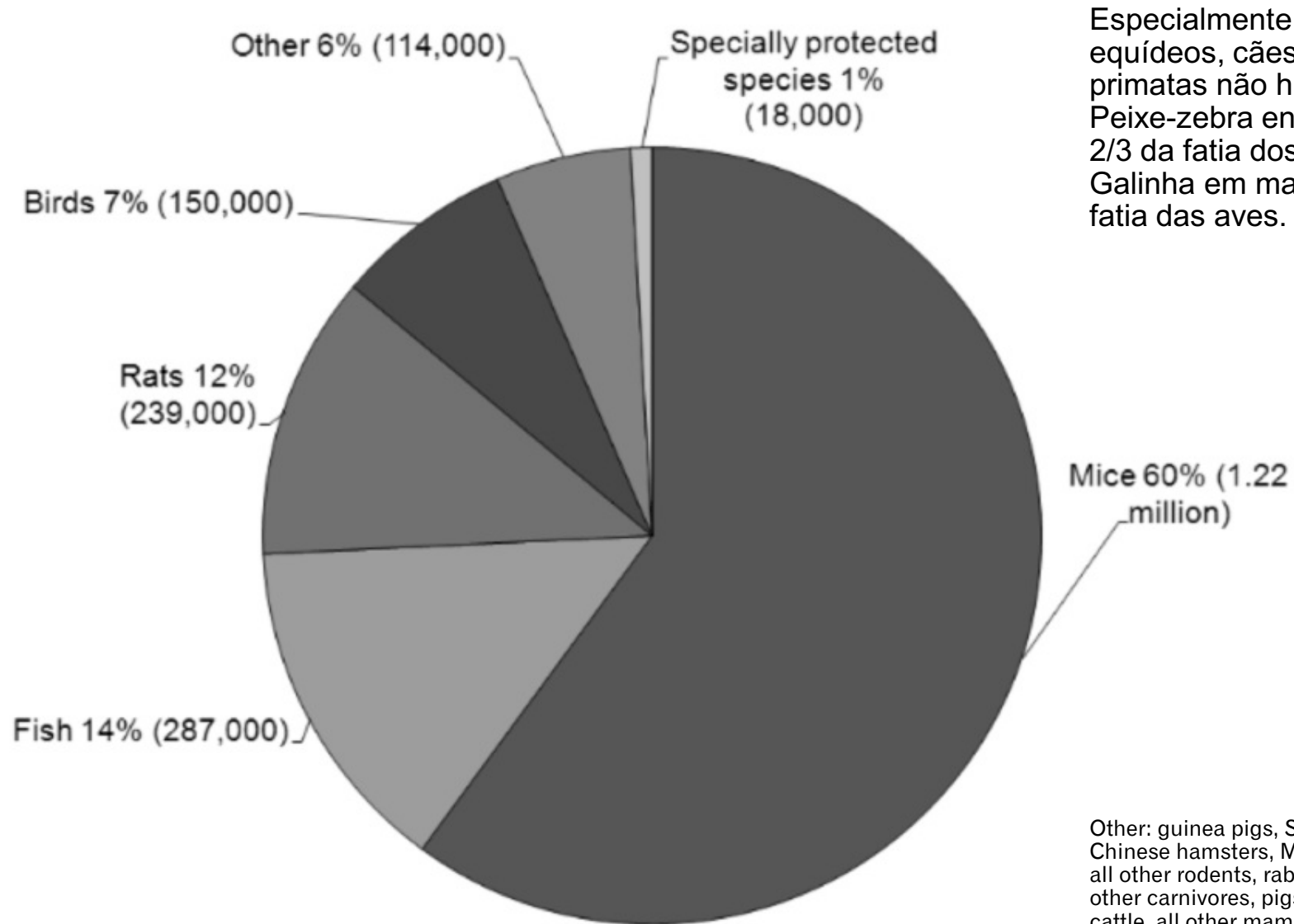


Uso de animais em experimentação

Unidade curricular Modelos Animais,
licenciatura de Biologia Humana,
Universidade de Évora

