras que contribuem ainda mais para o já estabelecido processo de hipóxia tecidual, uma vez que grande redução do fluxo sanguíneo para a mucosa gástrica é observada após alguns minutos da administração de etanol, caracterizada por forte venoconstrição, seguida por dilatação arteriolar (ARAB *et al.*, 2015; HUH *et al.*, 2003; LA CASA *et al.*, 2000; OATES; HAKKINEN, 1988).

A anormalidade dos eventos ocorridos na microcirculação da mucosa leva à estase do fluxo sanguíneo; ao rompimento de

microvasos e a um quadro de aumento da permeabilidade epitelial, edema, hemorragia, hipóxia tecidual e necrose (MOUSA *et al.*, 2019; ARAB *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2013). O etanol reduz, ainda, os níveis de óxido nítrico (NO), molécula produzida a partir do aminoácido L-arginina por três isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS), incluindo a NOS endotelial (e-NOS) e a NOS induzível (i-NOS), induzida por fagócitos e leucócitos em vários tecidos durante inflamação tissular.

Tem sido demonstrado que o NO possui um papel regulador na manutenção da integridade do epitélio estomacal e do fluxo sanguíneo, protegendo a mucosa contra lesões. Em caso de erosão e úlcera gástrica, o NO favorece o reparo tecidual pelo aumento do fluxo sanguíneo, angiogênese e secreção de muco (MOUSA *et al.*, 2019; ROJAS-MARTÍNEZ *et al.*, 2013; MATSUDA *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2000).

Não obstante a inflamação e as anormalidades na microcirculação, outro fator essencial à fisiopatologia da úlcera gástrica induzida por etanol é o estresse oxidativo (TERANO *et al.*, 1989). As espécies reativas de oxigênio (EROs), em especial o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), podem oxidar lipídios e proteínas, perturbando assim a barreira do trato gastrointestinal e aumentando sua permeabilidade. Tais fatores levam à inflamação tecidual. Em adição, o excesso de EROs estimula macrófagos, os quais liberam citocinas inflamatórias como NF- κ B e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), potencializando o dano ao tecido (BADR; EL-ORABI; ALI, 2019; BHATTACHARYYA *et al.*, 2014).

Após acentuada liberação de EROs, há um declínio da capacidade do sistema de defesa antioxidante, caracterizado por redução da atividade das enzimas antioxidantes, maior concentração de EROs, e perda da homeostase redox, seguida por peroxidação lipídica das membranas celulares, dano e morte celular (WU *et al.*, 2014; YU *et al.*, 2016). Uma forma de avaliar a amplitude e a severidade do dano oxidativo é através da quantificação do malondialdeído (MDA), produto secundário da peroxidação lipídica, considerado um marcador confiável para mensuração de dano oxidativo tecidual (OHKAWA *et al.*, 1979; DRAPER; HADLEY, 1990).

2.2 Modelo de Lesão Gástrica Induzida por Anti-inflamatórios não Esteroidais (AINEs)

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) pertencem a uma classe de medicamentos muito popular, em todo o mundo, e são, muitas vezes, usados de forma indiscriminada no combate à dor e às condições inflamatórias (BINDU; MAZUMDER; BANDYOPADHYAY, 2020). A terapia com AINEs leva à produção reduzida de prostaglandinas, mediadores fundamentais para a manutenção da homeostase do estômago. Desta forma, o uso crônico desses medicamentos está diretamente relacionado ao desenvolvimento de úlceras (VALCHEVA-KUZMANOVA *et al.*, 2019; ALLAJ; GUO; NIE, 2013; MORAES *et al.*, 2009).

Prostaglandinas são sinalizadores químicos derivados do ácido araquidônico; ácido graxo insaturado com cadeia de 20 carbonos

encontrado na membrana plasmática celular (BERGSTROM *et al.*, 1962; KINSELLA *et al.*, 1981). As prostaglandinas têm ação em diversos processos biológicos do organismo, mantendo funções homeostáticas e mediando mecanismos patológicos, como o processo inflamatório (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011; ROBERT, 1979).

O ácido araquidônico pode ser obtido diretamente, a partir da dieta, mas a principal fonte é a biossíntese, a partir do ácido graxo essencial ácido linoleico, o qual é incorporado à membrana plasmática fosfolipídica (GÓMEZ-ABELLÁN; SEPULCRE, 2016; SALEM *et al.*, 1999). Para exercer suas diversas funções biológicas, o ácido araquidônico é clivado da membrana por fosfolipases. A fosfolipase A2 (PLA₂) é a mais relacionada com a cascata metabólica, que culmina com a produção de prostaglandinas. Uma vez livre, no citoplasma, o ácido araquidônico é o substrato para quatro reações químicas. Uma das enzimas envolvidas, a cicloxigenase (COX), é a responsável pela formação das prostaglandinas (VANE, 1971; NUGTEREN; HAZELHOF, 1973; SAMUELSSON, 1972).

A COX apresenta duas isoformas bem estabelecidas, a COX-1 e a COX-2. Independentemente da isoforma, a COX converte o ácido araquidônico na prostaglandina H₂ (PGH₂), utilizada por diversas enzimas sintases (isomerases tecido-específicas), as quais convertem a PGH₂ em prostaglandinas biologicamente ativas, moléculas que podem ser induzidas ou constitutivamente sintetizadas e que desempenham ações importantes na gastroproteção. As principais prostaglandinas bioativas produzidas no organismo

são: prostaglandina E₂ (PGE₂); prostaciclina (PGI₂); prostaglandina D₂ (PGD₂); prostaglandina F_{2 α} (PGF_{2 α}); e tromboxano (TXA₂) (ALLAJ; GUO; NIE, 2013; KAWAHARA *et al.*, 2015; SIEWIERA *et al.*, 2016).

A COX-1 é expressa constitutivamente na maioria das células, e é a principal fonte das prostaglandinas que regulam muitas das funções fisiológicas do estômago. Já a COX-2 é altamente restrita nos tecidos sob condições basais, porém, sua expressão é fortemente induzida por estímulos inflamatórios e mitogênicos; assim, a fonte majoritária de prostaglandinas envolvidas na inflamação e nas doenças proliferativas (GÓMEZ-ABELLÁN; SEPULCRE, 2016; GYIRES, 2005; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011).

Dentre as ações protetoras das prostaglandinas no estômago, estão: inibição da secreção ácida; aumento da secreção de muco e bicarbonato; aumento do fluxo sanguíneo da mucosa; aceleração do reparo tecidual e da renovação celular (uma vez que promove proliferação do epitélio celular); inativação de mastócitos e redução da aderência de leucócitos ao endotélio (RUSSELL, 1986; TARNAWSKI; AHLUWALIA; JONES, 2012). Em 1979, foi demonstrado que a administração de prostaglandinas antes da indução de dano gástrico por agentes necrosantes, ou AINEs, impediu a formação de úlcera nos animais avaliados (ROBERT, 1979).

A indometacina é um anti-inflamatório amplamente usado no tratamento de doenças crônicas inflamatórias. Esse fármaco possui efeito inibitório muito mais potente sobre a COX-1 do que sobre a

COX-2, aumentando consideravelmente seu potencial ulcerogênico (HAO *et al.*, 2018; SCHOLZ *et al.*, 2012; SULEYMAN *et al.*, 2010).

Os protocolos experimentais usados no modelo de indução gástrica por indometacina são bastante semelhantes àqueles encontrados na indução por etanol. Os animais são mantidos em jejum por 24 horas com livre acesso a água até duas horas antes do pré-tratamento; depois, são divididos randomicamente em grupos experimentais. A indução da ulceração é feita normalmente, por via oral, podendo-se usar tubo intragástrico, anterior ao sacrifício dos animais e análise das lesões (RAINSFORD, 1987; WHITTLE, 1981; DJAHANGUIRI, 1969).

Os mecanismos lesivos dos AINEs envolvem a inibição da produção endógena de prostaglandinas e a perda da integridade da barreira protetora de muco-bicarbonato, o que leva a mucosa gástrica a se tornar mais suscetível a agressões de agentes lesivos (KOC *et al.*, 2020; LIVERSIDGE; CONZENTINO, 1995). Além de reduzir a citoproteção, fatores agressivos da mucosa são potencializados durante a ação de AINEs, como a indometacina, a exemplo do aumento da motilidade, da liberação de ácido clorídrico e da atividade da pepsina (PALLE; KANAKALATHA; KAVITHA, 2018; TAMADDONFARD *et al.*, 2019).

O aumento da acidez, somado ao comprometimento no fluxo sanguíneo (prostaglandinas são mediadores vasodilatadores), leva à isquemia e necrose do epitélio do estômago (LIVERSIDGE; CONZENTINO, 1995; TARNAWSKI; AHLUWALIA; JONES, 2013).

Toda essa cascata culmina na ruptura da superfície epitelial e subsequente infiltração leucocitária (EL-ABHAR, 2010).

Por fim, há síntese e liberação de mediadores inflamatórios e apoptóticos, além de superprodução de EROs, um fator-chave para se determinar a severidade da úlcera gástrica induzida por AINEs (ERASLAN *et al.*, 2020; TAMADDONFARD *et al.*, 2019). Portanto, assim como em outros modelos, é fundamental que o composto avaliado tenha potencial antioxidante para que se efetive o seu papel terapêutico contra esse tipo de úlcera (ALVES *et al.*, 2020, FU *et al.*, 2018).

Outra questão a ser considerada, no modelo de indução de úlcera gástrica por AINEs, é a variedade de métodos para avaliar a lesão macroscópica. Há pelo menos três formas diferentes de se mensurar o dano à mucosa: a porcentagem da área ulcerada da mucosa (mm²), usando programa planimétrico (CHEN *et al.*, 2016; VASCONCELOS *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2018); o índice ulcerativo, em que o número de úlceras em cada estômago é contado e a média calculada em cada grupo como o número de úlceras por grupo (EL-ASHMAWY *et al.*, 2016; KOUSHKI *et al.*, 2019); a pontuação de acordo com a severidade, método em que uma série de parâmetros é avaliada e pontuada de acordo com a gravidade da lesão.

O sistema de pontos consiste em valores atribuídos a cada úlcera encontrada, em que são avaliadas a coloração avermelhada; a presença de úlceras em forma de mancha, de faixa hemorrágica,

de úlceras profundas e de úlceras com perfuração (PAIVA *et al.*, 1998; SZABO *et al.*, 1985).

2.3 Outros Modelos de Indução de Lesão Gástrica

Além dos modelos de úlcera gástrica induzidos por etanol e AINEs, outros modelos experimentais são descritos na literatura (OKABE; AMAGASE, 2005; ADINORTEY *et al.*, 2013). O modelo de indução de lesão gástrica por estresse tem o intuito de mimetizar o papel do estresse na etiologia da ulceração gástrica. O estresse continuado é um indutor ulcerativo potente. Um estudo realizado com camundongos C57BL/6 (animais isogênicos), com ou sem infecção por *H. pylori*, demonstrou que a exposição a um estresse de retenção de imersão em água, repetido três vezes por semana, ao longo de oito semanas, produziu severo dano à mucosa, independentemente da infecção por *H. pylori* (KIM *et al.*, 2002).

O modelo de estresse por contenção hipotérmica (imobilização e frio), um dos modelos de lesão gástrica induzida por estresse mais usados, é caracterizado por causar diversos comprometimentos às funções endócrina e nervosa (MURAKAMI *et al.*, 1985). O estômago é acometido com ulcerações hemorrágicas e erosões alongadas na porção glandular devido, principalmente, ao aumento da secreção gástrica, da atividade da pepsina e redução da secreção de muco (SAAD; AGHA, 2001; MORSY *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2015).

Apesar da fisiopatologia complexa, a ativação contínua do sistema nervoso autônomo contribui fortemente para o surgimento de

lesões, uma vez que o aumento da liberação de catecolaminas é um dos fatores-chave, assim como a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e a liberação de cortisol (ELSHAZLY; ABD EL MOTTELEB; IBRAHIM, 2018; SALES *et al.*, 2018).

Nesse modelo, a produção das úlceras também ocorre pela liberação de histamina, a qual estimula a secreção ácida e reduz a produção de muco. A produção de radicais livres, ativação de mastócitos e liberação de citocinas também são estimulados pela histamina, promovendo um fluxo sanguíneo insuficiente para a mucosa, além de alterações na geração de prostaglandinas (ADINORTEY *et al.*, 2013; MENG *et al.*, 2019; SHARMA *et al.*, 2011).

A indução de lesões gástricas pelo modelo hipotérmico ocorre com os animais em jejum, após terem as patas anteriores e posteriores amarradas a uma prancha de madeira plana ou a uma caixa de contenção. Uma vez imobilizados, os animais, mais comumente ratos, são colocados em ambientes de baixa temperatura ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) sem possibilidade de contato visual, por algumas horas. Após esse período, são eutanasiados para remoção do estômago (DEKANSKI *et al.*, 2009; ELSHAZLY; ABD EL MOTTELEB; IBRAHIM, 2018).

O modelo experimental de indução de lesões gástricas por ligação pilórica é útil para avaliar compostos com potencial ação antissecretora, uma vez que a inibição da secreção gástrica, com o aumento da produção de muco, são fatores importantes no tratamento da úlcera gástrica (ADINORTEY *et al.*, 2013; MISHRA, BAJPAI; CHANDRA, 2019).

O protocolo de indução consiste em fazer uma pequena incisão na linha média do animal, previamente anestesiado e em jejum. A partir daí, faz-se a ligação da porção pilórica do estômago, de forma a impedir o fluxo do suco gástrico. Em seguida, o estômago é cuidadosamente reinserto na cavidade abdominal, com a sutura de sua parede. O tempo estimado entre o fim da cirurgia de ligação pilórica e a eutanásia dos animais pode variar de acordo com o estudo, mas, normalmente, é de quatro ou cinco horas (KANDHARE *et al.*, 2011; MENG *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2018).

É importante destacar que aspectos da patologia, nos modelos experimentais de lesões gástricas induzidas por algumas drogas, também podem ser avaliados por análise microscópica. Essa é uma ferramenta que permite a análise seletiva do impacto inflamatório e apoptótico na mucosa, não observado em nível macroscópico; quantifica a extensão das lesões; e pode ser utilizada para complementar os resultados da análise macroscópica (SIMÕES *et al.*, 2019).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os diversos modelos de indução de lesões gástricas apresentados constituem-se em ferramentas práticas e relativamente simples para testar a ação global de um composto qualquer na terapêutica da úlcera gástrica, doença cuja prevalência mundial é de cerca de 10%, com taxa de incidência atingindo 0,3% ao ano, ao custo de bilhões de dólares. Tal prevalência é ainda maior, em países da América Latina (LANAS; CHAN, 2017).

Adicionalmente, os métodos descritos possibilitam a avaliação do eventual efeito gastroprotetor do composto testado sobre uma função específica do estômago, discriminando seu mecanismo de ação na complexa e multifatorial fisiopatologia da lesão ulcerativa da mucosa gástrica. Portanto, os modelos experimentais de lesão gástrica em animais, especialmente murinos, são ferramentas importantes na prospecção de novos fármacos e terapias seguros e eficazes com ação antiulcerogênica.

REFERÊNCIAS

- ABDELFATTAH, M. S. *et al.* Prodigiosins from a marine sponge-associated actinomycete attenuate HCl/ethanol-induced gastric lesion via antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. *PloS One*, v. 14, n. 6, p. e0216737, 2019.
- ABDULLA, M. A. *et al.* Effect of culinary-medicinal lion's mane mushroom, *Herici-ium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. (Aphyllorphoromycetideae), on ethanol-induced gastric ulcers in rats. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, v. 10, n. 4, p. 325-330, 2008.
- ADINORTEY, M. B. *et al.* A. *In vivo* models used for evaluation of potential anti-gastroduodenal ulcer agents. *Ulcers*, 2013, 796405, 2013.

- AL-QARAWI, A. A. *et al.* A. The ameliorative effect of dates (*Phoenix dactylifera* L.) on ethanol-induced gastric ulcer in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 98, n. 3, p. 313-317, 2005.
- AL-QURASHY, S. *et al.* Olive (*Olea europaea*) leaf methanolic extract prevents HCl/ethanol-induced gastritis in rats by attenuating inflammation and augmenting antioxidant enzyme activities. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, n. 91, p. 338-349, 2017.
- ALENCAR, P. O. C. *et al.* A novel antioxidant sulfated polysaccharide from the algae *Gracilaria caudata*: In vitro and in vivo activities. *Food Hydrocolloids*, n. 90, p. 28-34, 2019.
- ALLAJ, V.; GUO, C.; NIE, D. Non-steroid anti-inflammatory drugs, prostaglandins, and cancer. *Cell & Bioscience*, v. 3, n. 1, p. 1-13, 2013.
- ALVES, G. M. *et al.* Sildenafil attenuates nonsteroidal anti-inflammatory-induced gastric ulceration in mice via antioxidant and antigenotoxic mechanisms. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 48, n. 3, p. 401-411, 2020.
- AMARAL, G. P. *et al.* Protective action of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. in gastric ulcer prevention induced by ethanol in rats. *Food and Chemical Toxicology*, n. 55, p. 48-55, 2013.
- ARAB, H. H. *et al.* Diosmin protects against ethanol-induced gastric injury in rats: novel anti-ulcer actions. *PLoS One*, v. 10, n. 3, p. e0122417, 2015.
- BADR, A. M.; EL-ORABI, N. F.; ALI, R. A. The implication of the crosstalk of Nrf2 with NOXs, and HMGB1 in ethanol-induced gastric ulcer: potential protective effect is afforded by Raspberry Ketone. *PLoS One*, v. 14, n. 8, p. e0220548, 2019.
- BARBOSA DA LUZ, B. *et al.* Effectiveness of the polyphenols-rich *Sedum dendroideum* infusion on gastric ulcer healing in rats: roles of protective endogenous factors and antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. *Journal of Ethnopharmacology*, p. 114.260, 2021.
- BHATTACHARYYA, A. *et al.* Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol Rev.*, v. 94, n. 2, p. 329-354, 2014.
- BERGSTROM, S. *et al.* Structure of prostaglandin E, F1 and F2. *Acta Chemica Scandinavica*, v. 16, n. 2, p. 501, 1962.

BINDU, S.; MAZUMDER, S.; BANDYOPADHYAY, U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochemical Pharmacology*, n. 180, p. 114-147, 2020.

BHARGAVA, K. P.; GUPTA, M. B.; TANGRI, K. K. Mechanism of ulcerogenic activity of indomethacin and oxyphenbutazone. *European Journal of Pharmacology*, n. 22, p. 2, p. 191-195, 1973.

BRODIE, D. A. Experimental peptic ulcer. *Gastroenterology*, v. 55, n. 1, p. 125-134, 1968.

BRODIE, D. A. Ulceration of the stomach produced by restraint in rats. *Gastroenterology*, n.43, p. 107-109, 1962.

BRODIE, D. A.; HANSON, H. M. A study of the factors involved in the production of gastric ulcers by the restraint technique. *Gastroenterology*, v. 38, n. 3, p. 353-360, 1960.

BRZOZOWSKI, T. *et al.* Involvement of endogenous cholecystinin and somatostatin in gastroprotection induced by intraduodenal fat. *Journal of Clinical Gastroenterology*, v. 27, n. S1, p. S125-S137, 1998.

BUENO, G. *et al.* The essential oil from *Baccharis trimera* (Less.) DC improves gastric ulcer healing in rats through modulation of VEGF and MMP-2 activity *Journal of Ethnopharmacology*, n. 271, p. 113-832, 2021.

BUTSCH, J. L. Ulcers of the gastro-intestinal tract with special reference to gastrojejunal ulcers. *Thesis*, 1919.

CHATURVEDI, S. *et al.* Gastroprotective effect of formononetin against ethanol-induced gastric ulceration in rats via augmentation of cytoprotective markers and curtailing apoptotic gene expression. *Pharmacognosy Magazine*, v. 14, n. 59, p. 605-612, 2018.

CHAVES, L. D. S. *et al.* Antiinflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria caudata*. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, v. 35, n. 1, p. 93-100, 2013.

CHEN, S. H. *et al.* PAN, S. Protective effects of Ginkgo biloba extract on the ethanol-induced gastric ulcer in rats. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, v. 11, p. 24, p. 3.746-3.750, 2005.

CHEN, X. Y. *et al.* The gastroprotective effect of pogostone from *Pogostemonis Herba* against indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Experimental Biology and Medicine*, v. 241, n. 2, p. 193-204, 2016.

DEKANSKI, D. *et al.* Attenuation of cold restraint stress-induced gastric lesions by an olive leaf extract. *Gen Physiol Biophys*, v. 28, n. 9, p. 135-142, 2009.

DINIZ, L. R. L. *et al.* Gastroprotective effects of the essential oil of *Hyptis crenata* Pohl ex Benth. on gastric ulcer models. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 149, n. 3, p. 694-700, 2013.

DJAHANGUIRI, B. Effect of a single dose of phentolamine and mjl 1999 on aspirin-induced gastric ulceration in rats. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 21, n. 8, p. 541-542, 1969.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. *Methods in Enzymology*, v. 186, p. 421-431, 1990.

EISNER, F. *et al.* Gastric ulcer complications after the introduction of proton pump inhibitors into clinical routine: 20-year experience. *Visceral Medicine*, v. 33, n. 3, p. 221-226, 2017.

EL-ABHAR, H. S. Coenzyme Q10: a novel gastroprotective effect via modulation of vascular permeability, prostaglandin E2, nitric oxide and redox status in indomethacin-induced gastric ulcer model. *European Journal of Pharmacology*, v. 649, n. 1-3, p. 314-319, 2010.

EL-ASHMAWY, N. E.; KHEDR, E. G.; EL-BAHRAWY, H. A.; SELIM, H. M. Nebivolol prevents indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Journal of Immunotoxicology*, v. 13, n. 4, p. 580-589, 2016.

ELSHAZLY, S. M. *et al.* Hesperidin protects against stress induced gastric ulcer through regulation of peroxisome proliferator activator receptor gamma in diabetic rats. *Chemico-biological Interactions*, v. 291, p. 153-161, 2018.

ERASLAN, E. *et al.* Agomelatine prevents indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Pharmacological Reports*, p. 1-8, 2020.

FAHMY, N. M. *et al.* Gastroprotective effects of *Erythrina speciosa* (Fabaceae) leaves cultivated in Egypt against ethanol-induced gastric ulcer in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 248, p. 112-129, 2020.

FALCÃO, H. S. *et al.* Gastric and duodenal antiulcer activity of alkaloids: a review. *Molecules*, v. 13, n. 12, p. 3198-3223, 2008.

FAZALDA, A.; QURASIAH, A.; NUR AZLINA, M. F. Antiulcer effect of honey in nonsteroidal anti-inflammatory drugs induced gastric ulcer model in rats: a systematic review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018.

FU, Y. *et al.* Gastroprotective and anti-ulcer effects of oxymatrine against several gastric ulcer models in rats: Possible roles of antioxidant, antiinflammatory, and prosurvival mechanisms. *Phytotherapy Research*, v. 32, n. 10, p. 2047-2058, 2018.

FORMIGA, R. O. *et al.* Effect of *p*-cymene and rosmarinic acid on gastric ulcer healing – Involvement of multiple endogenous curative mechanisms. *Phytomedicine*, v. 86, p. 153.497, 2021.

FREIRE, R. S. *et al.* Synthesis and antioxidant, anti-inflammatory and gastro-protector activities of anethole and related compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.13, p. 4.353-4.358, 2005.

GRAHAM, D. Y.; KHALAF, N. Peptic ulcer disease. *Geriatric Gastroenterology*, p. 1-31, 2020.

GÓMEZ-ABELLÁN, V.; SEPULCRE, M. P. The role of prostaglandins in the regulation of fish immunity. *Molecular Immunology*, v. 69, p. 139-145, 2016.

GREGGIO, E. Des ulcères gastro-duodénaux. *Arch. de Méd. Expér. et d'Anat. Path*, v. 27, p. 533, 1916.

GUEVARA, B.; COGDILL, A. G. Helicobacter pylori: A review of current diagnostic and management strategies. *Digestive Diseases and Sciences*, p. 1-15, 2020.

Gylres, K. Gastric mucosal protection: from prostaglandins to gene-therapy. *Current Medicinal Chemistry*, v. 12, n. 2, p. 203-215, 2005.

HAO, L. *et al.* Indomethacin enhances brown fat activity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 365, n. 3, p. 467-475, 2018.

HOSSEN, M. J. *et al.* The anti-inflammatory effects of an ethanolic extract of the rhizome of *Atractylodes lancea*, involves Akt/NF- κ B signaling pathway inhibition. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 277, p. 114.183. 2021.

HUH, K. *et al.* Inhibitory effects of DA-9601 on ethanol-induced gastrohemorrhagic lesions and gastric xanthine oxidase activity in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 88 n. 2-3, p. 269-273, 2003.

HUNT, R. H. *et al.* The stomach in health and disease. *Gut*, v. 64, n. 10, p. 1.650-1.668, 2015.

HWANG, J. J. *et al.* Eradication rate and histological changes after *Helicobacter pylori* eradication treatment in gastric cancer patients following subtotal gastrectomy. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, v. 21, n. 13, p. 3.936, 2015.

KAHRAMAN, A. *et al.* The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. *Toxicology*, v. 183, n. 1-3, p. 133-142, 2003.

KANDHARE, A. D. *et al.* The ameliorative effect of fisetin, a bioflavonoid, on ethanol-induced and pylorus ligation-induced gastric ulcer in rats. *International Journal of Green Pharmacy (IJGP)*, v. 5, n. 3, 2011.

KAWAHARA, K. *et al.* Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1851, n.n4), p. 414-421, 2015.

KIM, Y. H. *et al.* Long-term stress and *Helicobacter pylori* infection independently induce gastric mucosal lesions in C57BL/6 mice. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, v. 37, n. 11, p. 1259-1264, 2002.

KINSELLA, J. E. *et al.* Metabolism of trans fatty acids with emphasis on the effects of trans, trans-octadecadienoate on lipid composition, essential fatty acid, and prostaglandins: An overview. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 34, n. 10, p. 2307-2.318, 1981.

KHODER, G. *et al.* Potential role of probiotics in the management of gastric ulcer. *Experimental and Therapeutic Medicine*, v. 12, n. 1, p. 3-17, 2016.

KOC, K. *et al.* Gastroprotective effects of oleuropein and thymol on indomethacin-induced gastric ulcer in Sprague-Dawley rats. *Drug and Chemical Toxicology*, v. 43, n. 5, p. 441-453, 2020.

KOUSHKI, M. *et al.* Therapeutic effects of hydro-alcoholic extract of *Achillea wilhelmsii* C. Koch on indomethacin-induced gastric ulcer in rats: A proteomic and metabolomic approach. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 19, n. 1, p. 1-16, 2019.

LANAS, A. We are using too many PPIs, and we need to stop: A European perspective. *American Journal of Gastroenterology*, v. 111, n. 8, p. 1085-1086, 2016.

LANAS, A.; CHAN, F. K. Peptic ulcer disease. *The Lancet*, v. 390, n. 10.094, p. 613-624, 2017.

LA CASA, C. *et al.* Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 71, n. 1-2, p. 45-53, 2000.

LI, W. *et al.* Protective effect of tetrahydrocoptisine against ethanol-induced gastric ulcer in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 272, n. 1, p. 21-29, 2013.

LI, Y. *et al.* Intra-gastric administration of heparin enhances gastric ulcer healing through a nitric oxide-dependent mechanism in rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 399, n. 2-3, 205-214, 2000.

LIVERSIDGE, G. G.; CONZENTINO, P. Drug particle size reduction for decreasing gastric irritancy and enhancing absorption of naproxen in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, v.125, n. 2, p. 309-313, 1995.

LÖVGREN, O.; ALLANDER, E. Side-effects of Indomethacin. *British Medical Journal*, v. 1, n. 5.375, 1964.

MAGALHÃES, R. M. *et al.* Gastroprotective effect of alpha-pinene and its correlation with antiulcerogenic activity of essential oils obtained from Hyptis species. *Pharmacognosy Magazine*, v. 11, n. 41, p. 123-130, 2015.

MALFERTHEINER, P. *et al.* Management of Helicobacter pylori infection - the Maastricht V/Florence consensus report. *Gut*, v. 66, n. 1, p. 6-30, 2017.

MATSUDA, H. *et al.* Effects of allyl isothiocyanate from horseradish on several experimental gastric lesions in rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 561, n. 1-3, p. 172-181, 2007.

MAYER, B. *et al.* Gastroprotective constituents of Salvia officinalis L. *Fitoterapia*, v.80, n. 7), p. 421-426, 2009.

MIZUI, T.; DOTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. *Japanese Journal of Pharmacology*, v. 33, n. 5, p. 939-945, 1983.

MENG, J. *et al.* Study of the mechanism of anti-ulcer effects of virgin coconut oil on gastric ulcer-induced rat model. *Archives of Medical Science: AMS*, v. 15, n. 5, 2019.

MESIA-VELA, S. *et al.* A. J. In vivo inhibition of gastric acid secretion by the aqueous extract of *Scoparia dulcis* L. in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, n. 111, p. 403-408, 2007.

MISHRA, A. P.; BAJPAI, A.; CHANDRA, S. A comprehensive review on the screening models for the pharmacological assessment of antiulcer drugs. *Current Clinical Pharmacology*, v. 14, n. 3, p. 175-196.

MORAES, T. M. Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: Role of prostaglandins and gastric mucus secretion. *Chemico-Biological Interactions*, v. 180, n. 3, p. 499-505, 2009.

MONTEIRO, M. V. B. *et al.* Topical antiinflammatory, gastroprotector and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 111, n. 2, p. 378-382, 2007.

MORIMOTO, Y. *et al.* Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. *The Japanese Journal of Pharmacology*, v. 57, n. 4, p. 495-505, 1991.

MORSY, M. A. Protective effects of nebivolol against cold restraint stress-induced gastric ulcer in rats: Role of NO, HO-1, and COX-1, 2. *Nitric Oxide*, v. 27, n. 2, p. 117-122, 2012.

MOUSA, A. M. *et al.* Antiulcerogenic effect of *Cuphea ignea* extract against ethanol-induced gastric ulcer in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 19, n. 1, p. 1-13, 2019.

MURAKAMI, M. *et al.* Pathophysiology and pathogenesis of acute gastric mucosal lesions after hypothermic restraint stress in rats. *Gastroenterology*, v. 88, n. 3, p. 660-665, 1985.

NARAYANAN, M.; REDDY, K. M.; MARSICANO, E. Peptic ulcer disease and *Helicobacter pylori* infection. *Missouri Medicine*, v. 115, n. 3, p. 219, 2018.

NUGTEREN, D. H.; HAZELHOF, E. Isolation and properties of intermediates in prostaglandin biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, v. 326, n. 3, p. 448-461, 1973.

