

Rotas alternativas

Esforço de pesquisa para substituir o uso de animais em testes começa a mostrar resultados

Fabrizio Marques

Ganha musculatura no país uma articulação entre laboratórios públicos, grupos de pesquisa e órgãos governamentais para reduzir ou substituir o uso de animais em testes de segurança e eficácia de produtos. O esforço foi deflagrado em 2012, com a criação pelo governo federal da Rede Nacional de Métodos Alternativos (Renama) e o lançamento de uma chamada de projetos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que contemplou 10 projetos de pesquisa no âmbito da Renama. Todos estão em andamento e têm focos diversos, como a produção de kits de pele artificial para testes de sensibilidade de cosméticos, estudos com larvas capazes de substituir mamíferos em exames de toxicidade ou a redução do número de roedores no controle de qualidade de vacinas. Três laboratórios fazem parte do núcleo central da Renama. Um deles é o Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), em Campinas. Os outros ficam no Rio de Janeiro: o Instituto Nacional de Controle de

Qualidade em Saúde (INCQS), vinculado à Fundação Oswaldo Cruz, e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro).

Em março, essa estrutura ainda em fase de consolidação foi desafiada a cumprir uma meta ambiciosa: dar suporte para a substituição progressiva, nos próximos cinco anos, do uso de animais em testes, sempre que existir uma alternativa validada. Para novos métodos ainda não validados, esse processo envolverá o Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM) e toda a estrutura da Renama. A substituição foi decidida pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (Concea), instituição colegiada vinculada ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), responsável desde 2009 por estabelecer normas para a experimentação animal no Brasil e substituir animais para propósitos científicos e didáticos quando existirem recursos alternativos. Em maio, o Concea recebeu do BraCVAM a primeira recomendação de métodos alternativos já validados





Pele cultivada artificialmente por pesquisadores da USP: objetivo é criar *kit* comercial para testes de cosméticos

e aceitos internacionalmente. São 17 técnicas, que envolvem sensibilidade cutânea, potencial de irritação e corrosão ocular e toxicidade. “A resolução permitirá que o país efetivamente adote métodos alternativos em testes de agrotóxicos, cosméticos e medicamentos”, diz o coordenador do Conceia, José Mauro Granjeiro.

O maior potencial para a substituição de animais por métodos alternativos não está nas pesquisas científicas de cunho acadêmico, mas sim nos testes exigidos pelas agências regulatórias para garantir a segurança e a eficácia de produtos. “Os experimentos com animais feitos para averiguar hipóteses científicas são idealizados de forma independente pelos pesquisadores: cada um tem a sua pergunta específica e idealiza um conjunto peculiar de experimentos para respondê-la. Portanto, é muito mais difícil padronizá-los”, explica Eduardo Pagani, pesquisador e gerente de desenvolvimento de fármacos do LNBio. “Já os testes exigidos por agências do mundo inteiro para cosméticos e outros produ-

tos são sempre feitos de acordo com métodos padronizados. Neles, há mais espaço para propor alternativas que não usem animais”, observa. A exigência dos testes *in vivo* para registro de medicamentos e cosméticos começou na década de 1960, após o conhecido acidente com a substância talidomida. O medicamento foi vendido no mundo todo com a indicação de combater o enjoo em grávidas. Milhares de mães que usaram o remédio tiveram filhos com deformações. Já o movimento para substituir os modelos animais por métodos alternativos ganhou força em 2003, quando a Europa propôs o banimento do uso em testes de cosméticos, e demorou duas décadas para ser implementado.

Os projetos sobre métodos alternativos apoiados pelo MCTI em 2012 foram divididos em duas vertentes. Numa delas, a meta foi identificar grupos que já trabalhavam com métodos alternativos e apoiar estudos realizados por eles. Nove projetos de grupos de São Paulo, Bahia, Goiás, Rio de Janeiro, Santa Catarina e Rio Grande do



Sul foram selecionados. Uma segunda vertente tinha foco específico: desenvolver competência no Brasil para produzir em escala industrial *kits* de pele humana cultivada, utilizados pela indústria de cosméticos para testes de segurança de seus produtos, mas cuja importação se tornou um problema no Brasil. Acontece que os *kits* com células vivas deterioram em poucos dias e a demora nos trâmites alfandegários frequentemente inviabiliza sua aquisição – o que leva as indústrias a realizar tais testes no exterior.