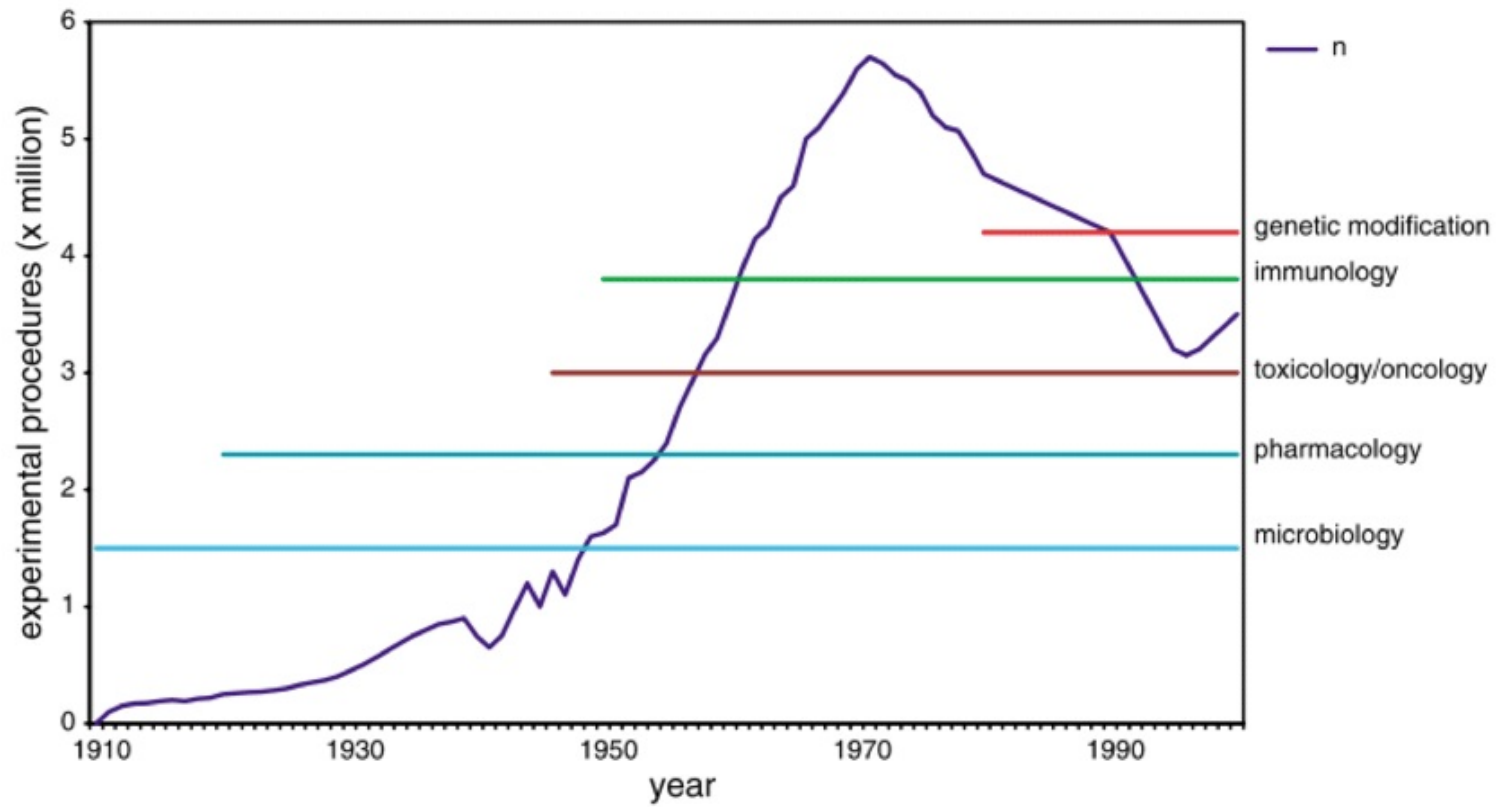
Paulo de Oliveira,
Departamento de Biologia
2012–2018

Distribuição dos grupos de espécies na Grã Bretanha em 2016 e número de procedimentos experimentais completados



Especialmente protegidas: equídeos, cães, gatos, primatas não humanos. Peixe-zebra envolvido em 2/3 da fatia dos peixes. Galinha em mais de 90% da fatia das aves.