- OATES, P. J.; HAKKINEN, J. P. Studies on the mechanism of ethanol-induced gastric damage in rats. *Gastroenterology*, v. 94, n. 1, p. 10-21, 1988.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.
- OKABE, S.; AMAGASE, K. An overview of acetic acid ulcer models -The history and state of the art of peptic ulcer research. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 28, n. 8, p. 1321-1341, 2005.
- PAIVA, L. A. F.; RAO, V. S. N.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 62, n. 1, p. 73-78, 1998.
- PALLE, S.; KANAKALATHA, A.; KAVITHA, C. N. Gastroprotective and antiulcer effects of *Celastrus paniculatus* seed oil against several gastric ulcer models in rats. *Journal of Dietary Supplements*, v. 15, n. 4, p. 373-385, 2018.
- RAINSFORD, K. D. The effects of 5-lipoxygenase inhibitors and leukotriene antagonists on the development of gastric lesions induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in mice. *Agents and Actions*, v. 21, n. 3, p. 316-319, 1987.
- REYES, V. E.; PENICHE, A. G. *Helicobacter pylori* deregulates T and B cell signaling to trigger immune evasion. In: BACKERT, S. *Molecular Mechanisms of Inflammation: induction, resolution and escape by Helicobacter pylori*. [S. l.]: Springer, 2019. p. 229-265.
- RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 31, n. 5, p. 986-1000, 2011.
- ROBERT, A. *et al.* Cytoprotection by prostaglandins in rats: Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. *Gastroenterology*, v. 77, n. 3, p. 433-443, 1979.
- ROBERT, A. Cytoprotection by prostaglandins. *Gastroenterology*, v. 77, n. 4, p. 761-767, 1979.
- RUSSELL, R. I. Protective effects of the prostaglandins on the gastric mucosa. *The American Journal of Medicine*, v. 81, n. 2, p. 2-4, 1986.
- SAAD, S. F.; AGHA, A. M. Effect of bromazepam on stress-induced gastric ulcer in rats and its relation to brain neurotransmitters. *Pharmacological Research*, v. 44, n. 6, p. 495-501, 2001.

SALEM JR, N. *et al.* J. *In vivo* conversion of linoleic acid to arachidonic acid in human adults. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 60, n. 5-6, p. 407-410, 1999.

SALES, I. R. P. *et al.* Cytoprotective, antioxidant and anti-inflammatory mechanism related to antiulcer activity of *Cissampelos sympodialis* Eichl. in animal models. *Journal of Ethnopharmacology*, n. 222, p. 190-200, 2018.

SAMUELSSON, B. Biosynthesis of prostaglandins. *Federation. proc.; U.S.A.* v. 31; n. 5, p. 1442-1450, 1972.

SCHNEIDER, W. P. The Chemistry of the Prostaglandins. *In: Karim S.M.M. (eds). The Prostaglandins*, p. 293-319, 1972. DOI 10.1007/978-94-010-9697-3_9.

SCHNOLL-SUSSMAN, F.; NIEC, R.; KATZ, P. O. Proton pump inhibitors: The good, bad, and ugly. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics*, v. 30, n. 2, p. 239-251, 2020.

SCHOLZ, M. *et al.* Ortho-Carborane derivatives of indomethacin as cyclooxygenase (COX)-2 selective inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 20, n. 15, p. 4830-4837, 2012.

SENAY, E. C.; LEVINE, R. J. Synergism between gold and restraint for rapid production of stress ulcers in rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 124, n. 4, p. 1221-1223, 1967.

SHARMA, P. *et al.* Antiulcerogenic activity of Terminalia chebula fruit in experimentally induced ulcer in rats. *Pharmaceutical Biology*, v. 49, n. 3, p. 262-268, 2011.

SHAY, H. *et al.* A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterology*, n. 5, p. 43-61, 1945.

SIEWIERA, K. *et al.* Long-term untreated streptozotocin-diabetes leads to increased expression and elevated activity of prostaglandin H2 synthase in blood platelets. *Platelets*, v. 27, n. 3, p. 203-211, 2016.

SILVA, D. M. *et al.* Effect of allantoin on experimentally induced gastric ulcers: Pathways of gastroprotection. *European Journal of Pharmacology*, n. 821, p. 68-78, 2018.

SILVA, M. I. G. *et al.* Gastroprotective activity of isopulegol on experimentally induced gastric lesions in mice: investigation of possible mechanisms of action. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 380, n. 3, p. 233-245, 2009.

SIMÕES, S. *et al.* Animal models of acute gastric mucosal injury: Macroscopic and microscopic evaluation. *Animal models and experimental medicine*, v. 2, n. 2, p. 121-126, 2019.

SOMOGYI, A.; KOVACS, K.; SELYE, H. Jejunal ulcers produced by indomethacin. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 21, n. 2, 122-123, 1969.

SOUSA, W. M. *et al.* Sulfated polysaccharide fraction from marine algae *Solieria filiformis*: Structural characterization, gastroprotective and antioxidant effects. *Carbohydrate Polymers*, n. 152, p. 140-148, 2016.

STRAND, D. S.; KIM, D.; PEURA, D. A. 25 years of proton pump inhibitors: A comprehensive review. *Gut and Liver*, v. 11, n.1, 27, 2017.

SULEYMAN, H. *et al.* Different mechanisms in formation and prevention of indomethacin-induced gastric ulcers. *Inflammation*, v. 33, n.4, p. 224-234, 2010.

SZABO, S.; GOLDBERG, I. Experimental pathogenesis: Drugs and chemical lesions in the gastric mucosa. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, n. 25, sup. 174, p. 1-8, 1990.

SZABO, S. *et al.* A quantitative method for assessing the extent of experimental gastric erosions and ulcers. *Journal of Pharmacological Methods*, v. 13, n. 1, p. 59-66, 1985.

TAMADDONFARD, E. *et al.* Safranal, a constituent of saffron, exerts gastro-protective effects against indomethacin-induced gastric ulcer. *Life Sciences*, n. 224, p. 88-94, 2019.

TARNAWSKI, A. S.; AHLUWALIA, A.; JONES, M. K. Gastric cytoprotection beyond prostaglandins: Cellular and molecular mechanisms of gastroprotective and ulcer healing actions of antacids. *Current Pharmaceutical Design*, v. 19, n. 1, p. 126-132, 2013.

TARNAWSKI, A. S.; AHLUWALIA, A.; JONES, M. K. The mechanisms of gastric mucosal injury: focus on microvascular endothelium as a key target. *Current medicinal chemistry*, v. 19, n. 1, p. 4-15, 2012.

TAYLOR, R. T. *et al.* Gastric ulceration occurring during indomethacin therapy. *Br Med J*, v. 4, n. 5633, p. 732-737, 1968.

TERANO, A. *et al.* T. Role of superoxide and hydroxyl radicals in rat gastric mucosal injury induced by ethanol. *Gastroenterologia Japonica*, v. 24, n. 5, p. 488-493, 1989.

THABREW, M. I.; ARAWWAWALA, L. D. A. M. An overview of *in vivo* and *in vitro* models that can be used for evaluating anti-gastric ulcer potential of medicinal plants. *Austin Biol.* 2016, v. 1, n. 2, p. 1007, 2018

VALCHEVA-KUZMANOVA, S. *et al.* Protective effects of Aronia melanocarpa juices either alone or combined with extracts from Rosa canina or Alchemilla vulgaris in a rat model of indomethacin-induced gastric ulcers. *Food and Chemical Toxicology*, n.132, p. 110-739, 2019.

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature new Biology*, v. 231, n. 25, p. 232-235, 1971.

VASCONCELOS, M. S. *et al.* Anti-inflammatory and wound healing potential of cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.) in mice. *Experimental Biology and Medicine*, v. 240, n. 12, p. 1.648-1.655, 2015.

VERNON, A. H. Medical management of peptic ulcer disease. *In: The SAGES Manual of Foregut Surgery*, p. 653-659, 2019.

WANG, Y. *et al.* Protective effect of sea cucumber (*Acaudina molpadioides*) fucoidan against ethanol-induced gastric damage. *Food Chemistry*, v. 133, n. 4, p. 1414-1419, 2012.

WANG, X. Y. *et al.* Gastroprotective activity of polysaccharide from *Hericium erinaceus* against ethanol-induced gastric mucosal lesion and pylorus ligation-induced gastric ulcer, and its antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers*, n. 186, p. 100-109, 2018.

WASMAN, S. Q. *et al.* Cytoprotective activities of Polygonum minus aqueous leaf extract on ethanol-induced gastric ulcer in rats. *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 4, n. 24, p. 2.658-2.665, 2010.

WHITTLE, B. J. R. Temporal relationship between cyclooxygenase inhibition, as measured by prostacyclin biosynthesis, and the gastrointestinal damage induced by indomethacin in the rat. *Gastroenterology*, v. 80, n.1, p. 94-98, 1981.

WU, C. Y. Initiatives for a healthy stomach. *Current Treatment Options in Gastroenterology*, v. 17, n. 4, p. 628-635, 2019.

WU, J. Z. *et al.* Protective role of β -patchoulene from Pogostemon cablin against indomethacin-induced gastric ulcer in rats: Involvement of anti-inflammation and angiogenesis. *Phytomedicine*, n. 39, p. 111-118, 2018.

WU, Q. H. *et al.* Oxidative stress-mediated cytotoxicity and metabolism of T-2 toxin and deoxynivalenol in animals and humans: An update. *Archives of Toxicology*, v. 88, n. 7, p. 1309-1326, 2014.

YU, C. *et al.* Taurine zinc solid dispersions protect against cold-restraint stress-induced gastric ulceration by upregulating HSP70 and exerting an anxiolytic effect. *European Journal of Pharmacology*, n. 762, p. 63-71, 2015.

YU, Y. *et al.* Occurrence, biological consequences, and human health relevance of oxidative stress-induced DNA damage. *Chemical Research in Toxicology*, v. 29, n. 12, p. 2.008-2.039, 2016.

ZHENG, H. *et al.* Evaluation of protective effects of costunolide and dehydrocostuslactone on ethanol-induced gastric ulcer in mice based on multi-pathway regulation. *Chemico-Biological Interactions*, n. 250, p. 68-77, 2016.

CAPÍTULO 11 <doi>10.51996/9788574853994.cap11</doi>

MODELOS ANIMAIS EM ALERGENICIDADE

*Chayane Gomes Marques
Djane Ventura de Azevedo¹
Ana Cláudia Marinho da Silva
José Ytalo Gomes da Silva
Maria Izabel Florindo Guedes*

Resumo: As doenças alérgicas constituem relevante problema de saúde pública no mundo. Fatores ambientais e genéticos são correlacionados com o aumento de alergias alimentares, cutâneas e respiratórias. Desde o século XX, quando o termo alergia foi cunhado pela primeira vez, as pesquisas nesse campo evoluíram, significativamente, com o uso de animais para a elucidação de mecanismos celulares e moleculares. Alguns avanços terapêuticos também ocorreram, baseados na identificação de biomarcadores; no desenvolvimento de fármacos; e na imunoterapia. Considerando o exposto, neste capítulo, são apresentados os principais modelos animais empregados no estudo de alergias humanas e, também, as vantagens e limitações de cada um deles. Na última década, com a evolução das ciências ômicas, novas perspectivas na com-

¹ Centro de Educação, Ciências e Tecnologia (Cecitec), Universidade Estadual do Ceará (Uece), Tauá, Ceará, Brasil. Os demais autores estão vinculados ao Centro de Ciências da Saúde (CCS), Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular, Universidade Estadual do Ceará (Uece), Fortaleza, Ceará, Brasil.
E-mail para correspondência: chayane.gomes@uece.br

preensão e terapia das alergias têm sido lançadas para a Ciência. Entretanto, testes *in vivo* ainda são necessários e complementares àqueles *in silico* e *in vitro*, sobretudo, para o monitoramento do curso das doenças e elucidação da interface genética-ambiente.

Palavras-chave: Alergia alimentar. Asma. Hipersensibilidade. Roedores. *Zebrafish*.

ANIMAL MODELS IN ALLERGENICITY

Abstract: Allergic diseases are a significant public health problem in the world. Environmental and genetic factors are correlated with the increase in food, skin, and respiratory allergies. Since the 20th century, when the term allergy was first coined, research in this field has evolved significantly with the use of animals to elucidate cellular and molecular mechanisms. Some therapeutic advances have also occurred based on the identification of biomarkers, drug development, and immunotherapy. This chapter briefly presents the main models of small animals used in the study of human allergies and exposes the advantages and limitations of each of them. In the last decade, with the evolution of omic sciences, new perspectives in the understanding and therapy of allergies have been launched for science. However, *in vivo* tests are still necessary, complementary to those *in silico*, and *in vitro*, especially for monitoring diseases and elucidating the genetic-environment interface.

Keywords: Food Allergy. Asthma. Hypersensitivity. Rodents. *Zebrafish*.

1 INTRODUÇÃO

O termo alergia foi cunhado em 1906, por Clemens Peter von Pirquet, para se referir a indivíduos que apresentavam hipersensibilidade à soroterapia, ou seja, que desenvolviam sinais e sintomas quando expostos ao soro, o que ficou conhecido como “doença do soro” (VON PIRQUET, 1906). Assim, esse termo passou a se referir às respostas imunes adaptativas anormais, envolvendo ou não a ligação da imunoglobulina E específica (IgE) ao alérgeno (GALLI; TSAI; PILIPONSKY, 2008).

Nesse contexto, as alergias podem ser ocasionadas de formas multifatoriais. Existem vários tipos de alergias, com destaque para as respiratórias, dermatites, angioedemas, medicamentosas e alimentares (CARABALLO *et al.*, 2020).

As reações alérgicas são precocemente manifestadas, sobretudo em resposta aos alimentos, apresentando manifestações clínicas que variam em função do mecanismo imunológico envolvido (SOLÉ *et al.*, 2018). A atividade alergênica de um antígeno é tradicionalmente associada às respostas induzidas por sua ligação com a imunoglobulina E (IgE) e a anafilaxia é a forma mais grave de alergia mediada por essa imunoglobulina (SOLÉ *et al.*, 2018; CARABALLO *et al.*, 2020).

O aumento da prevalência das doenças alérgicas, em diversas regiões do planeta, tem sido motivo de preocupação devido ao seu impacto nas saúdes física e psicológica dos doentes, bem como nos serviços de saúde, particularmente acarretando o au-

mento de despesas na saúde pública e os consequentes danos socioeconômicos (SIMON, 2018). No Brasil, dados epidemiológicos sobre as doenças alérgicas derivam de estudos populacionais pontuais, o que dificulta uma avaliação próxima da situação real (SOLEÉ *et al.*, 2018).

Um estudo prospectivo envolvendo 234 crianças com suspeita clínica de alergia alimentar revelou incidência de 12,8% na população estudada, de modo que o leite de vaca e ovo figuraram como os principais alérgenos em crianças menores de 2 anos (SENNA *et al.*, 2018). Segundo a Associação Brasileira de Alergia e Imunologia (Asbai), apesar da inexistência de estatísticas oficiais, a prevalência de alergias alimentares, no Brasil, parece se assemelhar à literatura internacional, em que 8% das crianças menores de 2 anos e 2% dos adultos são acometidos (ASBAI, 2019).

Ademais, Nunes *et al.* (2019) mostraram em estudo realizado na cidade de Fortaleza, no Estado do Ceará/Brasil, que 36 crianças, de 1 a 60 meses de idade, alérgicas ao leite de vaca, apresentaram elevados níveis de IgE e IgG1 específicos, na saliva e no soro, para outros alimentos e, dentre esses, peixe. Sabe-se que peixe não é consumido por crianças nessa faixa etária, embora seja um alimento típico do cardápio cearense. Diante disso, os autores sugeriram que as referidas crianças foram sensibilizadas por outras vias de imunização diferentes da oral.

O aumento da incidência das doenças alérgicas foi observado no início da década de 1950, apresentando uma elevação, ainda

mais incisiva, na década de 1990 com as alergias alimentares e manifestações cutâneas (PRESCOTT; ALLEN, 2011). Determinar com precisão a prevalência das Alergias Alimentares (AA) é muito difícil, uma vez que podem ser influenciadas por diversos fatores, como as especificidades das alergias; metodologias dos estudos populacionais; variações geográficas; idade; exposições alimentares; dentre outros casos (SICHERER; SAMPSON, 2014). Em todo o mundo, mais de 220 milhões de pessoas sofrem de alguma forma de alergia alimentar, mas o número relatado indica apenas o início do problema e pode estar subestimado (MANEA *et al.*, 2016).

Os países com acentuado desenvolvimento industrial apresentam atmosferas com partículas de poeira contendo metais e hidrocarbonetos policíclicos. Segundo Shanura *et al.* (2017), estudos de viabilidade celular e produção de citocinas inflamatórias mostram que partículas finas de poeira aumentam a produção de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, IL-6, IL- β e fator de necrose tumoral. O epitélio das vias respiratórias superiores é uma porta de entrada para alérgenos e embora existam defesas anatômicas e moleculares naturais (IWASAKI *et al.*, 2016), as características do ambiente e falhas nas barreiras estruturais ou moleculares dos sujeitos, aumentam a suscetibilidade a alérgenos (SALMI *et al.* (2015).

Pesquisas recentes têm fornecido novos dados sobre fatores de risco genéticos e ambientais (estilo de vida, fatores psicossociais etc.) de doenças atópicas/alérgicas (SIMON, 2018; SCHAARSCHMIDT *et al.*, 2018), tais como rinite, asma e dermatite atópica, que são

cada vez mais frequentes em crianças, jovens e adultos (TSCHEPPE; BREITENEDER, 2017; CHARPIN *et al.*, 2017). Estima-se que fatores ambientais, como a poluição do ar, e fatores ligados ao estilo de vida, como consumo de alimentos industrializados, são desencadeadores de doenças alérgicas. Os métodos de processamento de alimentos e a engenharia genética são considerados os principais introdutores de novas proteínas alimentares, o que requer avaliação da alergenicidade dos produtos (MARSTELLER *et al.*, 2020).

No que diz respeito às pesquisas no campo da alergia e imunologia, os aspectos éticos que envolvem o estudo com humanos tornam a investigação de doenças humanas em animais necessária, sobretudo, por ainda não existirem modelos *in vitro* capazes de simular condições clínicas e fisiológicas mais complexas do ser humano (LEHRER; McCLAIN, 2009; VAN GRAMBERG *et al.*, 2013).

Portanto, a compreensão da alergia em animais tem sido usada para investigar a resposta alérgica em um nível molecular, bem como testar alérgenos alimentares e ambientais *in vivo* (LEHRER; McCLAIN, 2009; SANTORO; MARSELLA, 2014; AUN *et al.*, 2017).

Para o desenvolvimento de um sistema de teste para a caracterização da alergenicidade, modelos animais foram utilizados para definir melhor os mecanismos envolvidos e avaliar a segurança e a eficácia das terapias antes de iniciar os ensaios clínicos (AUN *et al.*, 2017). Nesse sentido, vários critérios são necessários para a qualificação de um modelo de alergia humana, incluindo protocolos de imunização aceitáveis; medidas da resposta alérgica; além da

padronização e validação de materiais e procedimentos (LEHRER; McCLAIN, 2009). Logo, se um sistema de teste em animais pode fornecer, no mínimo, uma base para medir a resposta fisiológica relativa a alérgenos conhecidos, isso é suficiente para estabelecer um modelo que produza uma medida relativa de potencial alergenidade (LEHRER; McCLAIN, 2009).

Nos últimos anos, as pesquisas proporcionaram um progresso imenso na compreensão do mecanismo patogênico das doenças alérgicas e revelaram novos métodos diagnósticos e novas abordagens terapêuticas. Dentre essas, as que envolvem a imunoterapia, como o uso de eosinófilos para bloquear a interleucina-5 (IL-5), ou seu receptor, no tratamento da asma (SIMON, 2018); e, entre os métodos diagnósticos, o teste de ativação de basófilos como um método alternativo aos testes cutâneos (ORNELAS *et al.*, 2018).

Hodiernamente, a aplicação das ciências “ômicas” tem permitido um melhor entendimento da patogênese das alergias e auxiliado na identificação de alvos terapêuticos. Com isso, intensos esforços têm sido empreendidos para encontrar biomarcadores que ajudem a classificar os pacientes; identificar sua capacidade de resposta potencial a terapias específicas; e monitorar a gravidade da doença (SIMON, 2018).

Contudo, com o desenvolvimento de novas terapias, há que se considerar uma provável modificação no curso esperado das doenças, requerendo monitoramento da gravidade da doença; da resposta ao tratamento e da prevenção de reações alérgicas (SIMON, 2018). Além disso, algumas necessidades na área ainda não foram

completamente atendidas, tal como o papel da genética e sua interação com o meio ambiente (SIMON, 2019), de modo que a utilização de animais em modelos alérgicos ainda se faz necessária.

Neste capítulo, objetiva-se avaliar a utilização de animais como modelos na investigação de alergias, com destaque das vantagens e limitações.

2 MODELOS EXPERIMENTAIS EM ALERGIAS

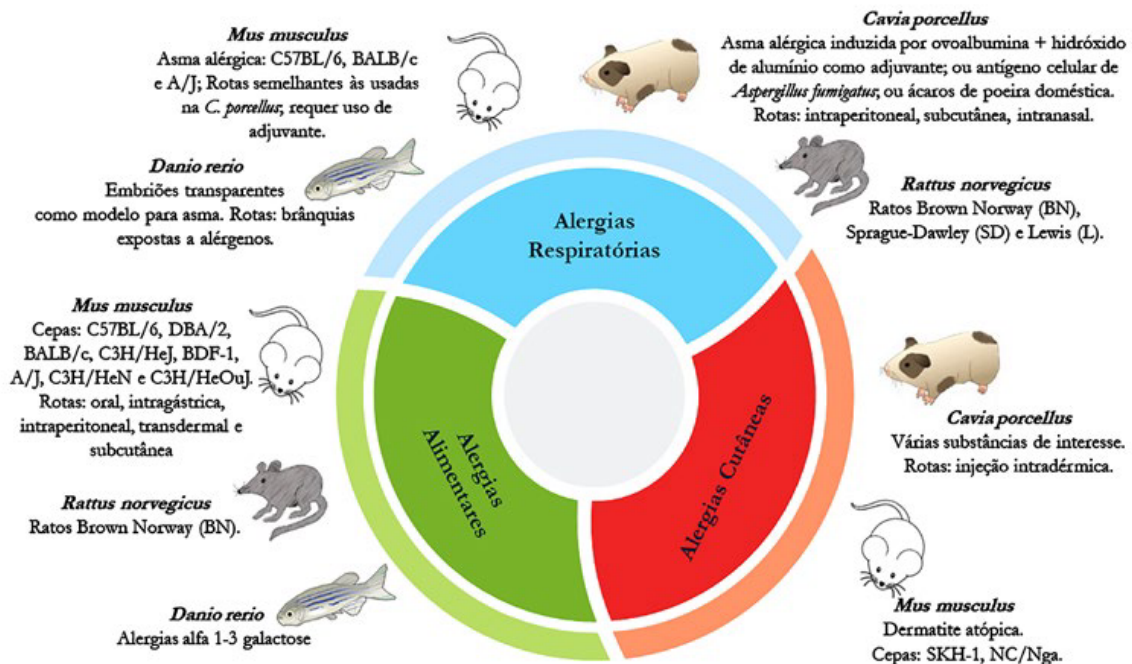
Várias espécies de animais têm sido utilizadas para avaliar a sensibilização e elicitación das respostas alérgicas, dentre as quais ratos, camundongos, porquinhos-da-índia, suínos, ovelhas, cães e *zebrafish* (MARSTELLER *et al.*, 2016). No entanto, devido às diferenças genéticas dessas espécies em relação à espécie humana, limitações são impostas no tocante à escolha da espécie, o que reflete variações nas respostas experimentais e, conseqüentemente, repercute, ainda, na dificuldade de ser estabelecido um modelo fixo ou ideal na área de alergias (MARSTELLER *et al.*, 2016).

Nesse sentido, convém destacar que um modelo animal ideal deveria ser simples; reproduzível em laboratórios ao longo do tempo; específico e sensível o suficiente para distinguir um limite além do qual a alergenicidade relevante seria prevista e capaz de classificar proteínas relacionadas com as respostas alérgicas em humanos (LADICS *et al.*, 2010).

Assim, temos, portanto, modelos que atendem a questões específicas e são complementares a outros modelos experimentais

(KANAGARATHAM; SALLIS; FIEBIGER, 2018). Na Figura 1, ilustram-se os modelos animais usualmente empregados no estudo das alergias respiratórias, cutâneas e alimentares.

Figura 1 – Modelos animais no estudo de alergias humanas



Fonte: Elaborada pelos autores.

2.1 Porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*)

Os porquinhos-da-índia, também denominados de cobaias, pertencem à classe *Mamífera*, ordem *Rodentia* e família *Cavidae*. Seus antecessores são provenientes da América do Sul, mas não se sabe o período exato em que foram levados para a Europa e para todo o continente americano (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA,

2002). Esses roedores medem de 20 cm a 40 cm, pesam entre 500g e 1.500g, na idade adulta, e vivem em média de 4 a 5 anos. Os machos e as fêmeas não diferem na aparência externa, além do tamanho (LAB ANIMAL, 2014).

Esses animais estão entre os modelos tradicionalmente usados para o estudo dos mecanismos celulares e moleculares de doenças imunológicas e infecciosas (PADILLA-CARLIN; McMURRAY; HICKEY, 2008). Os experimentos datam de 1790, com investigações relacionadas ao calor conduzidas por Lavoisier (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002). Posteriormente, em 1882, foram usados para descobrir que a tuberculose é causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (CAMBAU; DRANKOURT, 1882), e tornaram-se modelo padrão-ouro no estudo dessa doença (PADILLA-CARLIN; McMURRAY; HICKEY, 2008). Em 1919, a imunidade adquirida foi descoberta a partir das reações imunológicas dos porquinhos-da-índia em resposta à inoculação com sangue de pessoas com febre amarela (NOGUCHI, 1919).

Foram, também, um dos primeiros modelos usados em testes de sensibilização cutânea por alérgenos, sobretudo, após o desenvolvimento do teste de maximização (do inglês *guinea pig maximization test - GPMT*), em 1969 (MAGNUSSON; KLIGMAN, 1969). No entanto, sua utilização em pesquisas foi relativamente reduzida, nas últimas décadas, devido ao seu tardio sequenciamento genômico (2008), quando comparado ao de camundongos (2002), o que con-

tribuiu para a incorporação desses últimos em estudos para doenças humanas (ROMANENKO *et al.*, 2015). Atualmente, sabe-se que o genoma de porquinhos-da-índia apresenta 78 segmentos autossômicos humanos conservados (ROMANENKO *et al.*, 2015).

Neste tópico, a experimentação com porquinhos-da-índia é discutida em testes de sensibilização dérmica, de alergias respiratórias, com destaque de seu uso na investigação de biomarcadores correlatos como alvos terapêuticos. A utilização desses animais no campo das alergias alimentares não é abordada, tendo em vista seu desuso nas últimas duas décadas, em virtude de limitadas ferramentas para estudar o sistema imune desses roedores (VAN GRAMBERG *et al.*, 2013) e pela incapacidade de produzirem IgE. As respostas alérgicas nesses animais são mediadas por IgG1a e, possivelmente, outros mecanismos também estão envolvidos, tornando a tradução para humanos mais difícil (BØGH *et al.*, 2016).

O teste de sensibilização cutânea em porquinhos-da-índia é descrito pela Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD) - 406 (1992), com base no teste de maximização, que utiliza um adjuvante, e no teste de Buehler. Para o experimento, são necessários, pelo menos, dez animais no grupo de tratamento e cinco no grupo controle. A sensibilização dos animais é realizada por injeção intradérmica ou aplicação tópica da substância teste, seguida por um período de repouso de 10 a 14 dias, no qual se espera a manifestação da resposta imune e os animais são então expostos a uma dose-desafio. A duração total do

teste de maximização varia entre 23 e 25 dias. O teste de Buehler consiste no processo de sensibilização sem adjuvante, no qual a pele fica em contato com um *patch* oclusivo contendo a substância teste por 6 horas, nos dias 0, 7 e 21, para provocar sensibilização, seguindo-se com a fase de duplo desafio, nas semanas 5 e 7 do teste (OECD, 1992).

Após os testes, a extensão e o grau de sensibilização cutânea são comparados entre os grupos controle e tratamento, e avaliados pela escala proposta por Magnusson e Kligman (1969), com escores que variam de 0 a 3 (Tabela 1).

Tabela 1 – Escala para avaliação da sensibilidade cutânea

Escores para Avaliação das Reações	
0	Ausência de reação
1	Eritema discreto ou irregular
2	Eritema moderado e confluyente
3	Eritema intenso e inchaço presente

Fonte: Adaptada de Magnusson e Kligman (1969).

As reações de sensibilização envolvem muitos processos imunológicos e a pele de porquinhos-da-índia, assim como a de suínos, é similar à de humanos, o que os coloca como modelos vantajosos para o desenvolvimento das propriedades sensibilizantes (OECD, 1992; ANVISA, 2012).

No campo das alergias respiratórias, os testes incluem, classicamente, duas fases: sensibilização e desafio. A sensibilização é

tradicionalmente realizada pelas vias intraperitoneal e subcutânea, mas a instilação intranasal de alérgenos tem sido cada vez mais empregada, por ser o modo conhecido através do qual a asma humana é induzida (AUN *et al.*, 2017). Na fase de desafio, os alérgenos são expostos por meio de aerossol, instilação intranasal ou intratraqueal (AUN *et al.*, 2017). Dentre os alérgenos utilizados para o desenvolvimento de asma, têm-se a ovoalbumina adsorvida em hidróxido de alumínio (adjuvante), o antígeno celular de *Aspergillus fumigatus* e ácaros de poeira doméstica (ATHARI; NASABI; ATHARI, 2019).

Os porquinhos-da-índia foram os primeiros a ser introduzidos em estudos sobre a asma (KALLÓS; KALLÓS, 1984) e ainda são empregados em estudos pré-clínicos relacionados ao sistema respiratório, porque possuem inervação autonômica semelhante à das vias respiratórias humanas, com respostas também semelhantes após o contato com alérgenos (CANNING; CHOU, 2008; LAB ANIMAL, 2014; TANNER; SINGLE, 2020). Ademais, esses roedores são muito úteis no estudo de reações anafiláticas, pois a exibem mais rápida e fortemente do que a maioria das outras espécies (LUCARINI *et al.*, 2014).

Um recente estudo, no campo de investigações terapêuticas, avaliou a eficácia do novo antagonista BI01305834 do receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1) para aliviar os sintomas de asma, em modelos de asma alérgica em porquinhos-da-índia, induzidos por injeção intraperitoneal de ovoalbumina e hidróxido de alumínio como adjuvante. Os autores verificaram que a inibição

do TRPA1 pelo BI01305834 evitou a hiperresponsividade das vias aéreas e a resposta asmática precoce e tardia, *in vivo*, bem como a constrição das vias aéreas induzida pelo alérgeno e histamina, *ex vivo* (VAN DEN BERG *et al.*, 2021).

Ademais, o antagonista foi capaz de reverter a broncoconstrição induzida pela ovoalbumina, independentemente da inflamação. Esse efeito foi parcialmente dependente da histamina, sugerindo um papel neuronal e possivelmente não neuronal do TRPA1 na broncoconstrição induzida por alérgenos (VAN DEN BERG *et al.*, 2021). Os autores destacaram, ainda, o TRPA1 como alvo terapêutico no tratamento da asma.