O projeto contemplado foi o de um grupo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, liderado por Silvyta Stuchi-Maria Engler, que começou a produzir pele artificial em meados dos anos 2000, com apoio da FAPESP (ver Pesquisa FAPESP nº 166). Produzida a partir de células retiradas de doadores, a pele reproduz os mesmos tecidos biológicos da humana e pode ser utilizada para avaliar a toxicidade e a eficácia de novos compostos para fármacos e produtos cosméticos. Originalmente, a pesquisa sobre pele cultivada buscava dar suporte a outra linha de investigação em que Silvyta está envolvida: o estudo de moléculas capazes de deter o melanoma, tumor de pele muito agressivo. “Logo percebemos que a pele poderia ajudar as empresas”, afirma. “Os *kits* são uma alternativa para testes de cosméticos, mas é bom lembrar que o uso de animais segue imprescindível, por exemplo, em testes para o desenvolvimento de medicamentos”, observa Silvyta.

O Instituto Butantan, com sua vocação para desenvolver e produzir soros e vacinas, vem diminuindo a quantidade de animais, como camundongos e cobaias, utilizados para o controle de qualidade. Esse esforço já levou, entre outros avan-

ços, à redução em mais de 60% do uso de camundongos em testes de qualidade da vacina recombinante contra a hepatite B, graças à criação de um teste imunoenzimático com funções equivalentes. O trabalho do instituto habilitou-o a apresentar um projeto no edital da Renama, envolvendo vários métodos alternativos para controle de qualidade de vacinas e soros. Numa das frentes de pesquisa, o objetivo é reduzir o número de animais nos testes em lotes da vacina de difteria e tétano, com a adoção de um ensaio *in vitro* para detectar a atividade imunogênica. Em outra, a meta é substituir ensaios em cobaias por ensaios em células no controle da anatoxina diftérica – toxina da difteria que mantém atividade imunogênica, embora não seja mais tóxica. Um terceiro foco é a adaptação para vacinas produzidas pelo instituto de um *kit* que substitui o uso de coelhos em testes de pirogênios, contaminantes que causam febre e podem ser oriundos de microrganismos ou aglomerados proteicos. Em quarto lugar, procura-se reduzir o uso de camundongos na sorologia para vacina de coqueluche – a ideia é utilizar para a doença os mesmos animais usados para dosar anticorpos contra difteria e tétano. A redução do número é sensível: de 170 animais por lote de vacina para apenas seis cobaias.

Por fim, o Butantan já está obtendo êxito em uma técnica com potencial para substituir o uso de camundongos por um ensaio imunoenzimático numa etapa da produção da vacina contra a raiva. “A redução e a substituição de animais é um caminho sem volta”, diz o químico Wagner Quintilio, pesquisador do Butantan responsável pelo projeto. “Existe a pressão da sociedade e dos comitês de ética em pesquisa, que não permitem o

“Busca de modelos alternativos é importante para criar métodos mais eficientes”, diz Maria José Giannini



1 e 2 Produção de pele artificial pelo grupo da professora Silvy Stuchi-Maria Engler, da USP

3 e 4 *Zebrafish* e *Galleria mellonella*, cuja larva pode substituir animais em testes de toxicidade: modelos alternativos

uso exagerado de animais. Há também a pressão econômica. Criar os animais em condições adequadas custa caro e ocupa muito espaço”, afirma.