As principais limitações no uso desses animais, no entanto, são a baixa variabilidade genética, que dificulta estudos comparativos; poucos marcadores imunológicos disponíveis; desenvolvimento de tolerância após exposição repetida aos alérgenos; e um reflexo axônio proeminente que, dificilmente, é encontrado nas vias aéreas humanas (CANNING; CHOU, 2008; AUN *et al.*, 2017; TANNER; SINGLE, 2020). Ademais, convém salientar, ainda, que a OECD 429 preconizou, em 2010, o uso do ensaio do linfonodo local em camundongos (do inglês *murine loccal lymph node assay -LLNA*) como método alternativo ao uso de cobaias, a fim de reduzir o número de animais utilizados em experimentos.

2.2 Camundongos (*Mus musculus*)

Os camundongos são mamíferos pertencentes à ordem *Rodentia*, família *Muridae*, subfamília *Murinae* e gênero *Mus* e têm

sido utilizados em pesquisas científicas desde 1600, porém, foram domesticados apenas em 1900, transformando-se em importantes modelos de experimentação (NEVES *et al.*, 2013). O uso desses animais na pesquisa biomédica e em ensaios biológicos despenhou, sobretudo, após o sequenciamento genômico, em 2002 (NEVES *et al.*, 2013; ROMANENKO *et al.*, 2015).

Muitas linhagens de camundongos têm sido empregadas na investigação dos mecanismos imunológicos e fisiopatológicos na alergia alimentar, dermatite atópica e em alergias respiratórias. Na alergia alimentar, as principais são: BALB/c, C57BL/6, DBA/2, C3H/HeJ, BDF-1, A/J (McCLAIN; BANNON, 2006; VAN GRAMBERG *et al.*, 2013; SANTORO; MARSELLA, 2014); C3H/HeN e C3H/HeOuj (MARSTELLER *et al.*, 2020; VAN ESCH *et al.*, 2020). Há, ainda, os modelos transgênicos ou “humanizados”, como o NOD/Shi-scid IL-2 γ ^{nula} (NOG), BALB/c Rag2^{nula}IL2 γ ^{nula} e NOD/SCID/IL2 γ ^{nula}(NSG) (KANAGARATHAM; SALLIS; FIEBIGER, 2018).

As tradicionais fontes de alérgenos alimentares incluem: amendoim, nozes, ervilha, leite, ovos, peixe e frutos do mar, de modo que cada uma delas contém múltiplas proteínas capazes de gerar resposta alérgica (MARSTELLER *et al.*, 2020). Os protocolos de sensibilização alérgica envolvem as vias oral, intragástrica, intraperitoneal, transdermal e subcutânea. Nesse processo, os principais adjuvantes empregados são a toxina colérica, carragenina, avelã e o hidróxido de alumínio (VAN GRAMBERG *et al.*, 2013). O uso de adjuvantes é necessário para provocar modificações no sis-

tema imunológico que estejam, de fato, associadas à alergia. Convém salientar que, na falta de adjuvantes, a resposta imunológica a antígenos alimentares é normal e está relacionada à tolerância nas mucosas (CHEN *et al.*, 1995).

Os modelos de camundongos transgênicos, que apresentam genes, células e tecidos humanos, surgiram para mitigar algumas diferenças inerentes entre o sistema imune humano e o de camundongos (SHULTZ; ISHIKAWA; GREINER, 2007). São úteis, sobretudo, no estudo de doenças específicas e em testes destinados a encontrar novos tratamentos para alergias alimentares (SHULTZ; ISHIKAWA; GREINER, 2007; KANAGARATHAM; SALLIS; FIEBIGER, 2018).

Esses animais, todavia, geram grande diversidade nos dados obtidos, em função do protocolo usado na enxertia, da idade do animal e forma de irradiação. Ademais, na maioria das vezes, elevado número amostral é necessário para se obter significância estatística nos resultados (ITO *et al.*, 2012; KANAGARATHAM; SALLIS; FIEBIGER, 2018).

Camundongos C3H/HeN e C3H/HeOuj livres de patógenos específicos têm sido usados em pesquisas com alérgenos alimentares por apresentarem resposta alérgica mais acurada. Em recente estudo, camundongos C3H/HeN foram sensibilizados e desafiados por via intraperitoneal, com Ara h2, β -lactoglobulina (BGL) e lipoxigenase da soja (LOX). Os animais desenvolveram respostas diferentes, quando expostos a esses alérgenos e

não alérgenos conhecidos. Tais respostas foram avaliadas pela manifestação de hipotermia, pela identificação de escores clínicos e biomarcadores. Isso destacou o potencial uso dessas linhagens na avaliação da alergenicidade de novas proteínas alimentares, como aquelas provenientes de alimentos transgênicos (MARSTELLER *et al.*, 2020).

Um estudo multicêntrico comparando camundongos C3H/HeOJ e cobaias (*Cavia porcellus*), em teste com três proteínas parcialmente hidrolisadas do soro do leite, revelou respostas similares entre os animais, mas a utilização de camundongos foi apontada como preferencial, devido à possibilidade de se avaliar mais parâmetros clínicos (VAN ESCH *et al.*, 2020). Os quatro centros de pesquisa também avaliaram a composição microbiana de amostras fecais de camundongos não sensibilizados, em idênticas condições, e concluíram não haver diferença na composição microbiana em resposta aos desafios (VAN ESCH *et al.*, 2020).

Sabe-se que a microbiota é um importante componente no desenvolvimento do sistema imune (BONAMICHI-SANTOS *et al.*, 2015) e a manipulação da microbiota intestinal está associada às mudanças no perfil de alergenicidade em humanos (KANAGARATHAM; SALLIS; FIEBIGER, 2018). Assim, pesquisas utilizando a microbiota de pacientes alérgicos em camundongos, representam um bom caminho a fim de melhor compreender os mecanismos imunopatológicos envolvidos (KANAGARATHAM; SALLIS; FIEBIGER, 2018).

No estudo da dermatite atópica, as linhagens comumente utilizadas são camundongos sem pelo (SKH-1) e camundongos canela/Nagoya (NC/Nga, do inglês *Nishiki-nezumi cinnamon/Nagoya*) (MATSUDA *et al.*, 1997; PRESLAND *et al.*, 2000). Os camundongos NC/Nga é uma linhagem consanguínea de camundongos japoneses (Nishiki-Nezumi) criada em 1957 e que desenvolvem dermatite espontaneamente em condições ambientais não controladas, fato que os colocou como principal modelo para o estudo da dermatite atópica (MATSUDA *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 2011).

Na asma alérgica, as linhagens usadas são C57BL/6, BALB/c e A/J (NIALS; UDDIN, 2008; AUN *et al.*, 2017). Embora todas desenvolvam com sucesso alergia respiratória experimental, os camundongos BALB/c ainda são os mais empregados, por apresentarem boa resposta imunológica mediada pelas células T helper-2 (Th2), via que gera as interleucinas IL-4, IL-5 e IL-13 fortemente associadas aos mecanismos patogénicos da asma (NIALS; UDDIN, 2008; CHUNG, 2015). As limitações descritas para essas linhagens referem-se à broncoconstrição não fisiológica, requerendo o uso de adjuvantes; sítios de inflamação pulmonar distribuídos de formas diferentes do que se encontram em humanos; inexistência de resposta crônica aos alérgenos; e tolerância após exposição contínua (AUN *et al.*, 2017).

No geral, o uso de camundongos na experimentação animal é destacado pela diversidade de linhagens; rápida capacidade de proliferação; facilidade de manuseio e de acondicionamento; baixo

custo; e, ainda, o conhecimento genético da espécie (MEEUSEN *et al.*, 2009; AUN *et al.*, 2017). Ademais, esse uso é reforçado pela disponibilidade de reagentes moleculares e imunológicos, como anticorpos, fatores de crescimento e marcadores de superfície celular (SHIN; TAKEDA; GELFAND, 2009).

2.3 Ratos (*Rattus norvegicus*)

Os ratos pertencem à mesma família dos camundongos, constituindo, dessa forma, o gênero *Rattus*. O *Rattus norvegicus* foi o primeiro mamífero domesticado para pesquisa e a primeira colônia de criação desses animais data de 1856 (NEVES *et al.*, 2013). Em 1906, a linhagem de ratos Wistar, uma das mais utilizadas em experimentação no mundo, foi desenvolvida no Instituto Wistar (Filadélfia, Pensilvânia/EUA) pelo fisiologista Henry Donaldson (CEDEME, 2013-2015). Dessa linhagem, descende mais da metade de todas as linhagens de ratos de laboratório, entre as quais os ratos Lewis e Brown Norway (DWINELL, 2010; CEDEME, 2013-2015).

Os modelos de ratos têm sido usados para estudar os mecanismos fisiológicos, incluindo as funções cardiovasculares, pulmonares, neurológicas, renais, gastrointestinais, musculares, esqueléticas, imunológicas e reprodutivas. Também são usados em testes com drogas e na avaliação da toxicidade em biotecnologia e pesquisas farmacêuticas. Além disso, com o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas de engenharia genética, animais geneticamente modificados (AnGM) foram criados para o estudo de ge-

nes de interesse e de determinadas doenças humanas (DWINELL, 2010; CEDEME, 2013-2015).

No estudo de alergias respiratórias, os ratos Brown Norway (BN), Sprague-Dawley (SD) e Lewis (L) são as linhagens utilizadas; e a BN é a preferível, por apresentar fortes respostas de anticorpos IgE (ABRIL-GIL *et al.*, 2015; ZAINAL *et al.*, 2019). Vários modelos foram desenvolvidos alternando o protocolo de sensibilização com ovalbumina no tocante à via de administração, ao adjuvante, e ao número de sensibilizações utilizando os ratos BN (PÉREZ *et al.*, 2020; ZHANG, 2020).

Na avaliação de alergias alimentares, a linhagem BN também é a mais empregada e os protocolos de indução envolvem duas a três injeções intraperitoneais do alérgeno alimentar e, eventualmente, a administração oral do alérgeno por gavagem (BØGH *et al.*, 2009; AHRENS *et al.*, 2014). Outro protocolo envolve administração intraperitoneal do alérgeno com alúmen e toxina, proveniente da *Bordetella pertussis* (tBp), para estimular a síntese de IgE, seguida pela administração oral do alérgeno solúvel após duas semanas, na fase de desafio (ABRIL-GIL *et al.*, 2015). Os alérgenos comumente utilizados nesses testes envolvem peptídeos (ω 5-gliadina, glúten de Hokushin ou glúten de 1BS-18) (YAMADA *et al.*, 2020); extratos de proteínas (Rubisco, maçã, soja, amendoim, ervilha) (AHRENS *et al.*, 2014); tropomiosina de ostra (ZHANG *et al.*, 2020); e ovalbumina (ZAINAL *et al.*, 2019).

Dentre as vantagens do uso de ratos em pesquisas, pode-se destacar: o curto ciclo de criação e a estabilidade sob anestesia,

que facilita a mensuração das respostas fisiológicas agudas associadas à inalação de alérgenos (PRADHAN; MAJUMDAR, 2016). Outras vantagens que podem ser enumeradas são: o tamanho dos animais, que possibilita coletar maior quantidade de soro para monitorar a cinética das respostas de anticorpos específicos no soro, individualmente; e a possibilidade de fornecer a proteína teste, diariamente, por gavagem na ausência de adjuvantes (DEARMAN; KIMBER, 2009).

No tocante às limitações do uso de ratos, em comparação com camundongos, pode-se inferir a necessidade de maior quantidade do alérgeno para os testes, o que eleva o custo dos experimentos. Ademais, há poucos reagentes imunológicos e moleculares disponíveis (BØGH *et al.*, 2016).

2.4 Zebrafish (*Danio rerio*)

Zebrafish (*Danio rerio*) é um pequeno peixe teleósteo, pertencente à família *Cyprinidae*, utilizado em pesquisas de desenvolvimento embriológico, genética, toxicológicas, oncológicas e de validação de substâncias com ação farmacológica sobre células do sistema nervoso. É encontrado em ambientes de águas rasas e lânticas da Índia, Paquistão, Nepal e Bangladesh. Os indivíduos da espécie *D. rerio* apresentam entre 3 e 5 cm de comprimento e listras de cor azul e prata, que se alternam nas laterais de seu corpo (PARICHY, 2015).

O *zebrafish* apresenta ca. 70% de homologia gênica com os seres humanos, e seu sistema imunológico é muito parecido com o da espécie humana, exceto por diferenças nos locais de maturação das células envolvidas na resposta imune (KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014; MEEKER; TREDE, 2008). Ele adquire resposta inata na primeira semana após a fertilização e resposta humoral e celular na quarta semana de desenvolvimento. Por serem animais de baixo custo, manutenção simples e apresentarem um trato gastrointestinal com respostas imunológicas semelhantes às da espécie humana, o *zebrafish* tem se mostrado como modelo também no estudo de respostas inflamatórias a alérgenos (HUANG *et al.*, 2018).

As alergias são respostas exacerbadas do sistema imunológico desencadeadas por vários agentes: saliva de artrópodes (ácaros); venenos de insetos; comida industrializada; ou poluição atmosférica (FERREIRA, RIBEIRO; NETO, 2016).

A alergia provocada pela picada de carrapatos pode sensibilizar pessoas com alergias alimentares preexistentes à glicoproteínas ou glicolipídios com carboidratos alfa 1-3 galactose (FERREIRA; RIBEIRO; NETO, 2016). A alergia a oligossacarídeos se dá após ingestão de carnes bovinas, suínas ou de cordeiro; a intensidade na produção de imunoglobulinas tipo E (IgE), e sintomas associados, pode variar entre esses três tipos de carne (MABELANE *et al.*, 2018). Indivíduos selvagens da espécie *Danio rerio* (*zebrafish*) não produzem glicoproteínas ou glicolipídeos

com carboidratos alfa 1-3 galactose e podem ser usados como modelo de estudo.

A exposição de *zebrafish* à saliva dos carrapatos provoca aumento nos teores de IgM, comportamentos típicos de animal em estresse e respostas anafiláticas hemorrágicas. As respostas alérgicas ocorrem após a segunda exposição aos alérgenos, causadas pela ingestão de ração contendo carne suína (CONTRE-RAS *et al.*, 2020).

Acredita-se que a espécie *zebrafish* possa constituir modelo para estudos das alergias alfa 1-3 galactose, por desenvolver respostas imunológicas via células Th2, similar à encontrada em homens e camundongos (CONTRE-RAS *et al.*, 2020). *Zebrafish* é um modelo importante no estudo de alergias ligadas ao sistema respiratório, como a asma e outras doenças.

As brânquias e a bexiga natatória têm características estruturais similares aos pulmões de mamíferos, como: mecanismos de trocas gasosas similares; epitélio coberto por muco produzido por células mucosas; células do sistema imune e musculares (PROGATZKY *et al.*, 2016). São reconhecidos os efeitos prejudiciais do contato com a fumaça do cigarro em fetos humanos, que nascem com baixo peso. Efeitos similares foram observados em *zebrafish*, com alterações no peso dos embriões, assim como alterações morfológicas nos órgãos respiratórios e na expressão de moléculas inflamatórias.

Estudos em embriões de *zebrafish* realizados por Shanura *et al.* (2017) mostram que, tanto a viabilidade celular diminui quanto

a produção de citocinas aumenta, quando há partículas de poeira. Os peixes têm suas brânquias e pele expostas a agentes patogênicos ou organismos comensais, dessa forma precisam equilibrar as respostas imunológicas para impedir a proliferação específica de agentes patogênicos, assim como evitar a manutenção de respostas inflamatórias desnecessárias.

Segundo Bottiglione *et al.* (2020) mutantes de *zebrafish* que não expressam os genes para as IL-4/13A e IL-4/13B perdem a capacidade de regular as respostas inflamatórias, demonstrando que os peixes possuem mecanismos regulatórios da inflamação similares aos mamíferos.

Embora a interleucina IL-4R α de *zebrafish* apresente somente 25% de similaridade com a mesma molécula em mamíferos, a presença desse receptor e constatação das respostas Th2 similares a de mamíferos, mostram que o mecanismo é conservado entre vertebrados (ZHU *et al.*, 2012).

Além das similaridades na produção de moléculas associadas a respostas a agentes infecciosos e alérgenos, a utilização de *zebrafish* apresenta outras vantagens, em relação aos camundongos: a possibilidade de visualizar alterações morfológicas nos embriões transparentes; genética similar à de humanos; e rápido desenvolvimento embriológico, que permite ao pesquisador observar a transmissão de alterações genéticas entre gerações e suas implicações para o organismo e seus mecanismos de defesa imunológica (HAMMER *et al.*, 2018).

Embora existam genes ortólogos em *zebrafish* para a maioria dos genes encontrados em mamíferos, a desvantagem no uso do modelo é que não estão disponíveis bibliotecas amplas mostrando a correlação entre esses diversos genes ortólogos e genes humanos relacionados, quando o objeto da pesquisa são as respostas imunológicas. Contudo, a possibilidade de trabalhar com muitos indivíduos; a fácil visualização do desenvolvimento dos embriões; e a possibilidade de estudos genéticos amplos, podem superar essas limitações iniciais.

2.4 Outros Modelos de Indução de Alergenicidade

A investigação dos mecanismos imunológicos envolvidos em diversos tipos de alergias pode ser realizada, também, em modelos adaptados quando na ausência de modelos animais específicos para dados estudos no campo das alergias. Na década de 60, o Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) da Universidade Federal do Ceará desenvolveu modelos de anafilaxia em linhagem Wistar e camundongos *Swiss* (PROVOUST *et al.*, 1966), os quais foram utilizados no estudo da alergenidade e da tolerância à proteínas da castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* HBK) demonstrada por Anafilaxia Cutânea Passiva (PCA) (MELO *et al.*, 1994).

Além desses estudos, protocolos de sensibilização com ovalbumina foram utilizados como antígenos para determinar a capacidade adjuvante de diferentes óleos vegetais (MOTA *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2016) e a tolerância oral de proteínas do látex prove-

nientes da *Calotropis procera* em modelo murino (BEZERRA *et al.*, 2017). A partir disso, vários trabalhos foram publicados pelo DBBM investigando efeitos imunomoduladores e o potencial de alergenicidade de moléculas e produtos naturais.

Destaca-se, também, que existem na literatura outras espécies como os camundongos BALB/c associados ao modelo murino de alergia induzida por ovalbumina (OVA) (SHAKOOR *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2020; LEBETWA *et al.*, 2019; HWANG *et al.*, 2018; MEDEIROS *et al.*, 2008). Assim, diante dos modelos apresentados, mesmo não tendo a espécie animal ideal para realizar os experimentos, o pesquisador deve avaliar as condições disponíveis e adaptar a espécie mais acessível e capaz de reproduzir o estudo de alergenicidade.

3 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ALÉRGICA *IN VIVO* E *EX VIVO*

A avaliação da resposta alérgica é uma etapa crucial para a validação de modelos experimentais. Nesse sentido, sinais clínicos, como piloereção, edema, eritema, coceira, diarreia, mudanças comportamentais, entre outros, são verificados e podem ser mensurados por meio de escores clínicos (NOTI *et al.*, 2014). Em fase seguinte, *ex vivo*, a análise do teor de imunoglobulinas e a fenotipagem das células do sistema imune inato e adaptativo fornecem importantes informações sobre a fase de sensibilização e o mecanismo de resposta celular envolvido, respectivamente. Para essa

etapa, faz-se necessária a coleta de amostras biológicas como sangue, tecidos e órgãos (CASTAN *et al.*, 2020).

A detecção de imunoglobulinas é o parâmetro mais comum usado ao avaliar a sensibilização a alérgenos e, a depender do modelo animal em estudo, dos alérgenos envolvidos, da rota de sensibilização e desafio, as imunoglobulinas analisadas são: IgA, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b. Essas imunoglobulinas são detectadas no soro, exceto a IgA, que é analisada a partir de amostra fecal.

Os testes comumente utilizados são imunoenzimáticos (do inglês *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* - Elisa), enzimático-alergossorvente (do inglês *Enzyme Allergosorbent Test* - East), *immunoblotting* e ensaios de liberação de mediadores, como o de leucemia basofílica de rato (do inglês *Rat Basophilic Leukemia Assay* - RBL) e o teste de ativação de basófilo (do inglês *Basophil Activation Test* - BAT) (CASTAN *et al.*, 2020). É importante destacar que a detecção de anticorpos, isoladamente, não é capaz de prever a severidade de reações alérgicas, tornando necessário combinar outros métodos e parâmetros, como a clonalidade e o grau de interação anticorpo-alérgeno (CASTAN *et al.*, 2020).

A determinação do perfil de células do sistema imune inato e adaptativo, nos locais de manifestação alérgica ou nos órgãos-alvo, é muito útil e geralmente realizada pela citometria de fluxo ou testes baseados em espectrometria de massas. A determinação da expressão gênica (por exemplo, mRNA) e epigenética de marcadores inflamatórios, também são avaliações *ex vivo* relevantes (BØGH *et al.*, 2016).

A sensibilização cutânea e a resposta anafilática em modelos *in vivo* podem ser analisadas por diferentes métodos. O teste de maximização em cobaias (do inglês *Guinea Pig Maximization Test - GPMT*) e o ensaio do linfonodo local em camundongos (do inglês *Murine Local Lymph Node Assay - LLNA*) foram desenvolvidos para verificar a sensibilização dérmica a alérgenos. O LLNA, método totalmente validado para a identificação de produtos químicos sensibilizantes da pele, parte do princípio de que a sensibilização depende da proliferação de linfócitos T responsivos aos alérgenos e que as respostas dessas células ocorrem em linfonodos regionais que drenam os locais de exposição a um alérgeno químico (KIMBER *et al.*, 2011; BASKETTER; POOLE; KIMBER, 2017).

Os modelos de anafilaxia *in vivo* consistem na análise da anafilaxia sistêmica e cutânea aos alérgenos. A anafilaxia sistêmica envolve a observação de manifestações clínicas e comportamentais após o desafio dos animais com os antígenos alergênicos, e o uso de protocolos para avaliação da gravidade, podendo ser complementada com outros testes *in vivo* (BØGH *et al.*, 2016).

Na anafilaxia cutânea ativa (do inglês *Active Cutaneous Anaphylaxis - ACA*), os animais sensibilizados são desafiados por via intradérmica (i.d.) com um alérgeno, combinado com uma injeção intravenosa (i.v.) contendo corante para quantificar as respostas alérgicas localizadas. Historicamente, uma variedade de métodos experimentais têm sido usados, incluindo injeção do anti-

geno e, depois do corante, injeção do corante antes da injeção do antígeno, e injeção simultânea do corante e do antígeno (CASTAN *et al.*, 2020).

Nesse ensaio, vários corantes podem ser utilizados, entre os quais *Trypan Blue*, *Pontamine Sky Blue*, *Evan's Blue*, *Geigy Blue 536* e *India Ink*. O *Evan's Blue* (0,5%) é, atualmente, o corante padrão usado para mensurar as respostas alérgicas na pele. A quantificação do extravasamento do corante foi originalmente obtida medindo o tamanho da pápula formada. Além disso, a análise colorimétrica do corante recuperado das orelhas ou contagens de mastócitos degranulados pode ser feita a partir de uma excisão da pele no local da reação e coloração com azul de toluidina (CASTAN *et al.*, 2020).

No método de anafilaxia passiva cutânea (do inglês *Passive Cutaneous Anaphylaxis* - PCA) o soro dos animais sensibilizados é injetado na derme de camundongos *naïve* que, posteriormente, são desafiados com o alérgeno e corante por via intravenosa (i.v.). Nesse processo, ocorre aumento da permeabilidade capilar devido à ligação mastócito-IgE local e liberação de histamina, que causa extravasamento do corante com subsequente formação de uma mancha azul que pode ser quantificada (CASTAN *et al.*, 2020). Os títulos de anticorpos IgE e IgG1 podem ser avaliados por esse método, em ratos e camundongos, conforme os protocolos desenvolvidos por Mota e Wong (1969) e Ovary (1958), respectivamente. Edema na orelha e coloração da pele do animal, também podem ser observados no método PCA (CASTAN *et al.*, 2020).

A análise *ex vivo* da resposta anafilática envolve a detecção de proteases séricas liberadas por mastócitos e ensaios de liberação de histamina (VAALI *et al.*, 2006; BØGH *et al.*, 2016).

Possivelmente, uma das principais limitações das avaliações alérgicas *in vivo*, além da invasividade da maioria dos testes, é que as medidas são, frequentemente, subjetivas e, portanto, requerem o cegamento dos grupos experimentais (BØGH *et al.*, 2016). Nas análises *ex vivo*, as limitações referem-se à perda do microambiente; ao uso de enzimas no processo de isolamento celular (que pode alterar a funcionalidade e características das células imunes); à dificuldade de separar subpopulações menores; à presença de muco em decorrência da resposta imune do tipo 2, que dificulta o isolamento das células; além do uso de equipamentos sofisticados (CASTAN *et al.*, 2020).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os modelos experimentais, ora citados, fornecem uma compreensão mais profunda dos diferentes mecanismos patogênicos envolvidos nas reações alérgicas. Por isso, são considerados como primordiais na elucidação de mecanismos alergênicos e sensibilidade alimentar. Pode-se constatar, ainda, que a escolha de um modelo experimental depende da especificidade do estudo. Por fim, os protocolos de avaliação das respostas alérgicas devem ser bem definidos e adequadamente combinados, a fim de assegurar a veracidade e precisão dos dados a serem obtidos.

REFERÊNCIAS

- ABRIL-GIL, M. *et al.* Development and characterization of an effective food allergy model in brown norway rats. *Plos One*, v. 10, n. 4, e0125314, 2015. DOI 10.1371/journal.pone.0125314.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos. 2. ed. Brasília, DF: Anvisa, 2012. 74 p. Disponível em: http://www.saocamilo.sp.br/biblioteca/ebooks/Guia_cosmeticos_grafica_final.pdf. Acesso em: 20 fev. 2021.
- AHRENS, B. *et al.* Development of an animal model to evaluate the allergenicity of food allergens. *International Archives of Allergy and Immunology*, v. 164, n. 2, p. 89-96, 2014. DOI 10.1159/000363109.
- ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S (org.). *Animais de laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. 388 p. Disponível em: <http://books.scielo.org/id/sfwjtj/pdf/andrade-9788575413869-12.pdf>. Acesso em: 19 fev. 2021.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ALERGIA E IMUNOLOGIA. *Alergia alimentar é o tema central da semana mundial*. São Paulo: Asbai, 2019. Disponível em: <https://asbai.org.br/alergia-alimentar-e-o-tema-central-da-semana-mundial/#:~:text=No%20Brasil%2C%20n%C3%A3o%20h%C3%A1%20estat%C3%ADsticas,algum%20tipo%20de%20alergia%20alimentar>. Acesso em: 10 fev. 2021.
- AUN, M. V. *et al.* Animal models of asthma: Utility and limitations. *Journal of Asthma and Allergy*, v. 10, p. 293-301, 2017. DOI 10.2147/JAA.S121092.
- ATHARI, S. M.; NASAB, E. M.; ATHARI, S. S. Animal model of allergy and asthma: Protocol for researches. *Research Square*, Preprint (Version 1), 2019. DOI 10.21203/rs.2.13928/v1.
- BASKETTER, D.; POOLE, A.; KIMBER, I. Behaviour of chemical respiratory allergens in novel predictive methods for skin sensitisation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 86, p.101-106, 2017. <https://doi.10.1016/j.yrtp.2017.03.002>.
- BEZERRA, C. F. *et al.* Latex proteins from *Calotropis procera*: Toxicity and immunological tolerance revisited. *Chemico-Biological Interactions*, v. 274, p. 138-149, 2017.

BØGH, K. L. *et al.* Digested Ara h1 has sensitizing capacity in Brown Norway rats. *Clinical and Experimental Allergy*, v. 39, n.10, p.1.611-21, 2009. DOI 10.1111/j.1365-2222.2009.03333.x.

BØGH, K. L. *et al.* Current challenges facing the assessment of the allergenic capacity of food allergens in animal models. *Clinical and Translational Allergy*, v. 6, n. 21, 2016. DOI 10.1186/s13601-016-0110-2.

BONAMICHI-SANTOS, R. *et al.* Microbiome and asthma: what have experimental models already taught us? *Journal of Immunology Research*, v. 2015, n. 614.758, 2015. DOI 10.1155/2015/614758.

BOTTIGLIONE, F. Zebrafish IL-4-like cytokines and IL-10 suppress inflammation but only IL-10 is essential for girl homeostasis. *The Journal of Immunology*, v. 295, p. 994-1008, 2020.

CANNING, B. J.; CHOU, Y. Using guinea pigs in studies relevant to asthma and COPD. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, v. 21, n. 5, p. 702-720, 2008. DOI 10.1016/j.pupt.2008.01.004.

CAMBAU, E.; DRANCOURT, M. Steps towards the discovery of Mycobacterium tuberculosis by Robert Koch, 1882. *Clin Microbiol Infect*, v. 20, n. 3, p. 196-201, 2014. DOI 10.1111/1469-0691.12555.

CARABALLO, L. *et al.* The allergenic activity and clinical impact of individual IgE-antibody binding molecules from indoor allergen sources. *World Allergy Organization Journal*, v. 13, n. 5, 100.118, 2020. DOI 10.1016/j.waojou.2020.100118.

CASTAN, L. *et al.* Overview of in vivo and ex vivo endpoints in murine food allergy models: Suitable for evaluation of the sensitizing capacity of novel proteins? *Allergy*, v. 75, n. 2, p. 289-301, 2020. DOI 10.1111/all.13943.

CENTRO DE DESENVOLVIMENTO DE MODELOS EXPERIMENTAIS PARA BIOLOGIA E MEDICINA. Wistar EPM-1. Unifesp: Cedeme, 2013-2015. Disponível em: <https://www.unifesp.br/campus/sao/cedeme/modelos-animais/ratos/heterogenicos/92-wistar>. Acesso em: 4 abr. 2021.

CENTRO DE DESENVOLVIMENTO DE MODELOS EXPERIMENTAIS PARA BIOLOGIA E MEDICINA. Animais geneticamente modificados (AnGM). Unifesp: Cedeme, 2013-2015. Disponível em: <https://www.unifesp.br/campus/sao/cedeme/modelos-animais/camundongos/animais-geneticamente-modificados>. Acesso em: 4 abr. 2021.

CHANG, K. F. Targeting the interleukin pathway in the treatment of asthma. *The Lancet*, v. 386, n.9.998, p.1.086-96, 2015. DOI 10.1016/S0140-6736(15)00157-9.

CHARPIN, D. *et al.* Climate and allergic sensitization to airborne allergens in the general population: Data from the french six cities study. *International Archives of Allergy Immunology*, v. 172, n. 4, p. 236-241, 2017. DOI 10.1159/000471511.

CHEN, Y. *et al.* Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature*, v. 376, n. 6.536, p. 177-180, 1995. <https://doi.10.1038/376177a0>.

CONTRERAS, M. *et al.* Allergic reactions and immunity in response to tick salivary biogenic substances and red meat consumption in the zebrafish model. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 10, p. 1-19, 2020.

DEARMAN, R. J.; KIMBER, I. Animal models of protein allergenicity: potential benefits, pitfalls and challenges. *Clinical & Experimental Allergy*, v. 39, n. 4, p. 458-68, 2009.

DWINELL, M. R. Online tools for understanding rat physiology. *Briefings in Bioinformatics*, v. 11, n. 4, p. 431-9, 2010.

FERREIRA, M. D.; NETO, L. P.; RIBEIRO, R. G. Allergy to alpha-gal: a systematic review. *Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia*, v. 3, n. 6, 2016.

GALLI, S. J.; TSAI, M.; PILIPONSKY, A. M. The development of allergic inflammation. *Nature*, v. 454, n. 7.203, p. 445-454, 2008. DOI 10.1038/nature07204

HAMMER, B. *et al.* In utero exposure to cigarette smoke and effects across generations: A conference of animals on asthma. *Clinical & Experimental Allergy*, v. 48, p. 1.378-1.390, 2018.

HWANG, K-A.; HWANG, Y-J.; SONG, J. Anti-allergic effect of *Aster yomena* on ovalbumin-sensitized mouse and RHL-2H3 cells via Th1/Th2 cytokine balance. *Journal of Functional Foods*, v. 44, p. 1-8, 2018.

HUANG, J. *et al.* Application of in vitro and in vivo models in the study of food allergy. *Food Science and Human Wellness*, v. 7, p. 235-243, 2018.

ITO, R. *et al.* Current advances in humanized mouse models. *Cellular & Molecular Immunology*, v. 9, n. 3, p. 208-214, 2012. <https://doi.10.1038/cmi.2012.2>.

IWASAKI, A.; FOXMAN, E. F.; MOLONU, R. D. Early local immune defences in the respiratory tract. *Nature Reviews Immunology*, v. 17, n. 1, p. 7-20, 2016.

KALLÓS, P.; KALLÓS, L. Experimental asthma in guinea pigs revisited. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, v. 73, n. 1, p. 77-85, 1984. DOI 10.1159/000233441

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 35, n.2, p. 63-75, 2014. Disponível em: <https://doi.10.1016/j.tips.2013.12.002>

KANAGARATHAM, C.; SALLIS, B. F.; FIEBIGER, E. Experimental models for studying food allergy. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, v. 6, n. 3, p. 356-369.e1, 2018. DOI 10.1016/j.jcmgh.2018.05.010

KIMBER, I. *et al.* Chemical allergy: Translating biology into hazard characterization. *Toxicological Sciences*, v. 120, n. 1, p. S238-S268, 2011.

LAB ANIMAL. The all-purpose guinea pig. *Nature*, v. 43, n. 3, p.79, 2014. DOI 10.1038/lab.486

LADICS, G. S. *et al.* Review of animal models designed to predict the potential allergenicity of novel proteins in genetically modified crops. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 56, n. 2, p. 212-224, 2010. DOI 10.1016/j.yrtph.2009.09.018

LEBETWA, Ntshepisa *et al.* Enhanced anti-allergic activity of milk casein phosphopeptide by additional phosphorylation in ovalbumin-sensitized mice. *Molecules*, v. 24, n. 4, p. 738, 2019.

LEHRER, B.; McCLAIN, S. Utility of animal models for predicting human allergenicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 54, n. 3, p. S46-S51, 2009. DOI 10.1016/j.yrtph.2009.01.001

LUCARINI, L. *et al.* Poly (ADP-ribose) polymerase inhibition with HYDAMTIQ reduces allergen-induced asthma-like reaction, bronchial hyper-reactivity and airway remodelling. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 18, n. 3, p. 468-79, 2014. DOI 10.1111/jcmm.12197

MABELANE, T. *et al.* E. Predict values of alpha-gal IgE levels and alpha-gal IgE: Total IgE ratio and oral food challenge-proven meet allergy in a population with high prevalence of reported red meat allergy. *Food Allergy & anaphylaxis*, v. 27, p. 841-849, 2018.

MANEA, I.; AILENEI, E.; DELEANU, D. Overview of food allergy diagnosis. *Clujul Medical*, v. 89, n. 1, p. 5-10, 2016.

MARSTELLER, N. *et al.* A review of animal models used to evaluate potential allergenicity of genetically modified organisms (GMOs). *Drug Discovery Today: disease models*, v. 17-18, S1740675716300123, p.81-88, 2016. DOI 10.1016/j.ddmod.2016.11.001.

MATSUDA, H. *et al.* Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *International Immunology*, v. 9, n. 3, p. 461-466, 1997. DOI 10.1093/intimm/9.3.461.

MCCLAIN, S.; BANNON, G. A. Animal models of food allergy: opportunities and barriers. *Current Allergy and Asthma Reports*, v. 6, n. 2, p. 141-144, 2006. DOI 10.1007/s11882-006-0052-1

MEDEIROS, K. C. P. *et al.* Anti-allergic effect of bee pollen phenolic extract and myricetin in ovalbumin-sensitized mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 119, n. 1, p. 41-46, 2008.

MEEUSEN, E. N. *et al.* Sheep as a model species for the study and treatment of human asthma and other respiratory diseases. *drug discovery today: disease models*, v. 6, n. 4, p. 101-106, 2009. DOI 10.1016/j.ddmod.2009.12.002.

MELO, M. M. *et al.* Allergenicity and tolerance to proteins from Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H. B. K.). *Food and Agricultural Immunology*, v. 6, n. 2, p. 185-195, 1994.

MOTA, I.; WONG, D. Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. *Life Sciences*, v. 8, n. 16, p. 813-820, 1969.

NEVES, S. M. P. *et al.* *Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do biotério de produção e experimentação da FCF-IQ/USP*. São Paulo: CF-IQ/USP, 2013. 216 p. Disponível em: <http://www.fo.usp.br/wp-content/uploads/Manual-Cuidados-com-Animais.pdf>. Acesso em: 24 fev. 2021.

NOTI, M. *et al.* Exposure to food allergens through inflamed skin promotes intestinal food allergy through the thymic stromal lymphopoietin-basophil axis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 133, n. 5, p. 1.390-1.399, 2014.

NUNES, M. P. O. *et al.* Detection of serum and salivary IgE and IgG1 immunoglobulins specific for diagnosis of food allergy. *PLoS ONE*, v. 14, n. 4, 2019. DOI 10.1371/journal.pone.0214745

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). *Guidelines for the testing of chemicals*. OECD TG 406. Skin Sensitisation. Section 4. Paris: OECD Publishing, 1992. DOI 10.1787/9789264070660-en.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). *Test guideline 429: Skin sensitisation local lymph node assay*. Section 4. Paris: OECD Publishing, 2010. DOI 10.1787/9789264071100-en.

ORNELAS, C. *et al.* The contribution of the basophil activation test to the diagnosis of hypersensitivity reactions to oxaliplatin. *International Archives of Allergy Immunology*, v. 177, n. 3, p. 274-280, 2018. DOI 10.1159/000490313

OVARY, Z. Passive cutaneous anaphylaxis in the mouse. *The Journal of Immunology*, v. 81, n. 4, p. 355-357, 1958.

PADILLA-CARLIN, D. J.; MCMURRAY, D. N.; HICKEY, A. J. The guinea pig as a model of infectious diseases. *Comparative Medicine*, v. 58, n. 4, p. 324-340, 2008.

PARICHY, D. M. The natural history of model organisms: advancing biology through a deeper understanding of zebrafish ecology and evolution. *eLIFE*, v. 4, e05635, 2015. DOI 10.7554/eLife.05635

PERÉZ, M. *et al.* Development and characterization of an allergic asthma rat model for interventional studies. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 11, e3841, 2020.

PROUVOST-DANON, A.; JAVIERRE, M. Q.; LIMA, M. S. Passive anaphylactic reaction in mouse peritoneal mast cells in vitro. *Life Sciences*, v. 5, n. 4, 289-297, 1966.

PRADHAN, B. S.; MAJUMDAR, S. S. An efficient method for generation of transgenic rats avoiding embryo manipulation. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, v. 5, n. 3, p. e293, 2016.

PRESCOTT, S. L.; ALLEN, K. J. A global survey of changing patterns of food allergy burden in children. *World Allergy Organization Journal*, v. 6, n. 21, p. 1-13, 2013.

PRESLAND, R. B. *et al.* Loss of normal profilaggrin and filaggrin in flaky tail (ft/ft) mice: An animal model for the filaggrin-deficient skin disease ichthyosis vulgaris. *The Journal of Investigative Dermatology*, v. 115, n. 6, p. 1072-1081, 2000. <https://doi.10.1046/j.1523-1747.2000.00178.x>.

PROGATZKY, F. *et al.* Mucosal inflammation at the respiratory interface: a zebrafish model. *American Journal of Physiology-Lung Cellular Molecular Physiology*, v. 310, p. 551-561, 2016.

ROMANENKO, S. A. *et al.* A first generation comparative chromosome map between guinea pig (*Cavia porcellus*) and humans. *PLoS ONE*, v. 10, n. 5, e0127937, 2015. DOI 10.1371/journal.pone.0127937

SALMI, S. T. *et al.* Molecular mechanisms of nasal epithelium in rhinitis and rhinosinusitis. *Current Allergy and Asthma Reports*, v.15, p.1-9, 2015.

SANTORO, D.; MARCELA, R. Animal models of allergy disease. *Veterinary Science*, v. 1, n. 3, p. 192-212, 2014. DOI 10.3390/vetsci1030192.

SCHAARSCHMIDT, M. L. *et al.* Disease burden, psychological well-being and attitudes regarding the set of emergency medication in adults with insect venom allergy. *International Archives of Allergy Immunology*, v. 176, n. 2, p. 150-156, 2018. DOI 10.1159/000488721

SENNA, S. N. *et al.* Achados epidemiológicos de alergia alimentar em crianças brasileiras: análise de 234 testes de provocação duplo-cego placebo-controlado (TPDCPCs). *Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia*, v. 2, n. 3, p. 344-350, 2018. DOI 10.5935/2526-5393.20180041.

SHANURA FERNANDO, I. P. *et al.* Inhibition of inflammatory responses elicited by urban fine dust particles in keratinocytes and macrophages by diphlorethohydroxy-carmalol isolated from a brown alga *Ishige okamurae*. *Algae*, v. 32, p. 261-263, 2017.

SHIN, Y. S.; TAKEDA, K.; GELFAND, W. E. Understanding asthma using animal models. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, v. 1, n.1, p. 10-18, 2009. <https://doi.10.4168/aair.2009.1.1.10>.

SHULTZ, L. D.; ISHIKAWA, F.; GREINER, D. L. Humanized mice in translational biomedical research. *Nature Reviews Immunology*, v. 7, n. 2, p. 118-130, 2007. <https://doi.10.1038/nri2017>.

SICHERER, S. H.; SAMPSON, H. A. Food allergy: a review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 141, n. 1, p. 41-58, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.11.003>.

SIMON, D. Recent advances in clinical allergy and immunology. *International Archives of Allergy Immunology*, v. 177, n. 4, p. 324-333, 2018. DOI 10.1159/000494931.

SIMON, D. Recent Advances in Clinical Allergy and Immunology. *International Archives of Allergy Immunology*, v. 180, n. 4, p. 291-305, 2019. DOI 10.1159/000504364.

SILVA, A. C. M. *et al.* Immune adjuvant activity of the olive, soybean and corn oils. *VacciMonitor*, v. 25, p. 55-59, 2016.

SHAKOOR, H. *et al.* Immunomodulatory effects of dietary polyphenols. *Nutrients*, v. 13, n. 3, p. 728, 2021.

SOBCZAK, W. Z. *et al.* Allergic diseases – current state of knowledge. *Postepy Dermatologii i Alergologii*, v. 6, p. 450-455, 2012.

SOLÉ, D. *et al.* Consenso brasileiro sobre alergia alimentar: 2018 - Parte 1 - Etiopatogenia, clínica e diagnóstico. Documento conjunto elaborado pela Sociedade Brasileira de Pediatria e Associação Brasileira de Alergia e Imunologia. *Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia*, v. 2, n. 1, p. 7-38, 2018.

TANNER, L.; SINGLE, A. B. Animal Models Reflecting chronic obstructive pulmonary disease and related respiratory disorders: Translating pre-clinical data into clinical relevance. *Journal of Innate Immunity*, v. 12, n. 3, p. 203-225, 2020. DOI 10.1159/000502489.

TSCHEPPE, A.; BREITENEDER, H. Recombinant allergens in structural biology, diagnosis, and immunotherapy. *International Archives of Allergy Immunology*, v. 172, n. 4, p. 187-202, 2017. DOI 10.1159/000464104.

VAALI, K. *et al.* Murine model of food allergy after epicutaneous sensitization: Role of mucosal mast cell protease-1. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, v. 41, n.12, p. 1405-13, 2006. <https://doi.org/10.1080/00365520600815639>.

VAN DEN BERG, M. *et al.* The novel TRPA1 antagonist BI01305834 inhibits ovalbumin-induced bronchoconstriction in guinea pigs. *Respiratory Research*, v. 22, n. 1, p.48, 2021. DOI 10.1186/s12931-021-01638-7.

VAN ESCH, B. C. A. M. *et al.* A multi-center assessment to compare residual allergenicity of partial hydrolyzed whey proteins in a murine model for cow's milk allergy – Comparison to the single parameter guinea pig model. *Toxicology Letters*, v. 333, n. 1, p. 312-321, 2020. DOI 10.1016/j.toxlet.2020.05.020

VAN GRAMBERG, J. L. *et al.* Use of animal models to investigate major allergens associated with food allergy. *Journal of Allergy*, v. 2013, 635695, 2013. DOI 10.1155/2013/635695.

VON PIRQUET, C. Allergie. *Munchen Med Wchnschr*, v. 53, p. 1.457-1.458, 1906.

WU, K. G. *et al.* Associations between environmental heavy metal exposure and childhood asthma: A population-based study. *Journal of Microbiology, immunology and infection*, v. 52, p.352-362, 2019.

YAMADA, Y. *et al.* Evaluation of the allergenicity of ω 5-gliadin-deficient Hokushin wheat (1BS-18) in a wheat allergy rat model. *Biochemistry and Biophysics Reports*, v. 1, n. 20, p. 100.702, 2019.

ZAINAL, Z. *et al.* Effects of palm oil tocotrienol-rich fraction (TRF) and carotenes in ovalbumin (OVA)-challenged asthmatic brown Norway rats. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n.7, p. 1764, 2019.

ZHANG, J. *et al.* Hypoallergenic mutants of the major oyster allergen Cra g 1 alleviate oyster tropomyosin allergenic potency. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 1, n. 164, p. 1973-1983, 2020.

ZHANG, Ya-Fen *et al.* Nevadensin relieves food allergic responses and passive cutaneous anaphylaxis in mice through inhibiting the expression of c-Kit receptors. *Food & Function*, v. 11, n. 12, p. 10.375-10.385, 2020.

ZHU, L. Y. *et al.* interaction and adaptive immunity of zebrafish: insight into the origin of Th2-like regulatory mechanism in ancient vertebrates. *The Journal of Immunology*, v. 188, n. 11, p. 5571-5584, 2012.

CAPÍTULO 12 <doi>10.51996/9788574853994.cap12</doi>

USO DE ANIMAIS GENETICAMENTE MODIFICADOS PARA APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS: DA BANCADA AO LEITO

Bruno Bezerra da Silva¹

Lucelina da Silva Araújo

Resumo: O uso de animais transgênicos como modelos experimentais na pesquisa biomédica acompanhou o avanço das técnicas de biologia molecular. Atualmente, inúmeras linhagens de animais com deleções, adições ou substituições de genes específicos estão disponíveis para o estudo das mais variadas condições fisiológicas e patológicas de interesse para a saúde humana. Além disso, aplicações biotecnológicas para a produção de anticorpos humanizados, com o uso de animais geneticamente modificados, também revolucionaram o tratamento de muitas doenças humanas. Dessa forma, no presente capítulo serão abordados os principais modelos animais com modificações genéticas, de interesse biomédico e biotecnológico, aplicados ao estudo de doenças cardiovasculares, doenças virais, incluindo arboviroses e Covid-19, bem como aos estudos para a produção de anticorpos e vacinas. Ao final do capítulo, são discutidas as principais oportunidades e

¹ Ambos os autores estão vinculados ao Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, Ceará, Brasil. *E-mail* para correspondência: uno.bezerra@uece.br

os desafios a serem vivenciados pelo setor para garantir que os modelos desenvolvidos, além de fidedignos, estejam em consonância com as diretrizes de bem-estar animal.

Palavras-Chave: Modelos Animais. Organismos Geneticamente Modificados. Camundongos *Knockout*. Sistemas CRISPR-Cas.

USE OF GENETICALLY MODIFIED ANIMALS FOR BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS: FROM BENCH TO BEDSIDE

Abstract: The development of transgenic animals as experimental models in biomedical research has followed molecular biology techniques' advancement. Numerous animal strains with deletions, additions, or substitutions of specific genes are available to study the most varied physiological and pathological conditions of interest to human health. Besides, biotechnological applications to produce humanized antibodies using genetically modified animals have also revolutionized the treatment of many human diseases. Thus, this chapter will present models of genetically modified animals to study cardiovascular and viral infections, including arboviral diseases and COVID-19, and the production of antibodies and vaccines. At the end of the chapter, the industry's main opportunities and challenges are discussed in light of animal welfare guidelines.

Keywords: Experimental Animal Models. Organisms Genetically Modified. Mice *Knockout*. CRISPR-Cas Systems.

1 INTRODUÇÃO

A experimentação com modelos animais é o pilar da pesquisa biomédica, possibilitando desvendar os mecanismos envolvidos em doenças humanas, assim como permitindo o desenvolvimento de novos fármacos (ANDERSEN; WINTER, 2019; VANDAMME, 2015). Apesar dos esforços direcionados à redução do uso de animais com essa finalidade (ASKE; WAUGH, 2017; NC3Rs *et al.*, 2019), a experimentação continua sendo um dos melhores modelos para a simulação da complexidade fisiológica dos sistemas que compõem o organismo humano (KABENE; BAADEL, 2019).

Assim, ensaios pré-clínicos para fármacos e vacinas, por exemplo, valem-se do elevado grau de homologia existente entre o ser humano e outros mamíferos (roedores e primatas, principalmente) para estabelecer doses terapêuticas e investigar possíveis efeitos deletérios de um novo tratamento em modelos validados para condições patológicas humanas (HERATI; WHERRY, 2018; BRESCHI; GINGERAS; GUIGÓ, 2017).

Por outro lado, a indução de condições patológicas em animais de experimentação é limitada, muitas vezes, por componentes genéticos inerentes à espécie, interferindo no desenvolvimento fidedigno da condição clínica humana. Dessa forma, a ausência de receptores, transportadores ou mecanismos de sinalização no ser humano, bem como a presença de vias de sinalização alternativas ou inexistentes em *Homo sapiens*, dificulta a translação desses re-

sultados e achados de relevância na prática clínica (BRUBAKER; LAUFFENBURGUER, 2020; RHRISSORRAKRAI *et al.*, 2014).

Tais limitações começaram a ser contornadas durante as décadas de 1970 e 1980, por meio do desenvolvimento da Biologia Molecular, em paralelo ao aperfeiçoamento das técnicas de micromanipulação de embriões, que culminou na produção dos primeiros animais de laboratório geneticamente modificados. Em 1988, foi concedida a primeira patente sobre um animal vertebrado geneticamente modificado. Tratava-se de um camundongo geneticamente modificado para a expressão de um oncogene para a indução de câncer de mama, que foi posteriormente comercializado como OncoMouse™ (HANAHAN; WAGNER; PALMITER, 2007; MYELNIKOV, 2019).

A partir de então, a pesquisa biomédica sofreu uma revolução, no desenvolvimento de novas linhagens de animais geneticamente modificados para uso na pesquisa e produção de insumos biotecnológicos, tornando possível, atualmente, a produção de camundongos com modificações genéticas específicas e sob demanda. Dessa forma, torna-se possível, por exemplo, ablar um gene específico, permitindo elucidar (ou ao menos compreender melhor), sob um ponto de vista mecanístico, a função do produto do gene desativado no desenvolvimento e nas redes de interação com outros componentes celulares (GURUMURTHY; LLOYD, 2019; ZHU *et al.*, 2019).

No presente capítulo, são apresentados os principais tipos de modificações genéticas utilizadas em animais, assim como algumas aplicações de animais geneticamente modificados no contex-

to da pesquisa biomédica e biotecnológica de interesse para a saúde humana. No que concerne às principais metodologias utilizadas para efetuar tais modificações, sugerimos ao leitor a excelente revisão de Rocha-Martins *et al.* (2015).

2 TIPOS DE MODIFICAÇÕES GENÉTICAS EM ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

A produção de animais geneticamente modificados é baseada em três tipos básicos de alteração: (1) a deleção de sequências de DNA do genoma do próprio animal (*knockouts*); (2) a adição de sequências de DNA exógenas para modificar o genoma do animal (*knockins*); e (3) a troca ou substituição de sequências de DNA específicas por outras sequências (Figura 1) (LANIGAN; KOPERA, SAUNDERS, 2020).

2.1 *Knockouts*

A deleção de regiões gênicas específicas pode resultar em três fenótipos possíveis: animais em que o produto de um gene está ausente (deleção em região codificante comprometendo a expressão do gene); animais em que o produto de um gene está superexpresso (deleção comprometendo região reguladora da expressão gênica); e animais em que o produto daquele gene está presente, mas com estrutura ou função modificadas (deleção de domínio específico da proteína expressa) (DOYLE *et al.*, 2012).

Figura 1 – Tipos básicos de modificação para a obtenção de animais geneticamente modificados



Fonte: Elaborada pelos autores, utilizando BioRender.com.

Apesar dessas possibilidades de modificação, camundongos *knockout* são considerados aqueles em que o produto de um gene específico está ausente. Esses animais são importantes ferramen-

tas para determinar a função dos genes removidos no desenvolvimento do organismo, e em condições fisiológicas ou patológicas (BOS *et al.*, 2020).

Aproximadamente um terço das doenças genéticas humanas de caráter mendeliano já possui uma linhagem de camundongo no-cauteado para o gene responsável, demandando esforços para a caracterização completa do fenótipo associado a cada uma dessas condições patológicas. Nesse intuito, o *International Mouse Phenotyping Consortium* tem aplicado algoritmos que avaliam o efeito dessas ablações sobre parâmetros fisiológicos dos camundongos transgênicos, o que permitiu até então a caracterização de 69.982 fenótipos (parciais ou completos) associados a esses genes (CACHIRO; HAENDEL; SMEDLEY, 2019).

Constam, a seguir, dois exemplos importantes de camundongos *knockout* de uso na pesquisa biomédica: os camundongos *knockout* para a apolipoproteína E (*Apoe^{-/-}*) e os camundongos *knockout* para o receptor dos Interferons do tipo I (*Ifnar^{-/-}*).

2.1.1 Camundongos knockout para o gene Apoe (*Apoe^{-/-}*) no estudo das doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de mortalidade, em todo mundo, responsáveis por aproximadamente 31% do total de óbitos. As DCVs formam um grupo de doenças distintas cujo denominador comum é a ocorrência de desordens na estrutura e função do coração e dos vasos sanguíneos (KAPTOGE

et al., 2019; WHO, 2017). Uma melhor compreensão dos fatores genéticos e ambientais envolvidos no início e na progressão das DCVs foi possibilitada com o desenvolvimento de linhagens de camundongos nocauteados para o gene da apolipoproteína E (*ApoE*) (OPPI; LÜSCHER; STEIN, 2019).

Em humanos, essa apolipoproteína de 34 quilodaltons está presente nas lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL, do inglês *Very Low Density Lipoprotein*) e de alta densidade (HDL, do inglês *High Density Lipoprotein*). A versão murina dessa proteína apresenta aproximadamente 70% de homologia com a proteína humana e está relacionada à relativa resistência de camundongos ao desenvolvimento de dislipidemias, mesmo quando alimentados com dieta hiperlipídica, o que limitava o seu uso como modelos para o estudo das DCVs (GETZ; REARDON, 2016).

As primeiras linhagens de camundongos *knockout* para *ApoE* foram desenvolvidas de forma independente, por dois grupos, em 1992. Uma vez que ApoE atua como um ligante para a captação e remoção de lipoproteínas plasmáticas pelo tecido hepático, a sua ablação em camundongos *knockout* resulta em hiperlipoproteïnemia, em hipercolesterolemia severa e no desenvolvimento de lesão aterosclerótica mesmo em dieta normolipídica (VOLOBUEVA; OREKHOV; DEYKIN, 2019).

A hipercolesterolemia resultante promove um estado inflamatório generalizado, decorrente da ativação de macrófagos por meio do carregamento contínuo de colesterol em suas membra-

nas. Quando ativadas, essas células produzem citocinas pró-inflamatórias e enzimas, que resultam em alterações estruturais da matriz extracelular. Uma vez que os efeitos da deficiência de *ApoE* se estendem além do metabolismo lipídico, os animais nocauteados para esse gene tem sido empregados também como modelos para outras doenças caracterizadas por inflamação sistêmica e degradação da matriz extracelular, tais como o Alzheimer e doenças inflamatórias pulmonares (LEWANDOWSKI; WENG; LADU, 2020; SASSO *et al.*, 2016).

O *knockout* de genes com efeitos pleiotrópicos dificulta o estabelecimento de mecanismos bem definidos para causa e efeito. No caso do mal de Alzheimer, por exemplo, torna-se difícil isolar os efeitos deletérios resultantes do *knockout* do gene *ApoE* no sistema nervoso central daqueles causados pela hipercolesterolemia secundária a esse processo.

Lane-Donovan *et al.* (2016) conseguiram isolar essas variáveis ao produzirem camundongo *knockout* para a expressão de ApoE apenas no sistema nervoso central, expressando a proteína de forma normal nos demais tecidos. Com isso, os autores foram capazes de traçar funções distintas para a proteína ApoE de acordo com seu sítio de expressão, levantando a hipótese de que apesar da essencialidade dessa proteína na preservação das sinapses na doença de Alzheimer, a dislipidemia e a disfunção vascular em animais com *knockout* total contribuem para a disfunção neuronal típica dessa doença.

2.1.2 Camundongos knockout para o receptor do interferon tipo I (*Ifnar*^{-/-}) no estudo de infecções virais

As infecções virais são específicas a determinados tipos celulares, que expressam em sua superfície receptores apropriados à internalização da partícula infectante (células suscetíveis), além de expressarem genes que promovam um ambiente intracelular favorável à replicação viral (células permissivas). Por causa desse elevado grau de especificidade da relação patógeno *versus* hospedeiro, modelos animais que naturalmente reproduzem doenças virais humanas, de forma fidedigna, são limitados (LOUZ *et al.*, 2012; SARKAR; HEISER, 2019).

O desenvolvimento de modelo murino de maior suscetibilidade aos vírus patogênicos para o ser humano foi possível com a obtenção, em meados dos anos 1990, de camundongos *knockouts* para o receptor dos interferons do tipo I (nome oficial aqui). Quando comparados com camundongos controle, os animais nocauteados para esse receptor apresentaram títulos virais superiores, ou vieram a óbito quando inoculados com doses menores de vírus (WONG; QIU, 2018).

Os interferons do tipo I compõem uma classe de citocinas importantes na resposta imunológica inata a patógenos virais, modulando também o perfil de resposta adaptativa a ser montada. Essas citocinas são produzidas por células infectadas e atuam de forma parácrina, induzindo a expressão de genes de proteção

contra a infecção viral em células vizinhas (MARY *et al.*, 2020; McNAB *et al.*, 2015).

Esse modelo de animal *knockout* tem-se mostrado relevante para o estudo de arboviroses, como a dengue, a febre zika e a chikungunya, que em modelos murinos não apresentam a miríade de sintomas típicos que caracterizam a doença humana (MARÍN-LOPEZ *et al.*, 2019).

No caso específico da infecção pelo vírus da dengue (DENV), o desenvolvimento de fármacos antivirais e vacinas têm como maior obstáculo a inexistência de modelos animais que compartilhem de quadro de sintomas semelhantes ao do ser humano, em que até mesmo espécies próximas, como os primatas não humanos, mimetizam apenas parcialmente os sintomas causados pela doença. Já o cruzamento de linhagens de camundongos *knockout* para o receptor dos IFN do tipo I (IFN- α/β), com linhagem de camundongo *knockout* para o receptor de IFN-gama, resultou na produção da linhagem AG129, que se tornou padrão para o estudo da infecção causada por DENV. Além disso, modelos de infecção para os quatro sorotipos virais (DENV 1-4) já foram estabelecidos para essa linhagem (CORONEL-RUIZ *et al.*, 2020; SARATHY *et al.*, 2018).

Assim, camundongos nocauteados para receptores de IFN do tipo I também se mostraram viáveis para o estudo da infecção pelo vírus da zika (ZIKV). Em humanos, a proteína NS5 do ZIKV interfere na sinalização por interferons, ao induzir a proteólise da proteína STAT2 (do inglês, *Signal Transducer and Activator of*

Transcription 2), o que não acontece durante a infecção experimental de camundongos *wild-type*. Camundongos nocauteados para o receptor dessa citocina, ou ainda para o próprio fator de transcrição STAT2, por sua vez, são suscetíveis à infecção, com o estabelecimento da doença em um período de 5 a 8 dias, tendo sido empregados com sucesso em ensaios pré-clínicos de vacinas (GRANT *et al.*, 2016; SHAN *et al.*, 2017; WINKLER; PETERSON, 2017; YU *et al.*, 2017).

Modelos murinos imunocompetentes são suscetíveis à infecção pelo vírus da chikungunya (CHIKV), apesar de também apresentarem limitações quanto às manifestações crônicas da doença. Nesse caso, a suscetibilidade natural ao vírus é exacerbada em animais *knockout* para o receptor de interferons do tipo I, levando rapidamente os animais infectados a óbito. Apesar de impossibilitar o estudo da patogênese viral, esse modelo de animal *knockout* permite o desenvolvimento de ensaios para a validação de anticorpos contra o vírus, assim como para a análise do potencial protetor de vacinas, uma vez que protocolos de imunização efetivos protegem os animais imunizados de vir a óbito após desafio com o vírus (HAESE *et al.*, 2016).

2.2 Knockins e Substituições

A inserção de sequências de DNA codificantes para proteínas de interesse biomédico ausentes (ou muito distintas de sua contraparte humana) em modelos animais, é utilizada como forma

de aproximar o modelo experimental da realidade do organismo humano. O termo *knockin* é empregado apenas quando essa modificação é inserida em região definida (não aleatória) do material genético do animal (LANIGAN; KOPERA, SAUNDERS, 2020).

A mesma técnica pode ser utilizada para fusionar o produto proteico de um gene de interesse (proteína estrutural, receptor ou enzima) a um marcador fluorescente, como a proteína GFP (do inglês, *Green Fluorescent Protein*). Dessa forma, torna-se possível acompanhar a dinâmica de produção, direcionamento, localização e *turnover* da proteína estudada durante o desenvolvimento do organismo, assim como as modificações dessa dinâmica em condições patológicas (DOH *et al.*, 2018; LIPTÁK; BŐSZE; HIRIPI, 2019).