Já o projeto do grupo liderado pela micologista Maria José Giannini, professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista (Unesp), prevê a criação do Centro para o Desenvolvimento e Validação de Métodos Alternativos (Cedevam),

“O uso de animais é imprescindível no desenvolvimento de medicamentos”, diz Silvy Stuchi, da USP

a fim de criar e testar técnicas que reduzam o uso de animais. Maria José é supervisora da pós-doutoranda Liliana Scorzoni, responsável por uma pesquisa sobre modelos capazes de substituir mamíferos por outros organismos em testes de virulência de micróbios e a eficácia de drogas. O *front* mais adiantado é o do *Galleria mellonella*, espécie de inseto lepidóptero, cuja larva é útil para verificar a atividade de determinadas substâncias. “É de fácil manuseio e pode minimizar o uso de animais”, diz Maria José, que também é membro do Conselho Superior da FAPESP. “A larva tem células semelhantes às do sistema imunológico. Quando se injeta uma substância tóxica, ela reage e escurece”, afirma. A expectativa é de que o *Galleria* substitua outros animais, como ratos e camundongos, em pelo menos alguma etapa dos testes de toxicidade e virulência.

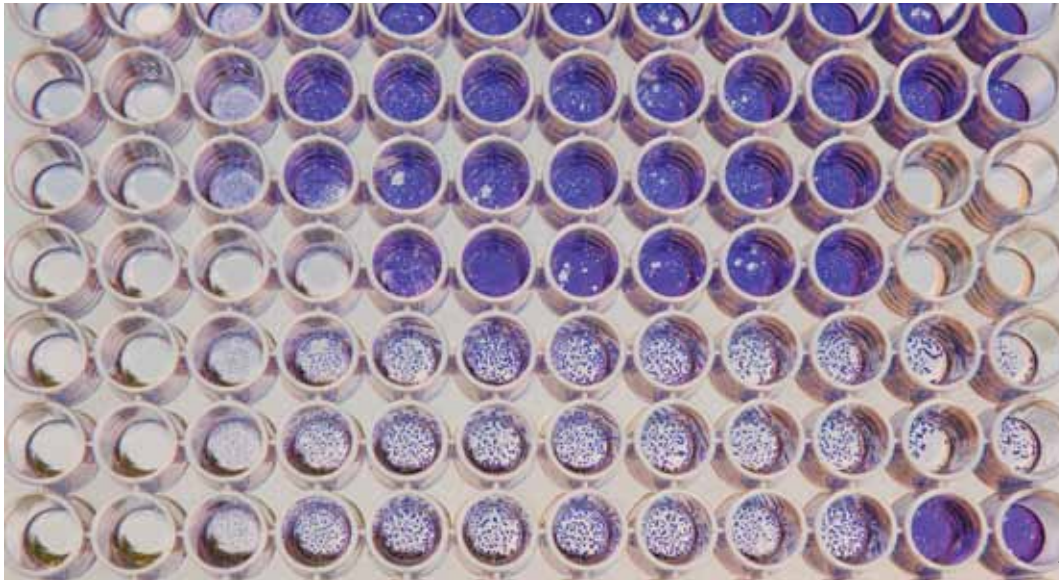
Outro modelo alternativo na mira do grupo da Unesp é o *C. elegans*, nematódeo de um milímetro de comprimento sensível à infecção por

bactérias e fungos patógenos. “Tem um sistema imune para o reconhecimento e a eliminação de patógenos com alta semelhança ao dos vertebrados. Além disso, seu genoma foi completamente sequenciado, o que ainda não é o caso do *Galleria*”, afirma Maria José. Os dois modelos estão sendo testados para avaliar a virulência de fungos *Paracoccidioides*, endêmicos na América Latina. Outros modelos, como o do peixe *zebrafish*, serão testados. Em 2010, a Pró-reitoria de Pesquisa da Unesp, cuja titular é a professora Maria José, organizou em São Paulo um fórum internacional para discutir alternativas a testes de toxicidade com animais, que trouxe autoridades como Thomas Hartung, diretor do Centro de Alternativas aos Testes em Animais, da Universidade Johns Hopkins. “A busca de modelos alternativos é importante também para desenvolver métodos mais eficientes. Modelos animais têm limitações e, às vezes, não são suficientes para garantir a segurança, como se pode ver com medicamentos aprovados que acabam retirados do mercado”, diz Maria José.