As substituições permitem a troca de regiões codificantes específicas do animal experimental por sequências de gene humano equivalente ou funcionalmente relacionada, possibilitando a “humanização” do animal em questão. Também é possível modificar pontualmente determinados genes, de forma a simular doenças genéticas humanas causadas por alelos específicos (ZHU *et al.*, 2019).

Animais em que a inserção de material genético exógeno tenha se dado em sítio não definido previamente, ou seja, de forma aleatória, são denominados simplesmente de camundongos transgênicos. Com o refinamento das técnicas de edição gênica possibilitado pelo aprimoramento do sistema CRISPR/Cas9, as metodologias de modificações genéticas de caráter aleatório vêm se tornando cada vez mais obsoletas (SAKURAI *et al.*, 2020).

Esse tipo de modificação genética é a base para a humanização de animais de experimentação, estabelecendo mecanismos moleculares que possibilitam simular com maior fidedignidade modelos de doenças humanas. De forma a ilustrar o potencial desses animais, seguem aspectos de sua utilização para a produção de anticorpos humanizados e para o estudo das coronavíroses, mais especificamente, da Covid-19.

2.2.1 Animais transgênicos para a produção de anticorpos humanizados

O uso de anticorpos como biofármacos teve sua origem no final do século XIX, com a produção de soros antitoxinas em animais imunizados. Com os avanços da biotecnologia, foi possível modificar o genoma de diferentes animais, com a finalidade de inserir genes codificantes das cadeias de imunoglobulinas humanas. Dessa forma, uma vez imunizados, esses animais produziram anticorpos semelhantes aos humanos, expandindo o seu leque de aplicações terapêuticas. Com essa finalidade, diferentes linhagens de camundongos, ratos, coelhos, vacas e galinhas transgênicas foram desenvolvidas (CAMERON *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2018).

Os primeiros animais transgênicos para a produção de anticorpos humanizados, denominados camundongos HumAb, resultaram de um processo de nocaute dos genes de imunoglobulina murinos, seguido da inserção em lócus aleatório de seu equiva-

lente humano. Os animais desenvolvidos com essa técnica apresentavam resposta imunológica inferior à de animais selvagens, o que limitava o repertório de anticorpos obtidos. Essa resposta deficiente foi atribuída, dentre outros fatores, ao caráter aleatório do sítio de inserção do gene humano, assim como a incapacidade da região inserida (região constante da imunoglobulina) interagir bem com receptores murinos de ativação da resposta imunológica (BRÜGGEMANN *et al.*, 2015; MURPHY *et al.*, 2014).

Uma modificação da estratégia de engenharia genética (manutenção das cadeias constantes do animal hospedeiro e inserção apenas das regiões variáveis dos anticorpos humanos), associada ao aperfeiçoamento das técnicas de modificação de *loci* específicos no genoma murino, possibilitou o *knockin* desses animais para a produção de anticorpos humanizados (MURPHY *et al.*, 2014; LIN *et al.*, 2018; ZHU *et al.*, 2019).

A obtenção de camundongos para a produção de anticorpos humanizados abriu caminho para a manipulação genética de outros animais, com o intuito de produzir anticorpos de interesse biomédico. A utilização de aves, por exemplo, mostra-se vantajosa por possibilitar a produção de anticorpos contra proteínas que não elicitariam resposta imunológica potente em mamíferos (como, por exemplo, citocinas e proteínas tumorais), uma vez que são filogeneticamente mais distantes do ser humano do que outros mamíferos.

Nesse contexto, a produção de galinhas geneticamente modificadas para expressão das cadeias variáveis pesada e leve de

anticorpos humanos possibilitou a produção de anticorpos humanizados em aves (CHING *et al.*, 2018).

A produção de anticorpos humanizados em bovinos transgênicos tem demonstrado potencial para a utilização de anticorpos policlonais como biofármacos no tratamento de doenças de caráter emergencial, como a Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS, do inglês *Middle East Respiratory Syndrome*) e mais recentemente para a Covid-19. O soro desses animais pode, ainda em caráter experimental, suprir a demanda por soro convalescente no tratamento de pacientes graves, complementando ou substituindo o normalmente escasso soro humano de forma eficaz e segura (BEIGEL *et al.*, 2018; LESLIE, 2020; LIU *et al.*, 2020).

2.2.2 Camundongos transgênicos para a Enzima Conversora de Angiotensina 2 humana (hACE2) no estudo da Covid-19

A Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ACE2, do inglês *angiotensin-converting enzyme 2*) está presente na superfície de células humanas, em especial das células epiteliais alveolares do tipo II, responsáveis pela produção do surfactante pulmonar (LUTZ *et al.*, 2020). Essa proteína foi identificada como o receptor que possibilita a entrada de vírus causadores de doenças do trato respiratório, como a Síndrome Respiratória Aguda Grave (Sars, do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome*), resultando em comprometimento da função respiratória em decorrência da destruição das células infectadas (HIKMET *et al.*, 2020; TAI *et al.*, 2020).

Apesar de camundongos e outros animais experimentais possuírem receptores ortólogos à hACE2 em suas superfícies celulares, as espécies mostraram ser muito menos suscetíveis à infecção, limitando a reprodução de achados imunopatológicos observados em casos humanos mais graves, assim como de manifestações sistêmicas da doença. Esses resultados são atribuídos à maior afinidade da proteína S (Spike) dos coronavírus à proteína hACE2, quando comparada à de outras espécies (CLEARY *et al.*, 2020; JOHANSSSEN *et al.*, 2020).

Por causa dessa limitação, camundongos transgênicos para a proteína hACE2 foram produzidos, em meados dos anos 2000, com o intuito de estabelecer modelo experimental que possibilitasse ensaios com vacinas e antivirais contra o Sars-CoV, agente etiológico responsável pela epidemia de Sars ocorrida em 2003. Os modelos desenvolvidos por McCray *et al.* (2007), Menachery *et al.* (2016), Tseng *et al.* (2007) e Yang *et al.* (2007) foram capazes de reproduzir com fidedignidade os achados encontrados em pacientes humanos acometidos pelo patógeno. Uma vez controlada a epidemia de 2003, trabalhos utilizando esses animais foram se tornando escassos, reduzindo a demanda por novas colônias e levando a sua manutenção apenas sob a forma de criopreservação do sêmen de camundongos transgênicos (CALLAWAY, 2020; LUTZ *et al.*, 2020).

No início da década de 2020, testemunhou-se um novo interesse por esses animais, à medida que um novo coronavírus, denominado Sars-CoV-2, disseminou-se rapidamente ao redor do mundo,

causando a Covid-19, doença de caráter pandêmico responsável pela infecção e morte de milhões de pessoas (KISSLER *et al.*, 2020). A urgência pelo desenvolvimento de vacinas e para o ensaio de fármacos antivirais encontrou o seu primeiro gargalo na indisponibilidade de animais modelos em quantidade suficiente para atender às instituições de pesquisa em todo o mundo (CALLAWAY, 2020).

A confirmação da validade de camundongos transgênicos para hACE2 como modelo de estudo para a Covid-19 veio com os resultados que mostravam que esses animais, uma vez infectados com o Sars-CoV-2, apresentaram infiltrado inflamatório alveolar, assim como a presença de antígenos virais ausentes nos controles selvagens (BAO *et al.*, 2020).

Uma das limitações dos modelos transgênicos até então desenvolvidos consistia em manter a expressão da proteína ACE2 murina paralelamente à expressão do transgene humano, gerando uma variável de confusão para interpretar os dados experimentais obtidos. Os avanços na utilização de CRISPR/Cas9 como ferramenta para a modificação genética de animais de experimentação possibilitou o desenvolvimento de um novo modelo murino para ensaios com o Sars-CoV-2, no qual o gene ACE2 murino foi substituído por sua contraparte humana em camundongos de linhagem C57BL/6. Os animais assim obtidos se mostraram suscetíveis a infecção por vias nasal e oral, reproduzindo com elevada fidelidade a cinética de replicação viral e os achados patológicos observados em pacientes humanos (SUN, S-H. *et al.*, 2020).

Apesar de serem considerados um dos melhores modelos animais para o estudo da Covid-19, os camundongos transgênicos usados para a hACE2 limitam a possibilidade de desenhos experimentais possíveis apenas às linhagens de camundongos para as quais essa modificação genética já foi realizada. A utilização de camundongos de diferentes *backgrounds* genéticos possibilitaria o estudo de diferentes aspectos da resposta do hospedeiro à infecção viral, tendo sido explorada de maneira inovadora por variados grupos.

Dinnon *et al.* (2020) utilizaram técnicas de genética reversa para gerar um vírus que apresentasse em sua superfície uma proteína S de maior afinidade à proteína ACE2 de camundongos BALB/c, por meio de alteração dos resíduos Q498 e P499 de seu domínio de ligação ao receptor (RBD, do inglês *Receptor Binding Domain*). Segundo os autores, os achados imunopatológicos em animais jovens e idosos infectados pelo vírus adaptado mostraram-se de maior relevância clínica do que os observados em camundongos transgênicos para a proteína hACE2.

Outra forma de possibilitar a infecção de diferentes linhagens de camundongos se dá pela utilização de vetores adenovirais carregando sequência de gene codificante para a hACE2. Uma vez administrados por via intranasal, os vetores são capazes de induzir a expressão estável desse receptor nas células transduzidas do sistema respiratório de diferentes linhagens murinas. De forma semelhante, camundongos nocauteados para diferentes genes também podem se tornar mais suscetíveis à infecção viral, possibilitando dissecar as

vias moleculares envolvidas em diferentes aspectos da resposta do hospedeiro (HASSAN *et al.*, 2020; SUN, J. *et al.*, 2020).

3 OPORTUNIDADES E DESAFIOS

A pandemia de Covid-19 reavivou a importância da pesquisa científica, aos olhos dos governos e da sociedade, e para a necessidade de investimentos nas instituições de pesquisa. No mercado global de camundongos modelo, por exemplo, projeta-se um crescimento de aproximadamente 35%, estimando-se para 2025 uma movimentação de valores na faixa de US\$ 1,9 bi. Tal projeção foi impulsionada pelo aumento da demanda por pesquisa e desenvolvimento na indústria farmacêutica decorrente da pandemia (MARKETS AND MARKETS, 2020).

O uso de CRISPR/Cas9 como ferramenta de modificação genética também tem facilitado o desenvolvimento de novos modelos animais para a pesquisa científica, auxiliando na consolidação de modelos emergentes, como o *zebrafish* (*Danio rerio*), por meio de seu *knockin*, com elevada eficiência e facilidade (BAILONE *et al.*, 20020; KIMURA *et al.*, 2017). Do ponto de vista biotecnológico, a utilização de animais de produção como biorreatores têm possibilitado a produção de proteínas de interesse biomédico nas glândulas mamárias de bovinos e caprinos (LAMAS-TORANZO *et al.*, 2017; MONZANI *et al.*, 2016; YUM *et al.*, 2018).

Vale ressaltar que, apesar dos processos para a obtenção de animais geneticamente modificados terem se tornado rotinei-

ros, muitos aspectos das consequências dessa manipulação ainda precisam ser compreendidos pela ciência. As repercussões genéticas e epigenéticas da inserção de DNA exógeno em uma célula hospedeira, como, por exemplo, alterações na metilação do DNA, na modificação de histonas ou na atividade de RNAs reguladores, podem levar ao silenciamento do gene introduzido ou, ainda, à modificação do perfil transcricional global da célula modificada, tendo sido mais investigadas em modelos de plantas transgênicas do que em animais (CALERO-NIETO; BERT; COCKERILL, 2010; DOERFLER, 2019; FAN *et al.*, 2020).

Outro aspecto que tem merecido discussão da comunidade científica, diz respeito ao bem-estar dos animais alvos de modificação genética, uma vez que a inserção de genes heterólogos, ou o *knockout* de um gene nativo, podem ter consequências imprevisíveis sobre a qualidade de vida do animal de experimentação. Para nortear pesquisadores, membros de Comissões de Ética em Utilização de Animais e entidades reguladoras, foi proposta uma ferramenta (3RsAGENT) para auxiliar na avaliação de incertezas e consequências para o bem-estar animal em projetos que envolvem processos de modificação genética (ZINTZSCH; NOE; GRIMM, 2020).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As últimas décadas registram muitos avanços no âmbito da engenharia genética para o desenvolvimento de animais modelos para a pesquisa científica básica e para a biotecnologia. Esses ani-

mais têm se mostrado como ferramentas essenciais para a compreensão de mecanismos patológicos de doenças humanas e para o desenvolvimento de novos fármacos e vacinas. Apesar disso, incertezas relativas às consequências epigenéticas dessas modificações, assim como o impacto dessas modificações no bem-estar desses animais, deverão ser investigados de forma a garantir que os resultados obtidos, além de fidedignos e reprodutíveis, não resultem de sofrimento animal evitável.

REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, M. L.; WINTER, L. M. F. Animal models in biological and biomedical research - Experimental and ethical concerns. *ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS, Anais [...]*, v. 91, n. 1, p. 1-14, 2019.
- ASKE, K. C.; WAUGH, C. A. Expanding the 3Rs principles. *Embo Reports*, v. 18, n. 9, p. 1490-1492, 25 jul. 2017.
- BAILONE, R. L. *et al.* Zebrafish as an alternative animal model in human and animal vaccination research. *Laboratory Animal Research*, v. 36, n. 1, p. 1-10, 7 maio 2020.
- BAO, L. *et al.* The pathogenicity of SARSCoV-2 in hACE2 transgenic mice. *Nature*, v. 583, n. 7818, p. 830-833, 7 maio 2020
- BEIGEL, J. H. *et al.* Safety and tolerability of a novel, polyclonal human anti-MERS coronavirus antibody produced from transchromosomal cattle: A phase 1 randomised, double-blind, single-dose-escalation study. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 18, n. 4, p. 410-418, abr. 2018.
- BOS, E. van Den; *et al.* Knockout mouse models reveal the contributions of G protein subunits to complement C5a receptor-mediated chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry*, v. 295, n. 22, p. 7.726-7.742, 24 abr. 2020.
- BRESCHI, A.; GINGERAS, T. R.; GUIGÓ, R. Comparative transcriptomics in human and mouse. *Nature Reviews Genetics*, v. 18, n. 7, p. 425-440, 8 maio 2017.

BRUBAKER, D. K.; LAUFFENBURGER, D. A. Translating preclinical models to humans. *Science*, v. 367, n. 6479, p. 742-743, 13 fev. 2020.

BRÜGGEMANN, M. *et al.* Roland. Human antibody production in transgenic animals. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, v. 63, n. 2, p. 101-108, 3 dez. 2014.

CACHEIRO, P. HAENDEL, M. A.; SMEDLEY, D. New models for human disease from the International Mouse Phenotyping Consortium. *Mammalian Genome*, v. 30, n. 5-6, p. 143-150, 24 maio 2019.

CALERO-NIETO, F. J; BERT, A. G; COCKERILL, P. N. Transcription-dependent silencing of inducible convergent transgenes in transgenic mice. *Epigenetics & Chromatin*, v. 3, n. 1, p. 1-13, 2010

CALLAWAY, E. Labs rush to study coronavirus in transgenic animals: some are in short supply. *Nature*, v. 579, n. 7.798, p. 183-183, mar. 2020.

CAMERON, B. *et al.* Complementary epitopes and favorable developability of monoclonal antiLAMP1 antibodies generated using two transgenic animal platforms. *Plos One*, v. 15, n. 7, p. 1-19, 16 jul. 2020.

CLEARY, S. J. *et al.* Animal models of mechanisms of Sars-CoV-2 infection and Covid-19 pathology. *British Journal of Pharmacology*, p. 1-49, 19 jul. 2020.

CORONEL-RUIZ, C. *et al.* Humanized mice in dengue research: a comparison with other mouse models. *Vaccines*, v. 8, n. 1, p. 1-23, 22 jan. 2020.

DENAYER, T.; STÖHR, T.; VAN ROY, Maarten. Animal models in translational medicine: Validation and prediction. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 5-11, 27 ago. 2014.

DINNON, K. H. *et al.* A mouse-adapted SarsCov-2 model for the evaluation of Covid-19 medical countermeasures. *Biorxiv*, p. 1-35, 7 maio 2020.

DOERFLER, W. Epigenetic consequences of genome manipulations: caveats for human germline therapy and genetically modified organisms. *Epigenomics*, v. 11, n. 3, p. 247-250, fev. 2019.

DOH, S. J. *et al.* Fluorescent reporter transgenic mice for in vivo live imaging of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Angiogenesis*, v. 21, n. 4, p. 677-698, 3 jul. 2018.

DOYLE, A. *et al.* The construction of transgenic and gene *knockout*/*knockin* mouse models of human disease. *Transgenic Research*, v. 21, n. 2, p. 327-349, 29 jul. 2011.

FAN, X. *et al.* Genetic and global epigenetic modification, which determines the phenotype of transgenic rice? *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 5, p. 1-16, 6 mar. 2020.

GETZ, G. S.; REARDON, C. A. ApoE *knockout* and *knockin* mice: The history of their contribution to the understanding of atherogenesis. *Journal of Lipid Research*, v. 57, n. 5, p. 758-766, 25 mar. 2016.

GRANT, A. *et al.* Zika virus targets human STAT2 to inhibit type I interferon signaling. *Cell Host & Microbe*, v. 19, n. 6, p. 882-890, jun. 2016.

GURUMURTHY, C. B.; LLOYD, K. C. K. Generating mouse models for biomedical research: technological advances. *Disease Models & Mechanisms*, v. 12, n. 1, p. 1-10, 1 jan. 2019.

HAESE, N. N. *et al.* Animal models of chikungunya virus infection and disease. *Journal of Infectious Diseases*, v. 214, n. 5, p. 482-487, 5 dez. 2016.

HANAHAN, D.; WAGNER, E. F.; PALMITER, R. D. The origins of oncomice: a history of the first transgenic mice genetically engineered to develop cancer. *Genes & Development*, v. 21, n. 18, p. 2258-2270, 15 set. 2007.

HASSAN, A. O. *et al.* A Sars-CoV-2 infection model in mice demonstrates protection by neutralizing antibodies. *Cell*, v. 182, n. 3, p. 744-753, ago. 2020.

HERATI, R. S.; WHERRY, E. J. What is the predictive value of animal models for vaccine efficacy in humans? *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 10, n. 4, p. 1-8, 27 mar. 2017.

HIKMET, F. *et al.* The protein expression profile of ACE2 in human tissues. *Molecular Systems Biology*, v. 16, n. 7, p. 1-16, jul. 2020.

JOHANSEN, M. D. *et al.* Animal and translational models of Sars-CoV-2 infection and Covid-19. *Mucosal Immunology*, p. 1-15, 20 ago. 2020.

KABENE, S.; BAADEL, S. Bioethics: a look at animal testing in medicine and cosmetics in the UK. *Journal of Medical Ethics and History of Medicine*, p. 1-11, 30 nov. 2019.

KAPTOGE, S. *et al.* World Health Organization cardiovascular disease risk charts: revised models to estimate risk in 21 global regions. *The Lancet Global Health*, v. 7, n. 10, p. 1332-1345, out. 2019.

KIMURA, Y. *et al.* Efficient generation of knock-in transgenic zebrafish carrying reporter/driver genes by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Scientific Reports*, v. 4, n. 1, p. 1-7, 8 out. 2014.

KISSELER, S. M. *et al.* Projecting the transmission dynamics of SarsCoV-2 through the postpandemic period. *Science*, v. 368, n. 6493, p. 860-868, 14 abr. 2020.

LAMAS-TORANZO, I. *et al.* CRISPR is knocking on barn door. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 52, p. 39-47, out. 2017

LANE-DONOVAN, C. *et al.* Genetic restoration of plasma ApoE improves cognition and partially restores synaptic defects in ApoE-Deficient mice. *Journal of Neuroscience*, v. 36, n. 39, p. 10141-10150, 28 set. 2016.

LANIGAN, T. M.; KOPERA, H. C.; SAUNDERS, T. L. *Principles of genetic engineering*. *Genes*, v. 11, n. 3, p. 1-21, 10 mar. 2020.

LESLIE, M. This cow's antibodies could be the newest weapon against Covid-19. *Science*, p. 1-2, 5 jun. 2020.

LEWANDOWSKI, C. T.; WENG, J. M.; LADU, M. J. Alzheimer's disease pathology in Apoe transgenic mouse models: the who, what, when, where, why, and how. *Neurobiology of Disease*, v. 139, p. 1-17, jun. 2020.

LIN, Y-C. *et al.* One-step CRISPR /Cas9 method for the rapid generation of human antibody heavy chain knock-in mice. *The Embo Journal*, v. 37, n. 18, p. 1-16, 7 ago. 2018.

LIPTÁK, N.; BŐSZE, Z.; HIRIPI, L. GFP transgenic animals in biomedical research: A review of potential disadvantages. *Physiological Research*, p. 525-530, ago. 2019.

LIU, C. *et al.* Research and development on therapeutic agents and vaccines for covid-19 and related human coronavirus diseases. *Acs Central Science*, v. 6, n. 3, p. 315-331, 12 mar. 2020.

LOUZ, D. *et al.* Animal models in virus research: their utility and limitations. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 39, n. 4, p. 325-361, 14 set. 2012.

LUTZ, C. *et al.* Covid-19 preclinical models: Human angiotensin-converting enzyme 2 transgenic mice. *Human Genomics*, v. 14, n. 1, p. 1-11, 4 jun. 2020.

MARÍN-LOPEZ, A. *et al.* Modeling arboviral infection in mice lacking the interferon alpha/beta receptor. *Viruses*, v. 11, n. 1, p. 1-25, 8 jan. 2019.

MARKETSAND MARKETS. *Mice model market by mice type (inbred, knockout), technology (CRISPR, Talen, ZFN), application (oncology, diabetes, immunology), service (breeding, cryopreservation, genetic testing), care products (cages, bedding, feed), region - Global forecast to 2025*. 2020. Disponível em: <https://www.marketsandmarkets.com/MarketReports/mice-model-market-1308.html>. Acesso em: 8 ago. 2020.

MARY, A. *et al.* Therapeutic options for coronavirus disease 2019 (Covid-19) - Modulation of type I interferon response as a promising strategy? *Frontiers in Public Health*, v. 8, p. 1-4, 15 maio 2020.

MCCRAY, P. B. *et al.* Lethal infection of K18-hACE2 mice infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Journal of Virology*, v. 81, n. 2, p. 813-821, 1 nov. 2006

MCNAB, F. *et al.* Type I interferons in infectious disease. *Nature Reviews Immunology*, v. 15, n. 2, p. 87-103, 23 jan. 2015.

MENACHERY, V. D. *et al.* SARS-like WIV1-CoV poised for human emergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 113, n. 11, p. 3048-3053, 14 mar. 2016.

MONZANI, P. S. *et al.* Transgenic bovine as bioreactors: challenges and perspectives. *Bioengineered*, v. 7, n. 3, p. 123-131, 8 abr. 2016

MURPHY, A. J. *et al.* Mice with megabase humanization of their immunoglobulin genes generate antibodies as efficiently as normal mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 111, n. 14, p. 5153-5158, 25 mar. 2014.

MYELNIKOV, D. Tinkering with genes and embryos: The multiple invention of transgenic mice c. 1980. *History and Technology*, v. 35, n. 4, p. 425-452, 2 out. 2019.

NC3RS/BBSRC/DEFRA/MRC/NERC/ROYAL SOCIETY/WELLCOME TRUST. *Responsibility in the use of animals in bioscience research: Expectations of the major research councils and charitable funding bodies*. Londres: Nc3Rs, 2019. Disponível em: <https://www.nc3rs.org.uk/responsibilityuse-animals-bioscience-research>. Acesso em: 8 jul. 2020.

OPPI, S.; LÜSCHER, T. F.; STEIN, S. Mouse Models for Atherosclerosis Research: which Is My Line? *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, v. 6, p. 1-8, 12 abr. 2019.

RHRISSORRAKRAI, K. *et al.* Understanding the limits of animal models as predictors of human biology: lessons learned from the sbv improver species translation challenge. *Bioinformatics*, v. 31, n. 4, p. 471-483, 17 set. 2014.

ROCHA-MARTINS, M. *et al.* From gene targeting to genome editing: transgenic animals applications and beyond. ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS, *Anais [...]* v. 87, n. 2, p. 1323-1348, ago. 2015. *Qual o local dos anais? editora?*

SAKURAI, T. *et al.* Production of genetically engineered mice with higher efficiency, lower mosaicism, and multiplexing capability using maternally expressed Cas9. *Scientific Reports* v. 10, n. 1, p. 1-13, 23 jan. 2020.

SANTOS, M. L. dos *et al.* Advances and challenges in therapeutic monoclonal antibodies drug development. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 54, p. 1-15, 8 nov. 2018.

SARATHY, V. *et al.* Characterization of a murine model of non-lethal, symptomatic dengue virus infection. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 1-16, 20 mar. 2018.

SARKAR, S.; HEISE, M. T. Mouse models as resources for studying infectious diseases. *Clinical Therapeutics*, v. 41, n. 10, p. 1912-1922, out. 2019.

SASSO, G. *et al.* The Apoe^{-/-} mouse model: A suitable model to study cardiovascular and respiratory diseases in the context of cigarette smoke exposure and harm reduction. *Journal of Translational Medicine*, v. 14, n. 1, p. 1-16, 20 maio 2016.

SHAN, C. *et al.* A live-attenuated Zika virus vaccine candidate induces sterilizing immunity in mouse models. *Nature Medicine*, v. 23, n. 6, p. 763-767, 10 abr. 2017.

SUN, J. *et al.* Generation of a broadly useful model for covid-19 pathogenesis, vaccination, and treatment. *Cell*, v. 182, n. 3, p. 734-743, ago. 2020.

SUN, S.-H. *et al.* A mouse model of Sars-CoV-2 infection and pathogenesis. *Cell Host & Microbe*, v. 28, n. 1, p. 124-133, jul. 2020.

TAI, W. *et al.* Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of rbd protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. *Cellular & Molecular Immunology*, v. 17, n. 6, p. 613-620, 19 mar. 2020.

TSENG, C-T. K. *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of mice transgenic for the human Angiotensin-converting enzyme 2 virus receptor. *Journal Of Virology*, v. 81, n. 3, p. 1162-1173, 15 nov. 2006.

VANDAMME, T. F. Rodent models for human diseases. *European Journal of Pharmacology*, v. 759, p. 84-89, jul. 2015.

VOLOBUEVA, A. S.; OREKHOV, A. N.; DEYKIN, A. V. An update on the tools for creating transgenic animal models of human diseases – focus on atherosclerosis. *Brazilian Journal of Medical And Biological Research*, v. 52, n. 5, p. 1-7, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Cardiovascular diseases (CVDs)*. 2017. Disponível em: [https://www.who.int/en/news-room/factsheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/factsheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). Acesso em: 12 jun. 2020.

WINKLER, Clayton W.; PETERSON, Karin E. Using immunocompromised mice to identify mechanisms of Zika virus transmission and pathogenesis. *Immunology*, v. 153, n. 4, p. 443-454, 19 jan. 2018.

WONG, G.; QI.U, X.-G. Type I interferon receptor *knockout* mice as models for infection of highly pathogenic viruses with outbreak potential. *Zoological Research*, v. 39, n. 1, p. 3-14, 2018.

YANG, X.-H. *et al.* Mice transgenic for human angiotensin-converting enzyme 2 provide a model for Sars coronavirus infection. *Comparative Medicine*, v. 57, n. 5, p. 450-459, out. 2007.

YU, Y. *et al.* A peptide-based viral inactivator inhibits Zika virus infection in pregnant mice and fetuses. *Nature Communications*, v. 8, n. 1, p. 1-12, 25 jul. 2017.

YUM, S.-Y.; Development of genome engineering technologies in cattle: From random to specific. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v. 9, n. 1, p. 1-9, 30 jan. 2018.

ZHU, F. *et al.* Humanising the mouse genome piece by piece. *Nature Communications*, v. 10, n. 1, p. 1-13, 23 abr. 2019.

ZINTZSCH, A.; NOE, E.; GRIMM, H. Navigating uncertainties: how to assess welfare and harm in genetically altered animals responsibly: a practical guideline. *Animals*, v. 10, n. 5, p. 1-16, 15 maio 2020.

CAPÍTULO 13 <doi>10.51996/9788574853994.cap13</doi>

MODELOS CELULARES PARA PROSPECÇÃO DE MOLÉCULAS COM POTENCIAL FARMACOLÓGICO

Alexia Nathália Brígido Assef

Evelline Araújo Edson

Felipe Barros Teles

Gisele de Fátima Pinheiro Rangel

Katharine Gurgel Dias Florêncio

Tamiris de Fátima Goebel de Souza

Larissa Alves Guimarães¹

Diego Veras Wilke²

Resumo: Os modelos de cultura de células estão entre as alternativas mais utilizadas para reduzir o uso de animais em estudos de farmacologia. Além dos aspectos éticos, outros pontos favoráveis aos modelos são: baixo custo; menor tempo de trabalho; menor quantidade de amostras utilizadas; e possibilidade de acelerar a descoberta de fármacos através de escalonamento envolvendo plataformas automatizadas. Além de permitir a identificação precoce de efeitos ou alvos moleculares específicos, por meio da uti-

1 Núcleo de Pesquisa em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Piauí, Picos, Piauí, Brasil. Todos os demais autores estão vinculados ao Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará, Brasil.

2 *E-mail* para correspondência: diegowilke@gmail.com

lização de células de cultura primária ou linhagens, a prospecção de moléculas bioativas *in vitro* também é relevante para estudos pré-clínicos após a descoberta de amostras com atividade biológica de interesse. Essas características permitem a seleção rápida de amostras promissoras, com o perfil de atividade biológica desejado. Uma desvantagem notável, entretanto, ainda é o baixo percentual de translação dos resultados *in vitro* para modelos *in vivo*. Neste capítulo, são apresentados testes *in vitro* úteis para a descoberta de fármacos com potencial anticâncer, antimetastático, cicatrizante, pró-inflamatório, anti-inflamatório e anti-Sars-CoV-2.

Palavras-Chave: Cultura de células. Prospecção de Fármacos. Anticâncer. Ativação de Macrófagos. Migração Celular. Antiviral. Sars-CoV-2.

CELLULAR MODELS FOR PROSPECTING MOLECULES WITH PHARMACOLOGICAL POTENTIAL

Abstract: Cell culture models are among the most applied alternatives to reduce the use of animals in pharmacology studies. In addition to the ethical aspects, other points favorable to the use of cellular models are low cost, short working time, small amount of samples required, and the possibility to accelerate drug discovery evaluating large libraries of samples by high-throughput screening platforms. Prospecting of bioactive molecules *in vitro* allows the early identification of specific molecular effects and/or targets, through the use of primary culture

cells or cell lines, which is also relevant for pre-clinical studies after the discovery of samples with biological activity of interest. These characteristics allow quick selection of promising samples with the desired biological activity profile. However, a notable disadvantage is still the low percentage of translation of results *in vitro* to *in vivo* models. This chapter will present *in vitro* tests useful for discovering drugs with anticancer, anti-metastatic, wound healing, pro-inflammatory, anti-inflammatory, and anti-Sars-CoV-2 potential.

Keywords: Cellular Models. Drug Discovery. Anticancer. Macrophage Activation. Cell Migration. Antiviral. Sars-Cov-2.

1 INTRODUÇÃO

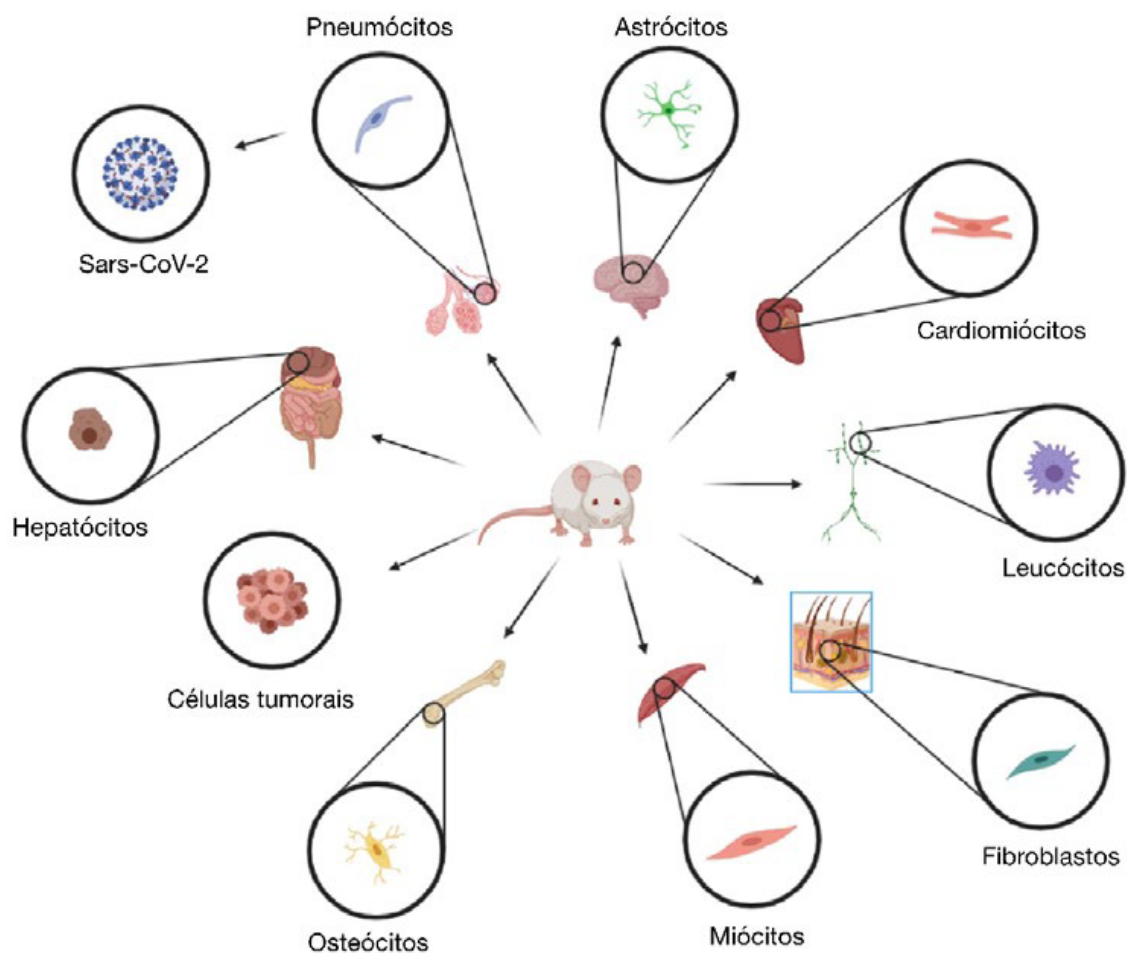
As primeiras tentativas de cultivar tecidos fora de um organismo animal datam do final do século XIX. O avanço significativo ocorreu quando o embriologista Ross Granville Harrison estabeleceu uma técnica de cultura pioneira, na qual cultivou células nervosas do tecido embrionário de rãs, em uma gota de fluido linfático que ficava suspensa entre uma lamínula e uma lâmina com concavidade. Dessa forma, e com a adoção de medidas assépticas, Harrison manteve o tecido neural vivo por até cinco semanas e a técnica ficou conhecida como “gota suspensa” (HARRISON, 1907; 1910).

Desde então, os métodos de cultivo e manipulação de células animais *in vitro* passaram por crescente escalada tecnológica, até

o estabelecimento de modelos celulares conhecidos hoje. Tais modelos ganharam destaque por possibilitar inúmeros avanços científicos na área biomédica, como a produção de vacinas, proteínas recombinantes, anticorpos monoclonais e células para transplante, bem como a descoberta e o desenvolvimento de medicamentos.

Nesse sentido, um motivo central que direciona a atenção dos pesquisadores para a escolha de modelos celulares *in vitro* é a alternativa que esses oferecem aos experimentos que utilizam animais nas etapas iniciais de descoberta e de parte dos estudos pré-clínicos (DOKE; DHAWALE, 2015; KIM *et al.*, 2019). Uma visão geral da variedade de tipos celulares a serem escolhidos em um modelo celular em experimentos com animais está representada na Figura 1.

Figura 1 – Células de diversos tecidos em cultura *in vitro* podem ser utilizadas na prospecção de novos medicamentos



Fonte: Elaborada pelos autores.

O uso de modelos *in vitro* contempla dois princípios da estratégia dos 3 Rs de Russel e Burch (1959) para a ética em experimentação animal: a redução e a substituição (no inglês, *replacement*). A substituição do uso de animais com modelos alternativos é normalmente parcial (DOKE; DHAWALE, 2015). Outras vantagens dos modelos celulares em relação aos modelos *in vivo* referem-se ao custo;

número de amostras testadas; à reprodutibilidade; e à possibilidade de estudo com células de origem humana. Apesar do investimento inicial significativo, o custo para manter a rotina de cultura de células é financeiramente mais acessível do que a produção e manutenção de animais com padrão de qualidade adequado.

Em modelos animais, a quantidade de amostra-teste necessária para realizar os ensaios é relativamente grande, de centenas de miligramas a alguns gramas, o que representa limitação, seja pelo custo de aquisição, ou mesmo pelo baixo rendimento do isolamento de produtos naturais ou da obtenção de moléculas por meio da síntese. Já em modelos celulares, é necessária uma pequena quantidade de amostra para realizar os testes, de centenas de microgramas a poucos miligramas, o que acaba por viabilizar a testagem de maior número de amostras.

Além disso, o número de amostras testadas em pouco tempo pode ser elevado, até centenas de milhares por mês, devido à possibilidade de automação de processos, como pipetagem, aquisição e análise de amostras. Também há uma tendência a menor variação nos resultados *in vitro*, uma vez que uma população de células de determinada linhagem celular é mais homogênea em relação a uma população de animais. Finalmente, a possibilidade do uso de material de origem humana, de origem embrionária ou de tumores de pacientes, células sanguíneas ou da medula óssea de indivíduos saudáveis ou doentes, é uma vantagem de altíssima relevância dos modelos celulares (GRUBER; HARTUNG, 2004).

Os modelos celulares também apresentam limitações notáveis, que podem reduzir a translação desses resultados para o estudo em modelos animais. Por isso, é importante conhecê-las para aproveitar o máximo dos resultados sem incorrer em extrapolações inadequadas. A falta de respostas sistêmicas, como metabolização hepática e outros aspectos farmacocinéticos e farmacodinâmicos, além das interações com o sistema imunológico como um todo, são desvantagens importantes.

Outra característica é a menor concentração e variedade de células, em comparação com a existente nos organismos animais, resultando em menor representação de interações célula-célula. Porém, a redução da variabilidade natural dos modelos celulares tem conotação dupla, podendo figurar como vantagem ou desvantagem, dependendo do objetivo de estudo. Além disso, por estarem fora do ambiente natural, sem receber os sinais de retroalimentação e a influência das demandas metabólicas sistêmicas, podem alterar seu fenótipo e fazê-los perder sua diferenciação, ao longo do cultivo *in vitro*.

A cultura de células também leva a uma sub-seleção populacional de células, reduzindo a diversidade natural e favorecendo alguns fenótipos em detrimento de outros. Finalmente, os modelos celulares apresentam limitação quanto a experimentos de longo prazo, pois a manutenção dessas condições ainda é limitada (GRUBER; HARTUNG, 2004).

O objetivo, neste capítulo, é apresentar modelos celulares úteis para a prospecção de fármacos. Características fenotípicas

como inibição da proliferação celular; modulação de células da imunidade inata (macrófagos); migração celular; e infecção viral, são apresentadas, trazendo múltiplas possibilidades e limitações. Desta forma, será possível reconhecer diferentes aplicações na prospecção de moléculas biologicamente ativas com a utilização desses testes, a depender do tipo celular ou das condições experimentais escolhidas.

2 MODELOS CELULARES

As principais alternativas ao uso de animais para realizar prospecção de compostos bioativos incluem modelos celulares, bioquímicos, químicos e *in silico*. Apesar dos recentes avanços e crescente interesse em modelos computacionais e bioquímicos, os ensaios fenotípicos, utilizando células, têm posição destacada na identificação de moléculas com atividade biológica que se tornaram fármacos (SWINNEY, 2013). Além disso, estudos *in silico* ou bioquímicos requerem validação fenotípica, e os testes confirmatórios realizados em células é a opção recomendada.

Quando se utiliza cultura primária de células animais, é possível minimizar o número de animais para o estudo. Porém, quando se utilizam linhagens, de qualquer espécie, ou material de origem humana, pode-se substituir completamente o uso de animais para triagem e em boa parte dos estudos pré-clínicos. Uma cultura primária de células pode ser obtida a partir de um órgão (p.ex. baço,

medula óssea, coração, cérebro); tecido sólido (p.ex. pele, tumor, cordão umbilical); ou líquido (p.ex. sangue); ou de lavados (p.ex. peritônio), de seres humanos, ou outros animais. Cada tipo de material requer processamento adequado e os detalhes merecem bastante atenção, para garantir o sucesso do emprego do modelo. Independentemente do método utilizado, uma cultura primária é o primeiro estágio da cultura que poderá ser utilizada em curto período de tempo. Quando desejável, essa cultura pode ser transformada em uma linhagem celular imortalizada (TOVAR; ZERÓN, 2013; UYSAL *et al.*, 2018).

Algumas células em cultura primária podem sofrer alterações no seu padrão de crescimento e apresentar maior capacidade de proliferação. Por um processo chamado de transformação, essas células não entram em senescência e passam a ser consideradas uma cultura celular contínua, que pode ser mantida por várias passagens, mas ainda com número finito. Dentre as mudanças envolvidas no processo de transformação, pode-se destacar a independência de ancoragem e a perda de inibição por contato. Tais alterações tanto ocorrem naturalmente, como podem ser induzidas por agentes químicos ou biológicos (FRESHNEY, 2010).

Considera-se como uma linhagem celular a sub-população de células que adquiriu capacidade de proliferação ilimitada, pelo processo chamado de imortalização, podendo, assim, ser mantida constantemente, por tempo indefinido. É importante pontuar que tal habilidade de proliferação descontrolada já é encontrada em

células advindas de tecidos tumorais (FRESHNEY, 2010; JEDRZEJCZAK-SILICKA, 2017).

Tanto culturas primárias como linhagens celulares podem apresentar modo de crescimento em suspensão no meio ou aderidas à superfície dos frascos usados para cultura. Esse aspecto é determinado pela natureza histológica da célula. Mais recentemente, foram desenvolvidos modelos de cultura tridimensional (3D) que permitem o crescimento de células em agregados.

Dessa forma, os modelos celulares com cultura 3D, e, mais recentemente, os modelos de organoides *in vitro* (mimetizam órgãos), se propõem a mimetizar melhor a estrutura tecidual do que as culturas em monocamada, representando um reconhecido avanço tecnológico dos modelos *in vitro* (DUVAL *et al.*, 2017).

Além de possibilitar evoluções importantes em estudos pré-clínicos, esses modelos abrem a possibilidade de estudo de fenômenos inviáveis em culturas de células clássicas em monocamada (bidimensionais). Devido à complexidade técnica e ao custo mais alto desses modelos, a sua aplicação em programas de prospecção em larga escala ainda é limitada.

A qualidade da cultura de células é essencial para proporcionar resultados confiáveis, assim como reduzir a necessidade de repetições excessivas dos testes; otimizar os custos; e abreviar o tempo para concluir determinadas etapas do estudo. Além de cuidados básicos para manter as culturas livres de contaminação, deve-se conhecer e manter uma rotina, assegurando quesitos espe-

cíficos para as células. As condições ambientais (temperatura, pH e CO₂) e os suprimentos necessários às células (p.ex. nutrientes e fatores de crescimento) devem ser atendidos de forma particular para cada modelo celular.

O meio de cultura é um componente altamente importante, pois fornece os nutrientes, fatores de crescimento e hormônios necessários para o crescimento celular, além de tamponar o pH e oferecer pressão osmótica adequada. A composição química dos meios deve ser padronizada e planejada a partir da observação da composição dos fluidos corporais e da compreensão das necessidades nutricionais das células de interesse. Dependendo do tipo de células empregado no modelo, é preciso selecionar o meio adequado e considerar a adição de componentes que otimizem o crescimento (FRESHNEY, 2010).

Os ensaios apresentados neste capítulo são utilizados na etapa de descoberta de amostras biologicamente ativas com potencial anticâncer, modulador da inflamação, antimetastático, cicatrizante e antiviral. A seleção de substâncias ativas por meio dos testes apresentados, requer confirmação posterior desse potencial em estudos pré-clínicos e clínicos. No Quadro 1, resumem-se algumas características importantes sobre os testes descritos em seguida.

Quadro 1 – Ensaio utilizados para prospecção de moléculas com potencial farmacológico em modelos celulares

Ensaio	Avaliação	Princípio	Tipos Celulares	Vantagens	Desvantagens
MTT	Proliferação e viabilidade celular	Quantificação colorimétrica de células através da medição da atividade de desidrogenases mitocondriais	Células tumorais	<ul style="list-style-type: none"> - Rapidez - Simplicidade - Baixo custo 	<ul style="list-style-type: none"> - Interação de compostos redutores com o MTT pode gerar resultados falsos negativos - Compostos que interferem nas desidrogenases mitocondriais podem causar sub ou superestimação da quantidade de células - Pode apresentar variação entre diferentes linhagens
SRB	Proliferação e viabilidade celular	Quantificação colorimétrica de células através da marcação de proteínas	Células tumorais	<ul style="list-style-type: none"> - Alta sensibilidade - Alta reprodutibilidade - Baixo custo - Rapidez - Permite ponto de parada do experimento 	<ul style="list-style-type: none"> - Inadequado para experimentos com células que crescem em suspensão.
Griess	Ativação de macrófagos	Quantificação colorimétrica da produção de óxido nítrico através da medição de nitrito	Macrófagos	<ul style="list-style-type: none"> - Rapidez - Simplicidade - Baixo custo - Reprodutibilidade 	<ul style="list-style-type: none"> - Medição indireta do óxido nítrico, através da medição do nitrito - Concentrações elevadas de NADPH e de proteínas nas amostras biológicas podem interferir na sensibilidade do ensaio - Contaminação de amostras com nitrito podem inviabilizar a análise dos resultados

Arranhão	Migração celular	Quantificação de migração celular através de fotomicrografias	Células tumorais, queratinócitos	<ul style="list-style-type: none"> - Rapidez - Simplicidade - Acessibilidade - Baixíssimo custo 	<ul style="list-style-type: none"> - Variações dos resultados devido ao procedimento manual para fazer o arranhão - Dificuldade ou impossibilidade em identificar as bordas do arranhão em certos casos
CCK8	Viabilidade de células infectadas com Sars-CoV-2	Quantificação colorimétrica de células através da medição da atividade de desidrogenases mitocondriais	Células que expressam ECA2 ou TMPRSS2	<ul style="list-style-type: none"> - Rapidez - Simplicidade - Baixo custo 	<ul style="list-style-type: none"> - Interação de compostos redutores com o WST-8 gerar resultados falsos negativos - Composto que interfere nas desidrogenases mitocondriais podem causar sub ou superestimação da quantidade de células - Pode apresentar variação entre diferentes linhagens
RT-qPCR	Material genético de Sars-CoV-2	Quantificação do cDNA por biologia molecular	Células que expressam ECA2 ou TMPRSS2	<ul style="list-style-type: none"> - Quantificação do vírus - Permite diagnóstico de Covid-19 - Rapidez - Sensibilidade - Especificidade 	<ul style="list-style-type: none"> - Resultados falso-negativos em cepas que sofreram mutação - Requer capacitação em biologia molecular

Legenda: MTT, [3-(4,5-dimetiltiazol-2il) -2,5-difenil brometo de tetrazolina]; SRB, Sulforrodamina B; CCK8, Cell Counting Kit 8; ECA2, Enzima Conversora de Angiotensina II; TMPRSS2, serina protease transmembranar 2.

Fonte: Elaborado pelos autores.

2.1 Ensaios e Modelos Celulares para Avaliação do Efeito Antiproliferativo em Células Tumorais

A proliferação celular resulta, em última instância, da duplicação do material genético, seguida da divisão celular originando duas

células-filhas. Esse fenômeno compõe o ciclo celular e é responsável pelo crescimento dos organismos, bem como é uma das formas pela qual ocorrem o reparo de lesões e a manutenção homeostática de organismos multicelulares (ALBERTS, 2017). Ensaios para avaliar a capacidade de uma amostra, seja extrato, fração ou molécula isolada; a diminuição da proliferação de células; ou a indução de morte celular, são muito úteis para programas de prospecção de novas moléculas bioativas com potencial anticâncer.

Dentre os métodos *in vitro* desenvolvidos para realizar a triagem e a avaliação de citotoxicidade de compostos ou fármacos com potencial terapêutico, destacam-se aqueles que se utilizam de cultura de células tumorais do tipo histológico de interesse. Os métodos do MTT e SRB, apresentados a seguir como exemplos para estudo de viabilidade, proliferação ou ativação celular, são extensamente utilizados em programas de prospecção de moléculas com potencial anticâncer.

2.1.1 Ensaio do MTT

O ensaio do MTT é um método colorimétrico que permite a quantificação indireta de células viáveis por meio da avaliação da atividade de desidrogenases (DH) mitocondriais. As DH catalisam reações que geram coenzimas envolvidas na redução do sal [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina] (MTT), um composto de coloração amarela; a formazan, um metabólito de coloração púrpura, cuja absorbância (máxima em torno de 570nm)

pode ser mensurada em espectrofotômetro. Esse método pode ser utilizado para medir viabilidade celular, proliferação ou ativação celular (MOSMANN, 1983; FEUERSTEIN *et al.*, 2009).

As principais vantagens desse ensaio colorimétrico são: rapidez, simplicidade e precisão (VAN MEERLOO; KASPERS; CLOOS, 2011). Contudo, outros compostos doadores de elétrons podem reduzir o MTT ou interferir na atividade das DH, levando a uma sub ou superestimação do efeito (JASZCZYSZYN; GASIOROWSKI, 2008).

2.1.2 Ensaio do SRB

O ensaio da sulforrodamina B (SRB) foi desenvolvido em 1990 por Skehan *et al.*, e, desde então, tem sido amplamente utilizado com o intuito de verificar o efeito antiproliferativo em programas de prospecção. O princípio desse método consiste na propriedade do SRB, uma aminoxantina de cor rosa brilhante, em se ligar às porções terminais das proteínas básicas das células fixadas em condições levemente ácidas e ser posteriormente solubilizada em condições básicas. Dessa forma, o corante SRB é usado como um indicador quantitativo do conteúdo proteico da cultura celular; conteúdo esse linearmente proporcional à quantidade de células.

Assim, um aumento ou diminuição do número de células resulta em alteração proporcional da quantidade do corante incorporado nas células em cultura, o que indica o grau de toxicidade causada pelo composto em estudo em que as células foram incubadas (SKEHAN *et al.*, 1990).

Esse método é vantajoso por ser de baixo custo e alta sensibilidade. O ensaio do SRB possui um tempo flexível, devido à fixação das células possibilitar a parada do protocolo, e não é dependente do metabolismo celular; por isso, um teste preciso e confiável. Ademais, possui uma menor variação entre diferentes linhagens celulares e não produz resíduos tóxicos (MENYHÁRT *et al.*, 2016).

2.1.3 Condições experimentais

As propriedades de uma cultura de células variam significativamente entre a fase de adaptação após repique (fase *lag*), o período de crescimento exponencial (fase logarítmica, ou *log*) e a fase estacionária (fase de platô). Além disso, para planejar ensaios que se baseiam na proliferação celular, é necessário conhecer a linhagem celular ou o painel de linhagens que mais se adéqua ao estudo em questão e seus respectivos parâmetros cinéticos, como tempo de duplicação e tempo de ciclo celular (FRESHNEY, 2010).

As condições experimentais também podem ser otimizadas com relação à natureza das amostras a serem avaliadas quanto à atividade antiproliferativa. A solubilidade e a estabilidade em meio aquoso podem influenciar no tempo de incubação para observação do efeito. Associado a isso, a concentração a ser utilizada nos estudos sobre o mecanismo de ação também precisa ser devidamente identificada.

Desse modo, em um momento inicial, recomenda-se realizar triagens com tempos de incubação que permitam algumas divisões

celulares e a identificação de alterações na proliferação. Essa escolha evita falsos negativos, uma vez que, a depender do mecanismo, as alterações celulares sofridas não alteram a contagem total de células significativamente. Nos estudos subsequentes, outros tempos de incubação podem ser avaliados de acordo com os resultados obtidos, podendo ser necessário diminuir ou aumentar esse período de acordo com o objetivo.

As condições do experimento também possibilitam inferir se o efeito de uma substância-teste antiproliferativa é citotóxico ou citostático, em dada concentração. De modo geral, o efeito citostático é observado quando a substância inibe o crescimento ou a reprodução das células, impedindo então que elas se proliferem. Enquanto o efeito citotóxico ocorre quando a substância causa danos às células que resultam em morte celular (VICHAI; KIRTIKARRA, 2006).

2.1.4 Possibilidades de estudos adicionais in vitro em moléculas promissoras e limitações

Substâncias promissoras, que foram previamente selecionadas com base na sua atividade antiproliferativa, podem ser submetidas a outros testes, para investigar o seu mecanismo de ação que impede a proliferação ou como provoca a morte celular. Assim, métodos que verifiquem aspectos fenotípicos das células relacionados a mudanças na morfologia, integridade da membrana plasmática, distribuição nas fases do ciclo celular, fragmentação do

DNA e outros eventos específicos de processos de morte celular, são comumente empregados para entender os efeitos das moléculas sobre as células. Nesses estudos sobre o mecanismo de ação, podem ser utilizadas as células em si, intactas, ou frações subcelulares (proteínas ou ácidos nucleicos) extraídos da cultura após incubação com a substância-teste (GALLUZZI *et al.*, 2009).

A indução de morte celular regulada é adequada para substâncias citotóxicas com potencial anticâncer. Ensaios utilizados em triagem, como MTT e SRB, não trazem informações detalhadas sobre alvo celular e mecanismo das substâncias ativas. As alterações morfológicas permitem a distinção entre eventos de morte regulados ou acidentais. Porém o estudo do tipo exato de morte celular pode ser desafiador, uma vez que recentemente foram propostos 12 tipos diferentes de morte celular regulada. Dessa forma, a avaliação de alterações fisiológicas e de marcadores bioquímicos é necessária para identificação precisa do tipo de morte (GALLUZZI *et al.*, 2018).

2.2 Ensaios e Modelos Celulares para Avaliação da Modulação da Resposta de Macrófagos

Os macrófagos (MΦs) são células da imunidade inata que podem desempenhar múltiplas funções. Os MΦs não estimulados, residentes de tecidos em homeostase, são chamados de MΦs naive ou M0 e atuam, sobretudo, na fagocitose de células apoptóticas e restos celulares. Porém, diversos estímulos podem ativar os MΦs

e conferir-lhes uma gama de funções na inflamação e regeneração tecidual. Tais estímulos podem ser endógenos ou exógenos e são certificados por receptores de reconhecimento de padrão (PRRs, do inglês *Pattern Recognition Receptors*) (MOSSER; EDWARDS, 2008; BISWAS; MANTOVANI, 2014).

O espectro de ativação dos MΦs é amplo e, do ponto de vista fenotípico, pode-se classificar essas células em dois grandes grupos: (i) os MΦs M1, que exibem funções pró-inflamatórias, imunestimulantes, antimicrobianas e antitumorais, cujos marcadores incluem: óxido nítrico (NO); citocinas pró-inflamatórias; e marcadores de superfície como moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e co-estimulatórias; e (ii) os MΦs com fenótipo semelhante a M2 com funções anti-inflamatórias, imunorreguladoras, envolvidos em diferentes etapas da cicatrização.

Os marcadores M2 incluem moléculas de superfície, citocinas anti-inflamatórias e algumas metaloproteases que degradam matriz extracelular (BISWAS; MANTOVANI, 2014) Assim, a depender das condições experimentais, os resultados podem sugerir o potencial imunestimulante/pró-inflamatório ou imunoregulador/anti-inflamatório.

Tanto culturas primárias como linhagens de MΦs humanos e murinos podem ser utilizadas nos ensaios de prospecção de compostos moduladores da ativação de MΦs. As culturas primárias de MΦs devem ser utilizadas em pouco tempo e não são convenientes para expansão (SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1994). As cé-

lulas J774 são uma linhagem de MΦs imortalizados, oriundos de camundongos BALB/c.

As células dessa linhagem têm sido utilizadas para ensaios de fagocitose (LEMAIRE *et al.*, 2014), ensaios envolvendo produção de óxido nítrico (VITRAL *et al.*, 2008) e produção de interleucina-1 (IL-1) (HOGQUIST *et al.*, 1991). A linhagem RAW264.7, isolada de camundongos C57BL/6 infectados com o vírus da leucemia murina de Abelson, é um modelo de células imortalizadas muito usado para estudar a polarização de MΦs (TACIAK *et al.*, 2018).

Valendo-se da produção de NO por MΦs M1, a dosagem de nitrito através da reação de Griess pode ser utilizada para avaliar tanto o efeito pró como anti-inflamatório, a depender das condições experimentais. O ensaio de Griess é um teste que pode ser utilizado na prospecção de moléculas moduladoras da ativação de MΦs (GREEN *et al.*, 1982).

2.2.1 Ensaio de Griess

Entre as vantagens do teste de Griess, destacam-se sua rapidez; seu baixo custo; e a disponibilidade de aquisição de *kits* prontos para uso. O teste de Griess, entretanto, possui desvantagens, entre as quais o fato de ser um teste indireto, que mensura apenas concentrações de NO_2^- , em vez de detectar o próprio NO. Além disso, concentrações elevadas de NADPH e de proteínas, nas amostras biológicas, podem interferir na reação de Griess, limitando a sensibilidade do ensaio. Finalmente, a contaminação com NO_2^- exógeno

deve ser evitada, a fim de não comprometer os resultados experimentais (SUN *et al.*, 2003; HETRICK; SCHOENFISCH, 2009).

2.2.2 Condições experimentais

A avaliação do potencial pró-inflamatório é realizada expondo os MΦs naive às substâncias teste. Quando o objetivo for avaliar a reprogramação de MΦs M2, ou TAMs, para fenótipo M1, deve-se primeiro polarizar as células para fenótipo M2-like, por meio da incubação com IL-4, apenas ou associada a IL-13 e, posteriormente, tratá-las com os compostos em estudo para observar se houve ou não a reprogramação do fenótipo desses macrófagos.

O potencial anti-inflamatório em modelo de MΦs pode ser avaliado pela exposição da amostra teste com um PAMP indutor de ativação para M1. A diminuição de mediadores inflamatórios, em relação a um grupo tratado apenas com o PAMP, sugere efeito anti-inflamatório.

2.2.3 Possibilidades de estudos adicionais *in vitro* em moléculas promissoras e limitações

Após a seleção de compostos de interesse, realizam-se ensaios *in vitro* adicionais para melhor caracterizar o efeito e o mecanismo de ação. Para tanto, são necessários ensaios adicionais, para caracterização fenotípica, bem como receptores e vias de sinalização envolvidos.

Finalmente, apesar da versatilidade dessas células e importância no processo inflamatório e na resposta imune, esses fenômenos são complexos e envolvem múltiplos tipos celulares. Dessa forma, o potencial farmacológico de compostos selecionados *in vitro*, com a utilização de MΦs, requer comprovação em modelos *in vivo*. Além disso os MΦs não são adequados para estudo de certos fenômenos inflamatórios e imunológicos, bem como prospecção de compostos, em que essas células não participam como, p.ex., alergia, doenças autoimunes e infecções por helmintos. Portanto, uma investigação do potencial modulador da inflamação pode requerer outros tipos celulares, de acordo com o interesse do grupo de pesquisa.

2.3 Modelos Celulares de Avaliação da Migração Celular

A migração celular é uma característica encontrada em células mesenquimais, enquanto as células epiteliais encontram-se ligadas umas às outras por moléculas de adesão intercelular. Células epiteliais e mesenquimais podem se transformar uma na outra devido aos fenômenos chamados de transição epitelial para mesenquimal (TEM) e transição mesenquimal para epitelial (TME). Ambos os fenômenos são importantes em processos fisiológicos e fisiopatológicos e são necessários para o desenvolvimento embrionário e a manutenção da homeostase, participando essencialmente do processo da cicatrização tecidual.

A TEM está envolvida no câncer e na fibrose. No câncer, células tumorais adquirem capacidade metastática e migram para

outros tecidos. Na fibrose e em certas cicatrizes, as células mioepiteliais, transformadas a partir de células epiteliais, produzem quantidades excessivas de matriz extracelular devido à inexistência de apoptose ou retorno ao fenótipo epitelial através da TME (STONE et a., 2016). Assim, a prospecção de moléculas com potencial anti-metastático ou cicatrizante pode ser realizada utilizando-se modelos celulares.

Além da interferência na proliferação celular, a migração e a invasão celular também são fenótipos importantes para a investigação de candidatos a quimioterápicos antitumorais mais efetivos (ECCLES; BOX; COURT, 2005). Apesar de muitas informações sobre a progressão tumoral serem obtidas por ensaios em animais, os modelos *in vitro* possibilitam o entendimento de mecanismos moleculares envolvidos na transição de fenótipo de invasividade de células tumorais. Por consequência, os ensaios de prospecção de novas substâncias que inibem o crescimento e a migração tumoral se tornam mais acessíveis, rápidos e eficazes (BREKHMANN; NEUFELD, 2009).