A decisão do Concea de impulsionar o reconhecimento de métodos alternativos validados foi uma resposta a uma petição da organização não governamental Humane Society International, que reivindicava o banimento de ensaios em animais para cosméticos. No estado de São Paulo, ensaios em animais para cosméticos estão proibidos por uma lei estadual sancionada em janeiro de 2014. O Concea, que não aceitou o pedido, entendeu que acelerar a implantação de técnicas alternativas promoverá maior redução no uso de animais que apenas a proibição exclusiva do uso de animais para análise de cos-

metos.





Cultura de células para o ensaio de citotoxicidade para anatoxina diftérica que substitui o uso de cobaias no controle de qualidade da vacina contra difteria

méticos, já que praticamente não se usam mais animais para este fim. “O banimento completo colocaria em xeque a segurança da população”, diz o médico e biofísico Marcelo Morales, professor da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e ex-coordenador do Conceia. “Ele pode inviabilizar o desenvolvimento de cosméticos com ingredientes novos ou moléculas descobertas na nossa biodiversidade que contenham contaminantes desconhecidos”, afirma. Luiz Henrique do Canto Pereira, coordenador-geral de biotecnologia e saúde do MCTI, afirma que o banimento poderia prejudicar a estratégia definida pelo MCTI de substituir, reduzir e refinar o uso de animais em testes sempre que isso for possível. “A campanha pelo banimento atropela o esforço que estamos fazendo desde 2011, quando começamos a conceber essa iniciativa, para organizar no país uma rede estruturada, capaz de validar e disseminar de forma mais ampla os métodos alternativos, incluindo não apenas cosméticos mas também fármacos e agrotóxicos”, afirma. “Mesmo na Europa há salvaguardas que permitem a realização de testes se houver riscos à saúde da população.”

Há quem veja certo açodamento no prazo de cinco anos para a substituição estipulado pelo Conceia. “Começamos recentemente a investir no desenvolvimento de métodos alternativos aqui no Brasil e agora corremos o risco de morrer na praia se não tivermos resultados imediatos”, diz Maria José Giannini, da Unesp. “As empresas, pressionadas pelo prazo, poderão importar técnicas em vez de usar a *expertise* nacional. Isso já acontece hoje. Empresas de cosméticos afirmam que não fazem testes com animais no Brasil. Mas fazem em outros países, para garantir a segurança dos produtos”, explica.

A expectativa de Octavio Presgrave, coordenador do BraCVAM, é de que práticas aceitas internacionalmente tenham aprovação rápida. “Para a validação interna será necessário demonstrar que os registros já obtidos no exterior se reproduzem em testes feitos nos nossos laboratórios”, afirma Presgrave, que é pesquisador do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). Segundo ele, o prazo de cinco anos é factível. “É tempo suficiente para que as empresas e laboratórios se adaptem”, diz. Em outros casos, o trabalho do BraCVAM será mais demorado. É o caso, por exemplo, do protocolo Het-Cam, que busca substituir o uso de coelhos por uma membrana do ovo de galinha na identificação de compostos corrosivos ou muito irritantes. O método, criado na Europa em 1985, é aceito apenas como pré-teste na França e na Alemanha. O processo do Het-Cam será o primeiro estudo de validação no Brasil seguindo preceitos internacionais, afirma Presgrave. “Quando deixamos de usar animal num teste, há um ganho ético importante. Mas um novo método também significa criar conhecimento. Desenvolvemos inovações na busca de métodos mais fidedignos e sensíveis”, afirma.