Na prospecção de moléculas envolvidas na cicatrização, também é possível utilizar modelos celulares. Os protocolos experimentais de cicatrização *in vitro* fornecem respostas rápidas e permitem a aplicação de diferentes concentrações de substâncias (GOTTRUP; ÅGREN; KARLSMARK, 2000). Além disso, os ensaios permitem a avaliação direta de alterações causadas por uma nova substância em um tipo celular sem a influência de outros compo-

nentes do tecido nessa resposta. Portanto, a cultura de células isoladas auxilia na compreensão de mecanismos de quimiotaxia, ligação celular estimulada por fatores de crescimento e citocinas, além da indução de genes essenciais para a coordenação de respostas (LODHI; VADNERE, 2017). Com a avaliação da migração celular, no ensaio do arranhão, é possível identificar compostos com potencial antimetastático, quando inibirem a migração de células tumorais, ou cicatrizante, quando estimular a migração de células epiteliais.

2.3.1 Ensaio do arranhão

O ensaio do arranhão, também conhecido como ensaio cicatrização *in vitro*, consiste na interrupção da continuidade de uma monocamada celular confluenta, seguida da exposição da cultura às amostras-teste e na avaliação do efeito na migração de células a partir das bordas do arranhão (LIANG; PARK; GUAN, 2007).

As células tumorais utilizadas em modelos de prospecção de compostos inibidores da migração devem, preferencialmente, ter fenótipo mesenquimal; migrar e não apresentar boa adesão intercelular. Nesse sentido objetiva-se identificar amostras que inibem a migração de células tumorais. As células mais investigadas na cicatrização de feridas são os fibroblastos, queratinócitos, macrófagos e células endoteliais ou epidérmicas, decorrente das intensas sinalizações e atividade proliferativa relacionadas a essas células (KRISHNAN, 2006).

Para estudos de cicatrização, o ensaio do arranhão, utilizando células epiteliais, objetiva identificar moléculas que induzam a migração dessas células, direta ou indiretamente, pela modulação da função de macrófagos e fibroblastos. Para avaliar a migração e isolar a atividade de proliferação celular, é possível pré-tratar as células com um agente antimitótico (JOSAKI *et al.*, 1990).

O ensaio do arranhão possui limitações, como a natureza manual e subjetiva da quantificação da área aberta. Para uma quantificação e análise de imagem mais consistente e eficiente, é recomendada a análise das imagens com um programa de computador. O programa T-scratch é de uso gratuito, e foi criado especificamente para análises de imagens desse ensaio (GEBACK *et al.*, 2009).

A exclusão de importantes fatores sistêmicos e mecânicos da cicatrização, nesses ensaios, é outra desvantagem (WEIREB; NEMCOVSKY, 2015). Por esse motivo, esses resultados não são suficientes para a resposta no reparo de feridas (LODHI; VADNERE, 2017). Por outro lado, os modelos em animais também não refletem as anormalidades identificadas em humanos, assim, os sistemas *in vitro* auxiliam na investigação da mobilidade celular em variados níveis de complexidade (MONSUUR *et al.*, 2016). Ademais, estudos *in vivo* de invasão de células tumorais também são limitados pelo complexo microambiente, variabilidades inerentes aos animais e altos custos (BREKHMANN; NEUFELD, 2009).

A migração celular também pode ser avaliada por outras técnicas, como a câmara de Boyden (ZAKI *et al.*, 2019). O ensaio é

bastante simples, barato e comum, e avalia a resposta quimiotática celular perante um estímulo (KRAMER *et al.*, 2013). Como alternativa aos modelos em animais, os modelos computacionais *in silico* trazem a teoria de projeções para substitutos de tecidos e suporte celular, como *scaffolds*, que podem auxiliar no processo de reparo. No entanto, essas informações precisam ser confirmadas por modelos biológicos *in vitro* ou *in vivo* que representem o crescimento celular nas etapas da cicatrização (SAMI; HEIBA; ABDELLATIF, 2019).

2.4 Modelos Celulares para Avaliação do Efeito Anti-Sars-CoV-2

O Sars-CoV-2 é o agente etiológico da doença Covid-19 caracterizada pela síndrome respiratória aguda grave. Causador da mais recente pandemia de Covid-19, já infectou mais de 500 milhões de pessoas e levou a óbito mais de 6 milhões, em todo o mundo. Os coronavírus (CoVs) são membros do gênero *Coronaviridae*, um grupo pleomórfico de vírus de RNA, que contêm algumas proteínas do envelope viral na forma de coroa (MURALIDAR *et al.*, 2020; OMS, 2020).

Atualmente, vários ensaios clínicos estão em andamento para prevenir ou intervir na progressão da doença. Paralelamente, pesquisas básicas com o Sars-CoV-2 são importantes para permitir o desenvolvimento de agentes terapêuticos. Igualmente, os modelos celulares são essenciais para entender o ciclo viral, amplificar e isolar o vírus para pesquisas futuras e para avaliação pré-clínica de moléculas terapêuticas (TAKAYAMA, 2020).

Em humanos, as células epiteliais das vias respiratórias expressam níveis elevados da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) e da serinoprotease transmembranar 2 (TMPRSS2), duas proteínas utilizadas pelo Sars-CoV-2 como receptores para entrar nas células hospedeiras (TAKAYAMA, 2020). Experimentos de infecção por Sars-CoV-2 usando cultura primária de células epiteliais das vias aéreas humanas mostraram ter efeitos citopáticos 96 horas após a infecção (MA *et al.*, 2020).

No entanto, a cultura primária de células epiteliais das vias aéreas humanas tem como desvantagem o fato de serem caras e possuírem potencial proliferativo limitado. Entre as linhagens mais utilizadas para estudar antivirais contra Sars-CoV-2, as células Vero e os clones Vero E6 e Vero E6 com superexpressão de TMPRSS2 são os mais amplamente utilizados (ZHOU *et al.*, 2020). Essas últimas são particularmente convenientes por expressar, respectivamente, altos níveis de ECA2 e TMPRSS2 no domínio apical da membrana.

2.4.1 Ensaio do CCK-8

O teste mais utilizado para avaliação do efeito antiviral de moléculas baseia-se na determinação de células viáveis, por meio da conversão de um sal de tetrazólio em formazan. O Cell Counting Kit-8 (CCK-8) é um ensaio colorimétrico que utiliza o sal tetrazólio WST-8 para determinação do número de células viáveis em ensaios de proliferação celular e citotoxicidade. Semelhante ao MTT,

apresentado no item 2.1.1 deste capítulo, o WST-8 é um composto de coloração amarela que, após ser reduzido pelas desidrogenases celulares, origina o formazan, de coloração púrpura. A concentração do formazan gerado pela atividade das desidrogenases é diretamente proporcional ao número de células viáveis (DOJINDO, 2010). Entre as vantagens do método, pode-se considerar a ausência de citotoxicidade do WST-8, além da relativa simplicidade e rapidez do teste. As desvantagens do ensaio do CCK-8 são equivalentes às do MTT, sendo que este último também pode ser utilizado como alternativa ao CCK-8.

2.4.2 Quantificação do RNA viral por RT-qPCR

A reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real quantitativa (RT-qPCR) é um método de detecção e quantificação de fragmentos de DNA gerados a cada ciclo de amplificação, os quais são proporcionais à quantidade de molde disponível no início do processo de PCR. Diferente da PCR quantitativa (qPCR), a RT-qPCR possui uma etapa adicional que consiste na transcrição reversa de moléculas de RNA de uma amostra em DNA complementar (cDNA) por meio da enzima transcriptase reversa. A partir das moléculas de cDNA, é realizada a qPCR (ZAHA, 2014). Para fins de pesquisa e diagnóstico molecular da Covid-19, o método de RT-qPCR tornou-se um dos mais confiáveis e utilizados em todo o mundo (BUSTIN; NOLAN, 2020).

Entre as vantagens do método, estão a rápida detecção, alta sensibilidade e especificidade. Entretanto, o método também possui algumas desvantagens, como a ocorrência de resultados falso negativos decorrentes de mutações nas regiões do *primer* e da sonda no genoma Sars-CoV-2, que, por sua vez, estão relacionadas à rápida evolução do Sars-CoV-2. Além disso, a técnica requer considerável habilidade técnica, durante os procedimentos de coleta e manipulação da amostra (TAHAMTAN; ARDEBILI, 2020).

2.4.3 Possibilidades de estudos adicionais *in vitro* em moléculas promissoras e limitações

Estudos adicionais *in vitro* para prospecção de biomoléculas com potencial atividade contra o novo coronavírus, podem utilizar modelos mais complexos do que a cultura de células em monocamada, denominados organoides. Os organoides são estruturas biológicas formadas por vários tipos celulares e que reproduzem determinadas condições fisiológicas dos órgãos humanos. Como essas estruturas têm a capacidade de se auto-replicar, também são modelos adequados para triagem em larga escala na descoberta de drogas e pesquisa de doenças (RANGA *et al.*, 2014).

Além do dano pulmonar causado pela pneumonia, o Sars-CoV-2 afeta vários órgãos, como o rim (LI *et al.*, 2020), o fígado (FAN *et al.*, 2020) e o sistema cardiovascular (ZHENG *et al.*, 2020). Nesse sentido, organoides mimetizando cada um dos órgãos afe-

tados pelo vírus permitiria a triagem de compostos com potencial de combater a Covid-19. Entretanto, embora os organoides possam reproduzir a patologia de Covid-19 em tecidos específicos, nos quais são modelados, eles não podem reproduzir os sintomas sistêmicos associados às respostas de todo o corpo à infecção viral (TAKAYAMA, 2020).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os modelos experimentais de cultura de células oferecem inúmeras alternativas validadas para pesquisa, em diferentes áreas básicas e aplicadas. Neste capítulo, tratou-se da prospecção de moléculas com potencial farmacológico e apresentamos alguns exemplos. O planejamento experimental cuidadoso aumenta a expectativa de translação dos resultados. Isso significa capacidade ampliada de identificação de moléculas promissoras, nas etapas de descoberta e início dos estudos pré-clínicos *in vitro*. Para isso, devem ser considerados o fenótipo de interesse; a escolha de modelos celulares e de condições experimentais; bem como de ferramentas utilizadas e análise dos dados, com atenção às suas vantagens e limitações, para que as conclusões do estudo permitam apontar assertivamente o potencial das amostras estudadas.

Finalmente, no caminho da descoberta e do desenvolvimento de substâncias com atividade biológica identificada em experimentos com culturas de células, surgirá, em algum momento, a necessidade de validação dessa atividade em modelos animais.

Os modelos celulares destacam-se por permitir a substituição e a redução do uso de animais nessa trajetória. Além disso, o avanço do conhecimento celular e molecular da fisiopatologia de doenças de biologia complexas, como o câncer, podem ser aplicados de forma a trazer novos aspectos investigados por modelos celulares já existentes, bem como permitir a criação de novos modelos *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- BISWAS, S.; MANTOVANI, A. *Macrophages: biology and role in the pathology of diseases*. New York: Springer: London: Heidelberg Dordrecht, 2014.
- BREKHMANN, V.; NEUFELD, G. A novel asymmetric 3D in-vitro assay for the study of tumor cell invasion. *BMC cancer*, v. 9, n. 1, 2009.
- BUSTIN, S. A.; NOLAN, T. RT-qPCR Testing of Sars-CoV-2: a Primer. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 8, 2020.
- DOJINDO. Cell Counting Kit-8, *Technical Manual*, 2010.
- DOKE, S K.; DHAWALE, S. C. Alternatives to animal testing: a review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 23, n. 3, p. 223-229, 2015.
- DUVAL, K. *et al.* Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology*, v. 32, n. 4, p. 266-277, 2017.
- ECCLES, S. A.; BOX, C.; COURT, W. Cell migration/invasion assays and their application in cancer drug discovery. *Biotechnology annual review*, v. 11, p. 391-421, 2005.
- FAN, Z. *et al.* Clinical features of covid-19-related liver functional abnormality. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, v. 18, n. 7, p. 1561-1566, 2020.
- FEUERSTEIN, T.; SCHAUDER, A.; MALIK, Z. Silencing of ALA dehydratase affects ALA-photodynamic therapy efficacy in K562 erythroleukemic cells. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v. 8, n. 10, p. 1461-1466, 2009.
- FRESHNEY, R. Ian. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. [S. l.]: John Wiley & Sons, 2015.

GALLUZZI, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of nomenclature committee on cell death 2018. *Cell Death and Differentiation*, v. 25, p. 486-541, 2018.

GALLUZZI, L. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death and differentiation*, v. 16, p. 1093-1107, 2009.

GEBÄCK, T. *et al.* TScratch: A novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. Short Technical Reports. *Biotechniques*, v. 46, n. 4, p. 265-274, 2009.

GOTTRUP, F.; ÅGREN, M. S.; KARLSMARK, T. Models for use in wound healing research: A survey focusing on *in vitro* and *in vivo* adult soft tissue. *Wound Repair and Regeneration*, v. 8, n. 2, p. 83-96, 2000.

GREEN, L. C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GRUBER, F. P.; HARTUNG, T. Alternatives to animal experimentation in basic research. *Altex*, v. 21, p. 3-31, 2004.

HARRISON, R. G. *et al.* Observations of the living developing nerve fiber. *The Anatomical Record*, v. 1, n. 5, p. 116-128, 1 jun. 1907.

HARRISON, R. G. The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. *Journal of Experimental Zoology*, v. 9, n. 4, p. 787-846, dez. 1910. 1910?

HETRICK, E. M.; SCHOENFISCH, Mark H. Analytical chemistry of nitric oxide. *Annual Review of Analytical Chemistry*, v. 2, p. 409-433, 2009.

HOGQUIST, K. A. *et al.* Interleukin 1 is processed and released during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 88, n. 19, p. 8485-8489, 1991.

JASZCZYSZYN, A.; GAŚSIOROWSKI, K. Limitations of the MTT assay in cell viability testing. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, v. 17, n. 5, p. 525-529, 2008.

JEDRZEJCZAK-SILICKA, M. History of cell culture. *In: New Insights into Cell Culture Technology*. InTech, p. 1-42, 2017. É periódico ou livro?

- JOSAKI, K. *et al.* Pentoxifylline-induced modulation of human leukocyte function in vitro. *The American Journal of Pathology*, v. 136, n. 3, p. 623, 1990.
- KRAMER, N. *et al.* In vitro cell migration and invasion assays. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, v. 752, n. 1, p. 10-24, 2013.
- KIM, T.-W.; CHE, J.-H.; YUN, J.-W. Use of stem cells as alternative methods to animal experimentation in predictive toxicology. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 105, p. 15-29, 2019.
- KRISHNAN, P. The scientific study of herbal wound healing therapies: current state of play. *Current Anaesthesia & Critical Care*, v. 17, n. 1-2, p. 21-27, 2006.
- LEMAIRE, S. *et al.* Study of macrophage functions in murine J774 cells and human activated THP-1 cells exposed to oritavancin, a lipoglycopeptide with high cellular accumulation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 58, n. 4, p. 2059-2066, 2014.
- LI, Z. Caution on kidney dysfunctions of covid-19 patients. *SSRN Electronic Journal*, p. 1-25, 2020.
- LIANG, Chun-Chi; PARK, Ann Y.; GUAN, Jun-Lin. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols*, v. 2, n. 2, p. 329, 2007.
- LODHI, S.; VADNERE, G. P. Relevance and perspectives of experimental wound models in wound healing research. *Asian J Pharm Clin Res*, v. 10, n. 7, p. 57-62, 2017.
- MA, X. *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*, p. 1-7, 2020.
- MENYHÁRT, O. *et al.* Guidelines for the selection of functional assays to evaluate the hallmarks of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, v. 1866, n. 2, p. 300-319, 2016.
- MONSUUR, H. N. *et al.* Methods to study differences in cell mobility during skin wound healing in vitro. *Journal of Biomechanics*, v. 49, n. 8, p. 1381-1387, 2016.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOSSER, D M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, v. 8, n. 12, p. 958-969, 2008.

MURALIDAR, S. *et al.* The emergence of covid-19 as a global pandemic: Understanding the epidemiology, immune response and potential therapeutic targets of Sars-CoV-2. *Biochimie*, 2020.

OMAR ZAKI, S S *et al.* The influence of serum-supplemented culture media in a transwell migration assay. *Cell Biology International*, v. 43, n. 10, p. 1.201-1.204, 2019.

RANGA, A.; GJOREVSKI, N.; LUTOLF, M. P. Drug discovery through stem cell-based organoid models. *Advanced Drug Delivery Reviews*, p. 69-70, 2020.

RUSSELL, W. M. Stratton; BURCH, Rex Leonard. The principles of humane experimental technique. *Medical Journal of Australia*, v. 1, n. 13, p. 500, 1959.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 179, n. 4, p. 1109-1118, 1994.

SAMI, D. G.; HEIBA, H H.; ABDELLATIF, A. Wound healing models: a systematic review of animal and non-animal models. *Wound Medicine*, v. 24, n. 1, p. 8-17, 2019.

SKEHAN, P. *et al.* New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, v. 82, n. 13, p. 1.107-1.112, 1990.

STONE, R. C. Epithelial-mesenchymal transition in tissue repair and fibrosis. *Cell Tissue Research*, v. 365, n. 3, p. 495-506, 2016. DOI 10.1007/s00441-016-2464-0.

SUN, J. *et al.* Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. *Sensors*, v. 3, n. 8, p. 276-284, 2003.

SWINNEY, D. C. Phenotypic vs. target-based drug discovery for first-in-class medicines. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 93, n. 4, p. 299-301, 2013.

TACIAK, B. *et al.* Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. *PLoS One*, v. 13, n. 6, 2018.

TAHAMTAN, A.; ARDEBILI, A. Real-time RT-PCR in covid-19 detection: Issues affecting the results. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, v. 20, n. 5, p. 453-454, 2020.

TAKAYAMA, K. In vitro and animal models for Sars-CoV-2 research. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 41, n. 8, p. 513-517, 2020.

TAYLOR, M. W. A history of cell culture. *In: TAYLOR, M. W. Viruses and Man: a history of interactions*. Cham: Springer International Publishing, 2014. p. 41-52, 2014.

TOVAR, C. L.; ZERÓN, H. M. Cell culture models and pharmacological perspective for the study of breast cancer markers. *EJIFCC*, v. 24, n. 2, 2013.

UYSAL, O. *et al.* Cell and tissue culture: the base of biotechnology. *In: BARH, D.; AZEVEDO, V. (ed.). Omics Technologies and Bio-Engineering*. [S. l.]: Academic Press, 2018. p. 391-429.

VAN MEERLOO, J; KASPERS, G. J. L.; CLOOS, Jacqueline. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Cancer cell culture. Humana Press*, p. 237-245, 2011.

VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, v. 1, n. 3, p. 1.112-1.116, 2006.

ZAHA, A. *Biologia molecular básica*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

ZHENG, Y. Y. *et al.* *Nature Reviews Cardiology*, v. 17, n. 5, p. 259-260, 2020.

ZHOU, P. *et al.* pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, v. 579, March, 2020.

CAPÍTULO 14 <doi>10.51996/9788574853994.cap14</doi>

EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL NA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ: PERCEPÇÃO DE PROFESSORES E ESTUDANTES DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Ana Biatriz Sousa Alcântara¹

Erika Freitas Mota²

Resumo: Animais têm sido historicamente utilizados como modelos experimentais, o que permitiu grandes descobertas científicas em diferentes áreas de pesquisa. No entanto, os debates relativos à ética animal foram crescendo com o passar dos anos e levaram à elaboração e promulgação da Lei Arouca no Brasil (nº 11.794/2008). Este capítulo tem por objetivo relatar a percepção dos docentes e discentes do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Ceará quanto à Lei Arouca após dez anos de vigência, bem como verificar a opinião deles quanto à experimentação animal. Para tanto, foram observados todos os aspectos éticos das Resoluções do CNS 466/2012 e 510/2016 e foram elaborados e aplicados questionários semiestruturados para professores e estudantes em 2018. As respostas foram analisadas e

1 Graduada em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Ceará (UFC), Campus do Pici, Fortaleza, Ceará, Brasil.

2 Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), Campus do Pici, Fortaleza, Ceará, Brasil. E-mail para correspondência: erika.mota@ufc.br

serviram como base para a redação de um trabalho de conclusão do curso no qual foram feitas considerações e um recorte desses dados para o presente capítulo.

Palavras-Chave: Experimentação Animal. Lei Arouca. Modelos Animais.

ANIMAL EXPERIMENTATION AT FEDERAL UNIVERSITY OF CEARA: THE PERCEPTION OF PROFESSORS AND STUDENTS OF BIOLOGICAL SCIENCES COURSE

Abstract: Animals have been used historically as experimental models, which allowed for significant scientific discoveries in different research areas. However, debates regarding animal ethics have grown over the years and led to the drafting and promulgation of the Arouca Law in Brazil (nº 11,794 / 2008). This chapter aims to report the perception of professors and students of the Biological Sciences course at Universidade Federal do Ceará regarding the Arouca Law after ten years of being valid and verify their opinion regarding animal experimentation. All ethical aspects of CNS Resolutions 466/2012 and 510/2016 were observed, and semi-structured questionnaires for teachers and students were prepared and applied in 2018. The responses were analyzed and used in the undergraduate dissertation as well as for the present chapter.

Keywords: Animal Experimentation. Arouca Law. Animal Models.

1 INTRODUÇÃO

Modelos experimentais são de extrema importância para a pesquisa científica, pois atuam como meios simples de representação da realidade, além de permitir a compreensão de fenômenos naturais (FERREIRA; HOCHMAN; BARBOSA, 2005). Na área de ciências biológicas, os modelos experimentais atuam como principais instrumentos para testar hipóteses e aprimorar conhecimentos, tanto em áreas voltadas ao meio ambiente, como zoologia e ecologia, quanto áreas mais voltadas à saúde (WATANABE; FONSECA; VATTIMO, 2014), como fisiologia humana e farmacologia.

Na pesquisa científica, diversos tipos de modelos experimentais são utilizados. Modelos *in vitro* consistem no uso de células e tecidos, enquanto os modelos *in vivo* utilizam animais de laboratório. Há, ainda, os modelos anatômicos, que utilizam cadáveres (FERREIRA; HOCHMAN; BARBOSA, 2005).

Concomitantemente ao seu uso na pesquisa científica, os animais também são utilizados para fins didáticos, em alguns cursos de Ciências Biológicas e da área da Saúde, em diversas instituições de nível superior. São empregados em aulas práticas, ou demonstrativas, animais vivos, cadáveres, órgãos e tecidos, para fins de transmitir conhecimento; demonstrar processos dinâmicos da vida; ou desenvolver e treinar habilidades manuais e técnicas, conforme o objetivo que se pretende alcançar (FIN; RIGATTO, 2010).

No entanto, a questão ética gera muitas controvérsias, em diversos âmbitos da sociedade e da comunidade científica. Ao mes-

mo tempo em que é defendida pela Ciência, a experimentação animal é considerada prática abominável por grupos de defesa dos direitos animais, o que aumenta os debates em torno do uso de modelos animais *in vivo* (VICENTE; COSTA, 2014).

Com base nas problemáticas ética e moral, em torno da experimentação animal, foi sancionada, no Brasil, a Lei 11.794/2008, que regulamenta os procedimentos para o uso de animais para fins científicos. Assim, foi criado o Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (Concea), e as Comissões de Ética no Uso de Animais (Ceua) tornaram-se obrigatórias, em instituições com atividades ligadas à pesquisa ou ao ensino. Essas medidas foram tomadas com o objetivo de garantir o cuidado adequado e o manejo ético dos animais com fins científicos e didáticos (WATANABE; FONSECA; VATTIMO, 2014).

No *site* do Repositório Institucional da Universidade Federal do Ceará (UFC), verificou-se um número crescente de trabalhos publicados a partir dos anos 2000 que utilizam animais como modelos, principalmente em estudos sobre inflamação, estresse oxidativo e depressão. Considerando o que foi citado anteriormente e somando a produção acadêmica que envolve a experimentação animal cada vez mais acentuada, na instituição, desenvolveu-se, em 2018, uma pesquisa, cujos objetivos foram:

- a. Compreender a opinião de docentes e discentes sobre o uso de modelos animais na Ciência;

- b. Verificar o conhecimento de professores e estudantes acerca da legislação brasileira que regulamenta o uso de animais para experimentação.

A pesquisa qualitativa abrangeu docentes e discentes dos cursos de Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Ceará. Para a coleta dos dados, foram utilizados questionários semiestruturados, adaptados de Tréz e Nakada (2008); um direcionado aos estudantes e outro voltado para os professores. Os questionários foram aplicados presencialmente, com a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelos participantes voluntários.

Ao todo, 91 estudantes, distribuídos do primeiro ao décimo segundo semestre de ambas as modalidades de Ciências Biológicas (licenciatura e bacharelado), bem como 9 professores, dentre os quais 8 do Departamento de Biologia e um da Faculdade de Medicina, participaram da pesquisa. O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – CEP/UFC/Propesq (CAAE: 86586418.0.0000.5054).

No presente capítulo, objetiva-se discorrer sobre a percepção e o conhecimento de estudantes e professores do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Ceará acerca da experimentação animal e da Lei Arouca, que regulamenta o uso de animais na pesquisa científica no ensino.

2. PERCEPÇÃO SOBRE MODELOS ANIMAIS NA PESQUISA OU NO ENSINO

Neste tópico, serão comentados os resultados obtidos em algumas das questões propostas aos professores e estudantes. Os questionários, o parecer do CEP e o TCLE podem ser acessados no Trabalho de Conclusão de Curso (ALCÂNTARA, 2018).

2.1 Pesquisa com os Docentes – Questionários destinados aos Professores

Já de início, os docentes foram questionados sobre quais espécies animais utilizavam como modelos em suas pesquisas. Os invertebrados foram os mais assinalados (77,7%), seguidos por peixes e camundongos (ambos com 44,4%) e ratos (33,3%). Fagundes e Taha (2004), a partir do levantamento nas bases de dados da Medline (*National Library of Medicine – USA*); da Lilacs (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde); do SciELO (*Scientific Eletronic Library Online*); e da Biblioteca Cochrane (*The Cochrane Database of Systematic Reviews*), ao pesquisar por trabalhos publicados em um período de quatro anos, descobriram que ratos e camundongos são os modelos mais empregados. Essas espécies são os modelos preferidos em pesquisa porque esses animais têm porte pequeno, proles numerosas e períodos gestacionais curtos, além de serem facilmente domesticáveis e manuseáveis (SANTOS, 2002).

Neste trabalho, invertebrados representaram a maior parte das espécies utilizadas pelos professores participantes da pesquisa. Provavelmente, isso tem relação com o fato de grande parte desses docentes realizarem investigações nas áreas de Zoologia e Ecologia. Vale ressaltar que a Lei Arouca, 11.794, abrange apenas as espécies classificadas como filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (BRASIL, 2008), o que significa que os invertebrados não são protegidos pela lei, ao contrário dos peixes, anfíbios, répteis e murinos (ratos e camundongos).

Levando em conta que todos os docentes participantes da pesquisa usam modelos animais *in vivo* na pesquisa ou no ensino, espera-se que possuam nível de conhecimento, no mínimo, abrangente, acerca da legislação. Isso foi confirmado com as respostas aos questionários, pois, mais da metade (Tabela 1) dos docentes declarou ter conhecimento abrangente (44,4%) ou pleno (22,2%) da legislação vigente.

Tabela 1 – Nível de conhecimento dos docentes sobre a Lei Arouca

Total Desconhecimento	2
Conhecimento Mediano	1
Conhecimento abrangente, mas não pleno	4
Conhecimento pleno	2

Fonte: Elaborada pelos autores.

Os docentes foram questionados sobre a legislação que regulamenta a experimentação animal no Brasil. Com isso, foi

possível observar se o conhecimento dos professores relativo à legislação era realmente amplo como relataram. A partir da quantidade de acertos de perguntas referentes à lei, observou-se que o conhecimento geral dos docentes sobre a legislação vigente foi mediano, tendo em vista que, em média, houve 51% de acerto. Tal desempenho mostrou-se abaixo do esperado, considerando que 66,6% dos professores enquadraram seu conhecimento como abrangente ou completo.

Uma possível explicação seria que, como mencionado, quase 78% dos docentes utilizam invertebrados como modelo. Alguns professores que trabalham com invertebrados, em conversa informal, demonstraram conhecimento sobre a não inclusão dos invertebrados na Lei Arouca (BRASIL, 2008). Portanto, esses achados nos levam a hipotetizar que, como o modelo de estudo desses docentes não é englobado pela legislação, eles não sentiram a necessidade de conhecer mais profundamente os aspectos dessa Lei.

Dentre as questões que abordaram aspectos gerais da Lei Arouca, apenas a afirmação “Para criar e usar animais, a instituição deve ser credenciada no Concea” é verdadeira, enquanto as demais são falsas (BRASIL, 2008).

Relativo à opinião dos docentes sobre a experimentação animal, os nove professores que participaram a consideraram fundamental em sua profissão. Esse resultado também foi encontrado pelo estudo de Tréz e Nakada (2008), em que todos os profes-

sores voluntários consideravam indispensável o uso de animais para sua profissão. De fato, modelos animais trouxeram muitas contribuições, ao longo da história da Ciência (OLIVEIRA *et al.*, 2013). O uso de animais na investigação científica possibilitou a descoberta dos mecanismos de ação e a cura de diversas doenças. Oliveira e Pitrez (2010, p. 69) relatam que “é reconhecido então que estudos com animais estão associados a descobertas que provocaram [...] aumento do bem-estar e da longevidade do homem”. No entanto, por mais vantagens que possa apresentar, experimentos utilizando animais como modelos são controversos (VICENTE; COSTA, 2014).

Tréz e Nakada (2008) destacam que as consequências da relação do homem com o meio ambiente surgem do sentimento de posse do ser humano em relação ao meio ambiente, que é visto apenas como fonte de recursos. O homem considera-se um ser superior aos demais; que teria o direito de utilizar as plantas e os animais de acordo com suas necessidades. Seguindo essa linha de raciocínio, é natural que animais sejam utilizados na pesquisa como modelos experimentais. Diniz e colaboradores (2006) apontam que “a ciência esteve por muito tempo sob a influência filosófica de René Descartes, que afirmava que animais não tinham alma e, portanto, eram incapazes de sentir dor”. Desse modo, o uso de modelos animais *in vivo* foi, por muito tempo, considerado indispensável para o avanço científico. A experimentação animal seria, portanto, um mal necessário (TRÉZ; NAKADA, 2008).

Nas alternativas relativas ao uso de animais, 77,7% dos docentes afirmaram conhecer métodos alternativos, além de acreditar na viabilidade deles. Métodos alternativos são definidos como técnicas que podem substituir o uso de animais não humanos; reduzir o número de indivíduos; e aprimorar os métodos já conhecidos, de modo a diminuir o estresse e a dor sofridos pelos animais. São exemplos de métodos de substituição o uso de modelos matemáticos, sistemas *in vitro*, voluntários humanos e organismos inferiores não classificados como protegidos (PRESGRAVE, 2002).

No ensino, os métodos alternativos ao uso de animais também são válidos. Em escolas de medicina, é crescente o abandono do uso de animais *in vivo* em aulas práticas quando o resultado, a partir da literatura científica, é conhecido (DINIZ *et al.*, 2006). Modelos computadorizados também são utilizados (SMITH *et al.*, 1997).

Mais da metade dos docentes (55,5%) afirmou que alternativas deveriam ser oferecidas a estudantes que se opõem à experimentação animal. No entanto, Balcombe (1997 *apud* TRÉZ; NAKADA, 2008) explica que não é comum professores explicarem aos seus estudantes quais são os métodos alternativos, tampouco é dada a possibilidade de escolher participar ou não das aulas que fazem uso desse tipo de metodologia. Diniz *et al.* (2006, p. 32) esclarecem que:

Apesar de todas essas opções disponíveis, a redução do número de animais no ensino ainda é lenta, provavelmente por falta de conhecimento dos docentes em relação às técnicas alternativas, bem como oportunidade para testá-las. Isso reflete de maneira direta a

receptividade do aluno, já que o professor é o principal transmissor de valores na educação.

Considerando que grande parcela dos professores conhece e acredita na viabilidade dos métodos alternativos, Tréz e Nakada (2008) trouxeram à tona um questionamento: Se esses métodos são considerados eficientes, por que não são utilizados? Nos cursos de Medicina Veterinária e áreas relacionadas, o uso de manequins e simuladores vem se tornando cada vez mais comum. Além disso, filmes e vídeos de alta qualidade têm se mostrado como alternativa realista à vivisseção, principalmente na carência de recursos financeiros (MAGALHÃES; ORTÊNCIO FILHO, 2006). Desse modo, o uso de métodos alternativos é possível, até mesmo sob condições financeiras limitadas. Mas, para que se torne viável, é necessário que existam interesse e esforços por parte das instituições e dos docentes para que o seu uso se torne uma realidade definitiva nas universidades brasileiras.

2.2 Pesquisa com os discentes - Questionários destinados aos alunos

Relativo ao conhecimento que os estudantes afirmaram ter sobre a Lei Arouca, grande parte definiu como superficial (45%), seguido por total desconhecimento (29,6%) e mediano (23%).

A partir das respostas dos estudantes a questões gerais englobadas pela Lei Arouca, o conhecimento médio dos discentes pode

ser definido como superficial (44,34% de acerto). Esse resultado pode ser explicado pela ausência de disciplinas obrigatórias que abordem a experimentação animal, sob a ótica da Lei, no curso de Ciências Biológicas da UFC. Há duas disciplinas optativas do curso que foram ofertadas durante o período em que a pesquisa foi feita e que trazem em suas ementas e planos de ensino a temática de experimentação animal e uso de animais de laboratório: Biossegurança e Animais de Laboratório. Informalmente, alguns discentes relataram que questões sobre a Lei Arouca abordadas no questionário foram comentadas em sala de aula, nessas disciplinas. No entanto, poucos estudantes fizeram essas disciplinas, e isso pode ser explicado pelo fato de serem optativas e, por isso, muitas vezes haver choque de horários com as disciplinas obrigatórias ou com estágios.

Outra hipótese seria a falta de debates sobre a experimentação animal, como ressaltado no trabalho de Tréz (2000). O autor afirma que raramente são incentivados debates sobre a experimentação animal e as questões morais envolvidas no ambiente acadêmico. No estudo de Tréz e Nakada (2008), 80% dos estudantes relataram que, raramente, ou nunca, os docentes promovem reflexões sobre o uso de animais não humanos como modelos científicos e didáticos em sala de aula. Considerando que não há abordagem da problemática envolvendo a experimentação animal, por parte dos professores, na maior parte das vezes, é possível supor que, desse modo, tampouco são abordadas as normas especificadas na Lei Arouca para o uso de modelos animais na pesquisa e no ensino.

Em nossa pesquisa, a opinião dos estudantes sobre a experimentação animal divergiu, visto que 44% declararam não ter uma opinião formada sobre o assunto, enquanto 42,7% responderam ser a favor. Cerca de 9% dos estudantes participantes são contra.

Durante a aplicação do questionário, houve coleta de outras informações a partir da conversa entre pesquisador e participante da pesquisa. Esses diálogos foram também registrados. Muitos discentes relataram se sentir divididos quanto à experimentação animal: eles entendem a importância histórica que o uso de animais proporcionou para o avanço da Ciência, no entanto, acreditam que os animais não merecem sofrer para satisfazer interesses humanos. Esse pode ser um dos possíveis motivos para o grande número de respostas sem opinião definida. Esses dados corroboram com o que afirma Rivera (2002), sobre a problemática ética que envolve a experimentação animal nascer do conflito entre o uso de animais em benefício do ser humano e o ato de não provocar dor e sofrimento a esses animais. Para ser legitimamente ético, um experimento deve trazer benefícios diretos à vida e à saúde humana e animal, além de trazer contribuições significativas para o conhecimento acerca da função, do comportamento e da estrutura dos seres vivos. Por outro lado, a experimentação animal não é considerada válida, do ponto de vista ético, se houver métodos alternativos para o conhecimento que se busca. O princípio ético de respeito pela vida, portanto, requer que se obtenha um ganho maior de conhecimento por um custo menor, no número de animais

e no sofrimento sentido por eles. Nesse contexto, os pesquisadores e professores devem submeter os protocolos de pesquisa e de aula às Ceua que respondem ao Concea.

Em contrapartida, uma parcela significativa dos estudantes declarou ser a favor do uso de modelos animais *in vivo* para fins científicos. Tréz e Nakada (2008) apontam que tal posicionamento se deve ao paradigma científico-cultural hegemônico, que se caracteriza pelos interesses humanos sobrepondo o direito à vida dos animais e, também, pela crença na confiabilidade da experimentação animal e pela rejeição a métodos que não utilizem animais.

Os conhecimentos científicos são colocados em um patamar acima dos demais. Métodos e teorias são amplamente aceitos quando considerados científicos (CHIBENI, 2006). Desse modo, pela experimentação animal ser amplamente utilizada na Ciência, muitos estudantes acreditam na necessidade dos modelos não humanos *in vivo* para adquirir novos conhecimentos científicos.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente capítulo, foram discutidas as percepções de docentes e estudantes do curso de Ciências Biológicas da UFC. Tais percepções consistiram na opinião quanto à experimentação animal e no conhecimento sobre a Lei Arouca, que regulamenta a utilização de modelos animais no Brasil e que, em 2018, ano em que foi realizada esta pesquisa, completou 10 anos de promulgação.

Por meio da aplicação de questionários aos docentes, verificou-se que os animais mais utilizados e citados são os invertebrados, camundongos, peixes e ratos. Os professores participantes consideram o uso de modelos animais essencial no exercício de sua profissão, mas apresentaram conhecimento mediano acerca da Lei Arouca, que regulamenta o uso de animais em atividades de ensino e pesquisa científica.

Por fim, por meio da aplicação de questionários aos estudantes, foi perceptível o desconhecimento deles em relação à Lei Arouca. Além disso, as opiniões dos discentes se dividiram entre apoiar ou não a experimentação animal. Considerando os impactos éticos da experimentação animal, torna-se necessário o debate dessa temática em sala de aula, além da abordagem da legislação de proteção aos animais, considerando que o curso de Ciências Biológicas emprega muitas práticas utilizando animais como modelos, tanto *in vivo* como anatômicas.

REFERÊNCIAS

ALCÂNTARA, A.B.S. *Experimentação animal na Universidade Federal do Ceará: percepção de professores e estudantes de Ciências Biológicas*. 53f., 2018. (Trabalho de Conclusão de Curso) - Graduação, Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 53f. 2018.

BALCOMBE, J. Student/teacher conflict regarding animal dissection. *The American Biology Teacher*, v. 59, n. 1, p. 22-25, 1997.

BRASIL. *Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008*. Regulamenta o inciso VII do part. 1º do Art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei n. 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá

outras providências. Brasília, DF: Presidência da República, [2008]. Disponível em: http://legislacao.planalto.gov.br/legisla/legislacao.nsf/Viw_Identificacao/lei%2011.794-2008?OpenDocument. Acesso em 22 abr. 2018.

CHIBENI, S. S. *O que é ciência?* Campinas: Unicamp. Disponível em: <http://www.unicamp.br/~chibeni/textosdidaticos/ciencia.pdf>. Acesso em: 27 maio 2018.

DINIZ, R. *et al.* Animais em aulas práticas: Podemos substituí-los com a mesma qualidade de ensino? *Revista Brasileira de Educação Médica*, Brasília, v. 30, n. 2, p. 31-41, 2006.

FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O. Modelo animal de doença: Critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cirúrgica Brasileira*, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 59-65, 2004.

FERREIRA, L. M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M. V. J. Modelos experimentais em pesquisa. *Acta Cirúrgica Brasileira*, São Paulo, v. 20, s. 2, 2005.

FIN, C. A.; RIGATTO, K. V. O uso de animais no ensino. In: FEIJÓ, A. G. S.; BRAGA, L. M. G. M.; PITREZ, P. M. C. (org.). *Animais na pesquisa e no ensino: aspectos éticos e técnicos*. Porto Alegre: Editora Universitária da PUCRS, 2010. 421p.

MAGALHÃES, M.; ORTÊNCIO FILHO, H. O. Alternativas ao uso de animais como recurso didático. *Arq. Ciên. Vet. Zool. Unipar*, Umuarama, v. 9, n. 2, p. 147-154, jul./dez. 2006.

OLIVEIRA, J. R.; PITREZ, P. M. C. A importância do uso de animais para o avanço da ciência. In: FEIJÓ, A. G. S.; BRAGA, L. M. G. M.; PITREZ, P. M. C. (org.). *Animais na pesquisa e no ensino: aspectos éticos e técnicos*. Porto Alegre: Editora Universitária da PUCRS, 2010, 421p.

OLIVEIRA, L. N. *et al.* A Lei Arouca e o uso de animais em ensino e pesquisa na visão de um grupo de docentes. *Revista Bioethikos*, São Paulo, v. 7, n. 2, p. 139-149, 2013.

PRESGRAVE, O. A. F. Alternativas para animais de laboratório: Do animal ao computador. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. (org.). *Animais de laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002, 388p.

SANTOS, B. F. Criação e manejo de camundongos. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. (org.). *Animais de laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002, 388 p.

SMITH, A. *et al.* Educational simulation models in the biomedical sciences. *ILAR Journal*, v. 38, n. 2, p. 82-88, 1997.

TRÉZ, T. A. *O uso de animais vertebrados como recurso didático na Universidade Federal de Santa Catarina: Panoramas, alternativas e a educação ética.* 2000. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

TRÉZ, T. A.; NAKADA, J. I. L. Percepção acerca da experimentação animal como um indicador do paradigma antropocêntrico-especista entre professores e estudantes de Ciências Biológicas da Unifal-MG. *Revista de Educação em Ciência e Tecnologia*, v. 1, n. 3, p. 3-28, 2008.

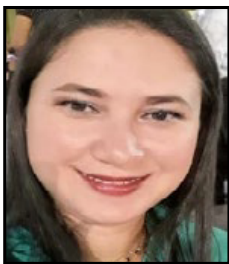
RIVERA, E. A. B. Ética na experimentação animal. *In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. (org.). Animais de laboratório: criação e experimentação.* Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002, 388 p.

WATANABE, M.; FONSECA, C. D.; VATTIMO, M. F. F. Aspectos instrumentais e éticos da pesquisa experimental com modelos animais. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, São Paulo, v. 48, n. 1, p. 181-188, 2014.

VICENTE, A. M.; COSTA, M. C. Experimentação animal e seus limites: Core set e participação pública. *Revista de Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, v. 24, n. 3, p. 831-849, 2014.

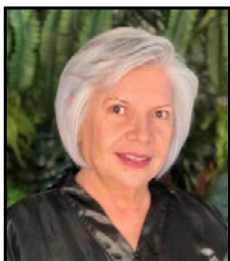
OS AUTORES

SOBRE A ORGANIZAÇÃO E O EDITORIAL CIENTÍFICO



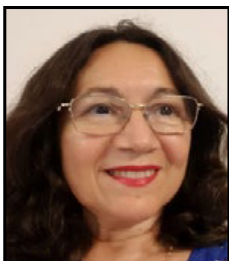
Profa. Dra. Mirele da Silveira Vasconcelos
Organizadora e editora técnica

Doutora e mestre em Bioquímica pelo Universidade Federal do Ceará (UFC) sendo orientada na iniciação científica até o mestrado pela Profa. Dra. Dirce Fernandes de Melo (2005-2011) e no doutorado pelo Prof. Dr. Márcio Viana Ramos (2013-2017), no departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC. Graduada em Engenharia de Alimentos pela UFC (2008). Bacharel em Nutrição pelo Curso de Ciências da Nutrição da Universidade de Fortaleza (Unifor) (2012). Atualmente, é professora efetiva do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE), *campus* de Baturité. Atuou como coordenadora de cursos de graduação e pós-graduação, no referido *campus*. Linhas de pesquisa: Ciências de Alimentos, Nutrição e Biotecnologia. Atua ainda no processo criativo e difusor da Ciência e no desenvolvimento de estratégias e materiais didáticos destinados à graduação. É autora de capítulos de livros publicados de 2018 a 2021, nas áreas de Ciências de Alimentos e Ciências Biomédicas, pelas editoras internacionais Elsevier e Springer.



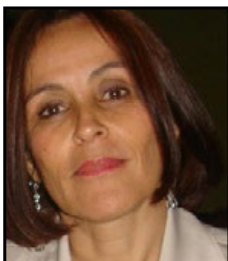
Profa. Dra. Dirce Fernandes de Melo
Editora Técnica

Professora titular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC) (aposentada). Doutora em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Joseph Fourier – Grenoble I, França. Mestre em Bioquímica e graduada em Ciências Biológicas (bacharelado e licenciatura) pela UFC. Especialista em Metodologia do Ensino Superior pela UFC. Fez parte do processo de criação do Curso de Bacharelado em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC e foi a primeira coordenadora do curso (2010-2014). Foi bolsista de Produtividade em Pesquisa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (PQ-1D). Orientou dissertações e teses no âmbito das linhas de pesquisa: Bioenergética de Sistemas Vegetais e Alérgenos Vegetais e Modulação da Resposta Imune. Após aposentadoria (2016) realizou curso de Aperfeiçoamento em Psicanálise pelo Centro Universitário Farias Brito (2018-2019) e atualmente é aluna do Curso de Graduação em Psicologia no referido Centro. Participou como autora em capítulos de livros publicados de 2018 a 2021 nas áreas de Ciências de Alimentos e Ciências Biomédicas pelas editoras internacionais Elsevier e Springer.



Profa. Dra. Diana Célia Sousa Nunes-Pinheiro
Editora Técnica

Doutora em Patologia Experimental pela Universidade Federal Fluminense (UFF). Mestre em Bioquímica pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Possui graduação em Farmácia e especialização em Hematologia pela UFC. Atualmente, é professora efetiva da Universidade Estadual do Ceará (UECE). A primeira experiência utilizando animais como modelos experimentais se deu em 1982, imunizando camundongos com alérgenos vegetais e avaliando a produção de anticorpos específicos em modelos de Anafilaxia Cutânea Passiva em camundongos e ratos, sob a orientação da Dra. Maria da Guia Silva Lima. Essa experiência continuou no doutorado, com a utilização de camundongos no estudo do tráfego linfocitário e sua modulação, sob a orientação da Dra. Vivian Rumjanek. Posteriormente, orientou várias dissertações e teses em modelos animais para gastroproteção, cicatrização, inflamação e câncer. Atua nas seguintes linhas de pesquisa: Imunomodulação, Parâmetros fisiológicos, Etnofarmacologia e Leishmaniose canina. Foi presidente do Comitê de Ética da UECE e membro efetivo dos Comitê de Ética e Comissão de Biossegurança da mesma Instituição. É autora de capítulos de livros publicados nas áreas de Ciências de Alimentos e Ciências Biomédicas pelas editoras internacionais Elsevier e Springer.



Profa. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes
Editora Técnica

Bolsista de Produtividade, Desenvolvimento Tecnológico, e Extensão Inovadora, nível 2. Graduada em Agronomia pela Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) (1979). Mestre em Fitotecnia com área de concentração em Virologia Vegetal, pela Universidade Federal do Ceará (UFC) (1983). Doutora em Bioquímica e Biologia Molecular pela UFC (1999), área de concentração em Imunologia, e pós-doutora em Bioquímica de Proteínas e Biologia Molecular pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), no Rio de Janeiro, (2010). Atualmente, é professora Titular da Universidade Estadual do Ceará (UECE) no Departamento de Nutrição, Curso de Nutrição, Disciplina de Imunologia, e professora permanente no Programa de Doutorado em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio – www.renorbio.org.br). Tem experiência na orientação de mais de 50 alunos, entre teses e dissertações, além de publicações de artigos internacionais em revistas de alto impacto científico. Lidera o Grupo de Pesquisa Inovação Biotecnológica em Saúde (ver diretório de grupos de pesquisa no CNPq) com experiência nas áreas de Virologia, Imunologia, Biologia Molecular e Biotecnologia, com ênfases no uso de sistema vegetal para a produção de proteínas recombinantes de interesse na área médica, visando à produção de vacinas e desenvolvimento de *kits* de diagnósticos. Realiza, ainda, pesquisas fundamentais sobre os processos de clonagem e produção de proteínas recombinantes utilizando sistemas vegetais e microbiológicos.



Profa. Dra. Ana Cláudia Marinho da Silva
Editora Técnica

Doutora e mestre em Bioquímica pela Universidade Federal do Ceará (UFC) (2000/2004). Pós-doutora em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio) (2018-2019). Graduada em Ciências Biológicas pela UFC. Possui Licenciatura Plena e Bacharelado (1992-1996). Atualmente, é pesquisadora do Grupo de Inovação Biotecnológica em Saúde na Universidade Estadual do Ceará (UEC). Atuou como coordenadora do Curso de Biomedicina da Faculdade Católica Rainha do Sertão, e professora titular do Centro Universitário Estácio do Ceará. Linhas de pesquisa: Imunomodulação, adjuvantes e Biotecnologia em modelos animais. Atua em grupo de pesquisa no desenvolvimento de estratégias para o enfrentamento da pandemia do novo coronavírus.



Profa. Dra. Luciana Maia Moser
Editora Técnica

Doutora em Bioquímica pela Universidade Federal do Ceará (UFC), com Doutorado Sanduíche na Universidade de Bielefeld, Alemanha. Graduada em Ciências Biológicas (2000) e mestre em Bioquímica (2001), pela UFC. Atualmente, é professora associada da Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (Ufape). Linhas de pesquisa: Bioquímica, Fisiologia e Biologia Molecular de plantas, com ênfase em Metabolismo e Bioenergética, Fitoquímicos em Saúde, Segurança Alimentar e Agroecologia. É autora de artigos e capítulos de livros publicados nas áreas de Bioquímica e Fisiologia de Plantas e Ciências de Alimentos e Ciências Biomédicas.

COLABORADORES

Alexia Nathália Brígido Assef: Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil.

Aline Diogo Marinho: Doutora em Farmacologia pela Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil com período sanduíche em University of Cambridge, Inglaterra. Pesquisadora a nível de pós-doutorado no Programa de Ciências Médicas (PPGCM) da Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil.

Ana Biatriz Sousa Alcântara: Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil.

Ana Carolina Fonseca Lindoso Melo: Doutora em Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias pela Universidade Estadual do Ceará, UECE, Brasil. Professora Adjunta da Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil. Docente do Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Ana Cláudia Marinho da Silva: Doutora em Bioquímica pela Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil. Pesquisadora de pós-doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Ceará, Brasil.

Ana Sanches Silva: Doutora em Farmácia pela Universidade de Santiago de Compostela, Espanha. Pesquisadora do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), Vairão, Vila do Conde, Portugal; Centro de Estudos de Ciência Animal (CECA), Universidade do Porto, Oporto, Portugal.

Augusto César Aragão Oliveira: Doutor em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio), Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil. Técnico de laboratório do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, Ceará, Brasil.

Ayrles Fernanda Brandão da Silva: Doutora em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio), Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil. Pesquisadora de pós-doutorado no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil. Pós-doutorado pela University College London – Royal Free Hospital, Inglaterra.

Bianca Scatolin: Graduanda do curso de Biomedicina do Centro Universitário da Fundação Hermínio Ometto, FHO. Araras, São Paulo, Brasil.

Bruno Bezerra da Silva: Doutor em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio), Universidade Estadual do Ceará (UECE), Ceará, Brasil. Professor Substituto da Univer-

cidade Estadual do Ceará (UECE), Ceará, Brasil. Pós-doutor em Biotecnologia na Universidade Estadual do Ceará (UEC), Ceará, Brasil.

Carolina de Araújo Viana: Doutora em Bioquímica pela Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil. Professora do Centro Universitário UniFanor, Fortaleza, Ceará, Brasil. Pós-doutora em Bioquímica pela Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil.

Chayane Gomes Marques: Mestre em Nutrição e Saúde pela Universidade Estadual do Ceará (UECE), Ceará, Brasil. Professora Substituta do Departamento de Nutrição da Universidade Estadual do Ceará, Ceará, Brasil.

Daniela Santos Masson-Meyers: Doutora em Ciências Médicas pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Brasil com período sanduíche em College of Health Sciences, University of Wisconsin-Milwaukee (EUA). Pós-doutora pela Marquette University School of Dentistry, Milwaukee, Wisconsin, EUA.

Dennys Esper Cintra: Doutor em Clínica Médica pela Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil. Professor Livre-docente da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), São Paulo, Brasil. Pós-doutor em Clínica Médica pela Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil.

Diana Célia Sousa Nunes-Pinheiro: Doutora em Patologia pela Universidade Federal Fluminense, UFF, Brasil. Professora Adjunta da Universidade Estadual do Ceará (UECE), Ceará, Brasil.

Diego Veras Wilke: Doutor em Farmacologia pela Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil. Professor Associado da Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil. Pós-doutor pelo Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-FIOCRUZ.

Dirce Fernandes de Melo: Doutora em Biologia Celular Universidade de Grenoble I em Université Scientifique et Medicale - Joseph Fourier, França. Professora Titular da Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil.

Djane Ventura de Azevedo: Mestre em Desenvolvimento e Meio Ambiente pela Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil. Professora Assistente da Universidade Estadual do Ceará (UECE), Ceará, Brasil.

Eduardo Rochete Ropelle: Doutor em Fisiopatologia Médica pela Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, Brasil. Professor Livre-docente da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), na Faculdade de Ciências Aplicadas, São Paulo, Brasil. Pós-doutor pela École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), Suíça.

Erika Freitas Mota: Doutora em Bioquímica pela Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil. Professora Associada da

Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil. Tutora do Programa de Educação Tutorial da Biologia (PET Biologia/UFC). Pós-doutora pela University of Maryland, Baltimore County, UMBC, Estados Unidos.

Evelline Araújo Edson: Mestre em Farmacologia pela Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil.

Felipe Barros Teles: Doutorando do Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil. Mestre em Bioquímica pela Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil.

Francisco Clark Nogueira Barros: Doutor em Bioquímica pela Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil com período sanduíche na St George's University of London, Inglaterra. Professor do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE), Ceará, Brasil.

Gabriela Mariângela Farias de Oliveira: Médica veterinária do Biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) na Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil.

Gisele de Fátima Pinheiro Rangel: Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil. Mestre em Farmacologia pela Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil.

Glauber Cruz Lima: Doutor em Bioquímica pela Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil. Mestre em Ciências Fisiológicas pela Universidade Estadual do Ceará (UECE), Ceará, Brasil. Professor da Faculdade Uninta, *campus* Itapipoca, Ceará, Brasil.

Hugo Leonardo Melo Dias: Doutorando em Ciência Animal pela Universidade Estadual do Maranhão, UEMA, Brasil. Mestre em Ciência de Animais de Laboratório pelo Instituto de Ciências e Tecnologia de Biomodelos (ICTB) da Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ- RJ. Bioterista da Universidade Federal do Maranhão, Maranhão, Brasil.

Igor Gomes Moreira: Bacharel em Medicina Veterinária pela Faculdade Terra Nordeste (FATENE), Ceará, Brasil.

Isaac Neto Goes da Silva: Doutor em Biotecnologia da Saúde (Renorbio) pela Universidade Estadual do Ceará, UECE, Brasil. Mestre em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, UECE, Brasil. Professor Adjunto da Universidade Estadual do Ceará (UECE), Ceará, Brasil.

Joanna de Freitas Rocha: Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade da Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil.

João Alison de Moraes Silveira: Doutor e Mestre em Farmacologia pela Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil.

Professor Substituto da Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil.

Joel Majerowicz: Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos pela Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Brasil. Diretor da empresa Majerowicz Consultoria e Serviços em Biotérios, Brasil.

José Ytalo Gomes da Silva: Doutor em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio), Universidade Estadual do Ceará (Uece), Ceará, Brasil.

Katharine Gurgel Dias Florêncio: Doutora e Mestre do Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil.

Klena Sarges Marruaz da Silva: Doutora em Ciências da Saúde pela Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, FCMSCSP, Brasil. Docente do Programa de pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciência de Animais de Laboratório (Mestrado Profissional/FIOCRUZ/CAPES). Pesquisadora em Saúde Pública do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

Laís Lacerda Brasil de Oliveira: Doutoranda em Medicina Translacional pela Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil. Tecnóloga/Biotecnologia no Núcleo de Pesquisa e De-

envolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil.

Larissa Alves Guimarães: Doutora em Farmacologia pela Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil com período sanduíche na Universidade do Arizona, EUA. Professora Adjunta da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Piauí, Brasil.

Lucelina da Silva Araújo: Doutora em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio), Universidade Estadual do Ceará (UECE), Ceará, Brasil. Professora da Universidade Estadual do Ceará (UECE), Brasil.

Luciana Maia Moser: Doutora em Bioquímica pela Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil com período sanduíche em Bielefeld University, Alemanha. Professora Associada da Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (UFAPE), Garanhuns, Pernambuco, Brasil.

Luína Benevides Lima: Doutoranda em Ciências Médicas pela Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil. Tecnóloga/Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil.

Luiz Francisco Wemmerson Gonçalves Moura: Doutor em Biotecnologia de Produtos Naturais pela Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio), Universidade Estadual do Ceará

(UECE), Ceará, Brasil. Professor colaborador do Centro de Educação, Ciência e Tecnologia da Região dos Inhamuns - CECITEC/TAUÁ.

Manoel Odorico de Moraes: Doutor em Oncologia pela Universidade de Oxford, Inglaterra. Professor Titular da Universidade Federal do Ceará, Brasil.

Manuel Carlos Serra Azul Monteiro: Doutor em Farmacologia pela Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil. Técnico de Laboratório no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil.

Maria Elisabete Amaral de Moraes: Doutora em Farmacologia Clínica pela Universidade de Oxford, Inglaterra. Professora Titular da Universidade Federal do Ceará (UFC), Brasil.

Maria Izabel Florindo Guedes: Doutora em Bioquímica pela da Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil. Professora Associada da Universidade Estadual do Ceará (UECE), Ceará, Brasil. Pós-doutora em Bioquímica de Proteínas e Biologia Molecular pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro.

Marisa Jadna Silva Frederico: Doutora em Bioquímica (UFSC), Florianópolis, SC, Brasil. Professora Adjunta da Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil. Pós-doutorado em Inovação e Desenvolvimento de Medicamentos do Centro de

Inovação e Ensaio Pré-Clínicos, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brasil.

Mirele da Silveira Vasconcelos: Doutora em Bioquímica pela Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil. Professora do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE), Ceará, Brasil.

Mirna Marques Bezerra Brayner: Doutora em Farmacologia pela Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil. Professora Titular da Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil. Pós-doutora em Brigham and Women's Hospital - Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, HMS, Estados Unidos.

Naiara Alves: Mestre em Ciências Biomédicas no Centro Universitário Herminio Ometto de Araras, (UniAraras), São Paulo, Brasil.

Neuza Felix Gomes Rochette: Doutora em Bioquímica pela Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil. Pesquisadora de pós-doutorado na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Espírito Santo, Brasil. Pós-doutorado nas Universidades de Lorraine (Nancy) e Pierre et Marie Curie (Paris), França.

Roberta Jeane Bezerra Jorge: Doutora em Farmacologia pela Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil com período sanduíche no Instituto de Biomedicina de Valencia, Espanha. Professora Adjunta da Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil.

Tamiris de Fátima Goebel de Souza: Doutora em Farmacologia pela Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil. Pós-doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil.

Thiago Antônio Moretti de Andrade: Doutor em Ciências (Investigação Biomédica) pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, FMRP-USP, Brasil. Professor do Centro Universitário da Fundação Hermínio Ometto (FHO). Araras, São Paulo, Brasil. Pesquisador de pós-doutorado em *Department of Mechanical Engineering, Division of Medical Sciences (DMS), University of Victoria (UVic)* em Victoria, British Columbia, Canada.

Weibson Paz Pinheiro André: Doutor pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará (UECE), Brasil. Professor do Centro Universitário Leão Sampaio (Unileão), Juazeiro do Norte, Ceará, Brasil.

Wesley Lyevertton Correia Ribeiro: Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Estadual do Ceará, UECE, Brasil. Docente do Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional da Universidade Federal do Ceará (UFC). Médico veterinário do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil.

Visite nosso site:
www.imprensa.ufc.br



Imprensa
Universitária

Versão digital

Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará - UFC
Av. da Universidade, 2932 - Benfica
CEP.: 60020-181 - Fortaleza - Ceará - Brasil
Fone: (85) 3366.7485 / 7486
imprensa@proplad.ufc.br



“O livro é uma prova existencial do poder de transformação que a ciência causa em cada um de nós, cientistas ou não cientistas. O livro também é uma passagem por histórias reais de criatividade, de teimosia e coragem (criação do biotério da UFC é um exemplo).”

Jose Wally Mendonça Menezes

Reitor do Instituto Federal de educação Ciência e tecnologia do Ceará- IFCE

A ideia da elaboração do livro “**Modelos animais: da legislação à experimentação científica**” surgiu da necessidade de divulgar informações relevantes e enaltecer a importância dos modelos animais que mimetizam aspectos fisiológicos e patológicos proporcionando ferramentas para a construção do conhecimento científico do organismo animal, de forma diferencial no binômio saúde/doença, abordando o tema numa perspectiva histórica incluindo aspectos desde a legislação até questões éticas e metodológicas do ponto de vista técnico-científico da pesquisa científica. A despeito do requinte atual de técnicas bioquímicas e moleculares, bem como a utilização de modelos celulares, o uso de modelos animais ainda faz-se necessário para solução de diversos enigmas no âmbito biológico.

O livro que possui 14 capítulos está centrado no uso de modelos animais, em distintas pesquisas científicas, incluindo modelos emergentes no contexto da pandemia de Covid-19 (Sars-Cov-2). Trata-se de um trabalho transdisciplinar de divulgação científica envolvendo professores/pesquisadores nacionais e internacionais qualificados, vinculados à instituições brasileiras e estrangeiras.

Uma fonte de referência útil para pesquisadores, médicos, farmacêuticos, bioquímicos, químicos, biólogos, biotecnologistas, veterinários, estudantes dos respectivos cursos de graduação e pós-graduação e demais interessados, com informações relevantes sobre a importância dos modelos animais nos estudos biológicos.

APOIO

PATROCÍNIO