Em outra frente para reduzir o uso de animais em testes de laboratório, o LNBio recebeu recursos do MCTI para criar um núcleo de testes *in silico*, para reduzir o uso de animais na pesquisa de medicamentos. *In silico* refere-se ao silício utilizado em circuitos integrados e significa “em computador”. Essa expressão foi criada em analogia às expressões *in vivo* e *in vitro*, utilizadas há

“Banimento completo de testes de cosméticos põe em xeque segurança da população”, diz Marcelo Morales

bastante tempo. Testes *in silico* envolvem simulações em computador para avaliar, por exemplo, se moléculas candidatas a novos medicamentos têm realmente essa vocação. “O computador pode comparar a estrutura da molécula candidata com a de outras já testadas e cujas características estão armazenadas em bancos de dados para definir se vale a pena prosseguir com seu desenvolvimento”, diz Eduardo Pagani, do LNBio. Estes testes

“Testes *in silico* evitam desperdício de tempo e dinheiro e o uso injustificável de animais”, afirma Pagani, do LNBio

também podem ajudar a avaliar se uma determinada molécula, mesmo com potencial, tem mesmo chances de ser absorvida pelo organismo se administrada, por via oral. Estimativas clássicas dão conta de que de 5 mil a 10 mil moléculas são inicialmente avaliadas para potencial atividade em um alvo; 250 são sintetizadas e iniciam testes em animais; cinco iniciam os testes clínicos em humanos e apenas uma chega ao mercado como medicamento. “A ideia dos testes *in silico* é diminuir ainda mais o número de substâncias que são submetidas a testes em animais pela eliminação rápida daquelas que se mostrarem inviáveis. Trata-se de um filtro que evita o desperdício de tempo, recursos financeiros e principalmente o

uso injustificável de animal em projetos previsivelmente destinados ao fracasso.”

O LNBio divulgou no mês passado os resultados de um edital que franqueou a empresas, institutos de pesquisa e universidades a possibilidade de realizar testes *in silico* no laboratório. Foram recebidas 19 propostas de sete empresas. “Todas foram aprovadas e, nos próximos meses, vamos iniciar os testes”, diz Tiago Sobreira, pesquisador de bioinformática do

LNBio responsável pela parte operacional dos testes *in silico*. As empresas manifestaram o interesse de participar da chamada e agora negociarão os termos dessa participação, que inclui a proteção de segredos industriais. Entre os contemplados estão

laboratórios, como Farmanguinhos, Cristália e Eurofarma, e indústrias de cosméticos, como Boticário e Natura. “Quem desenvolve fármacos diz que demora 15 anos e custa R\$ 1 bilhão para colocar um produto no mercado. O Brasil tem um déficit comercial farmacêutico de R\$ 6 bilhões por ano. Precisamos gerar um esforço público para os brasileiros desenvolverem remédios aqui”, diz Pagani.

A implementação de métodos alternativos depende da existência de laboratórios reconhecidos nas chamadas boas práticas de laboratório (BPL), mas eles ainda são poucos no Brasil. “As boas práticas contribuem para a rastreabilidade e, portanto, para a confiança no estudo realizado. A confiabilidade dos métodos alternativos também será garantida pela realização de comparações entre os laboratórios da Renama”, diz o coordenador do Conceia, José Mauro Granjeiro, responsável por essa área no Inmetro. Recentemente, o Inmetro coordenou uma comparação entre cinco laboratórios da rede, com apoio de uma consultoria internacional com experiência – Centro Europeu para Validação de Métodos Alternativos (Ecvam, na sigla em inglês) –, cujos resultados estão sendo analisados.

A ampliação dos estudos sobre métodos alternativos dependerá de um reforço no financiamento aos grupos de pesquisa envolvidos, observa Luiz Henrique Canto, do MCTI. “Conseguimos desenhar uma estrutura e começamos a avançar e o MCTI vem envidando todos os esforços, inclusive buscando apoio no Congresso por meio de emendas parlamentares, para o fortalecimento da Renama. Acreditamos que essa iniciativa poderá beneficiar em muito o desenvolvimento científico e tecnológico do país na área das ciências da vida”, afirma. ■



Rato de laboratório: pesquisas buscam substituí-lo por testes *in vitro* ou reduzir seu uso no controle de qualidade de vacinas