Other: guinea pigs, Syrian hamsters, Chinese hamsters, Mongolian gerbils, all other rodents, rabbits, ferrets, all other carnivores, pigs, goats, sheep, cattle, all other mammals, reptiles, Rana temporaria and pipiens, Xenopus laevis and tropicalis and all other amphibians



The Principles of Humane Experimental Technique

W.M.S. Russell and R.L. Burch (1959)

- Integration in the Vertebrate Organism
- Pain and Distress / The Criteria for and Measurement of Distress
- Monitoring Animal Experimentation
- The Removal of Inhumanity: The Three R's
- REPLACEMENT Modes of Absolute and Relative Replacement
- REDUCTION The Problem of Variance
- REFINEMENT Neutral and Stressful Studies



Texto completo em

http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc

Resumo e comentário em <http://www.forschung3r.ch/de/publications/bu7.html>



The ethics of research
involving animals

NUFFIELD
COUNCIL ON
BIOETHICS

GUIDE
FOR THE CARE AND USE OF
LABORATORY
ANIMALS

Eighth Edition

Committee for the Update of the Guide for the Care
and Use of Laboratory Animals

Institute for Laboratory Animal Research

Division on Earth and Life Studies

NATIONAL RESEARCH COUNCIL
OF THE NATIONAL ACADEMIES

Ciência de animais de laboratório

Gene Therapy (2004) 11, S64–S66

Abrange:

- a biologia dos animais de laboratório e dos respectivos requisitos ambientais;
- padronização genética e microbiológica;
- prevenção e tratamento de doenças;
- aperfeiçoamento de técnicas experimentais;
- anestesia, analgésia e eutanásia;
- alternativas a experiências com animais;
- ética.

Princípios orientadores: os 3 R's (Replacement, Reduction and Refinement)

lançados com o livro 'The Principles of Humane Experimental Technique' de Russell and Burch (1959)

- **Substituição** (Replacement) dos animais vivos por outros modelos, nomeadamente técnicas in vitro (células, tecidos), modelos computacionais, etc.
- **Redução** (Reduction) do número de animais necessários à obtenção de respostas estatisticamente válidas, o que passa por:
 - ▶ padrões de uniformidade genética
 - ▶ padrões de uniformidade microbiológica
 - ▶ padrões de uniformidade nas manipulações
 - ▶ padrões de uniformidade climática e alimentar
 - ▶ padrões de uniformidade no conforto (espaço, "palha", etc.)
 - ▶ promoção do bem-estar por enriquecimento ambiental (estímulos, sociabilização)
 - ▶ uso prévio de análise de poder estatístico
- **Refinamento** (Refinement) das condições experimentais:
 - ▶ redução do desconforto indo ao encontro das necessidades comportamentais e fisiológicas em termos de alojamento e manejo experimentais
 - ▶ anestesia, analgésia e eutanásia adequadas
 - ▶ determinação de pontos de interrupção humanos (prevenção de sofrimento desnecessário)
 - ▶ garantia de proficiência dos experimentadores e tratadores (educação e treino especializados)

A falácia da padronização

- A medida de ouro da *validade externa dum experiência* não está forçosamente no controlo rigoroso das condições experimentais segundo um determinado padrão. Ela só se pode medir pela **reprodutibilidade** dos resultados entre experiências, entre laboratórios, entre estirpes.
- A verdadeira reprodutibilidade só se consegue com a **maximização do bem-estar**, e os meios de obtê-la podem até diferir entre laboratórios.
- Há condições experimentais que resistem ao controlo: instalações, comportamento dos humanos, ruídos.
- Não se pode assumir que o mutante reage da mesma maneira que o tipo selvagem às condições experimentais que são comuns a ambos.

- Outro problema da padronização está no **conflito com a Redução**: a única maneira de saber se os resultados obtidos numas certas condições são válidos é pela replicação das experiências. Ainda por cima, se nessa tentativa de replicação não se verificam, todos os animais sacrificados foram-no **em vão**, porque a investigação foi inconclusiva.
- Com custos acrescidos se essa inconclusividade só for reconhecida **depois da publicação** dos pseudo-resultados.
- Há quem defenda «nunca se deve replicar uma experiência bem sucedida». Porque será...

Enriquecimento ambiental

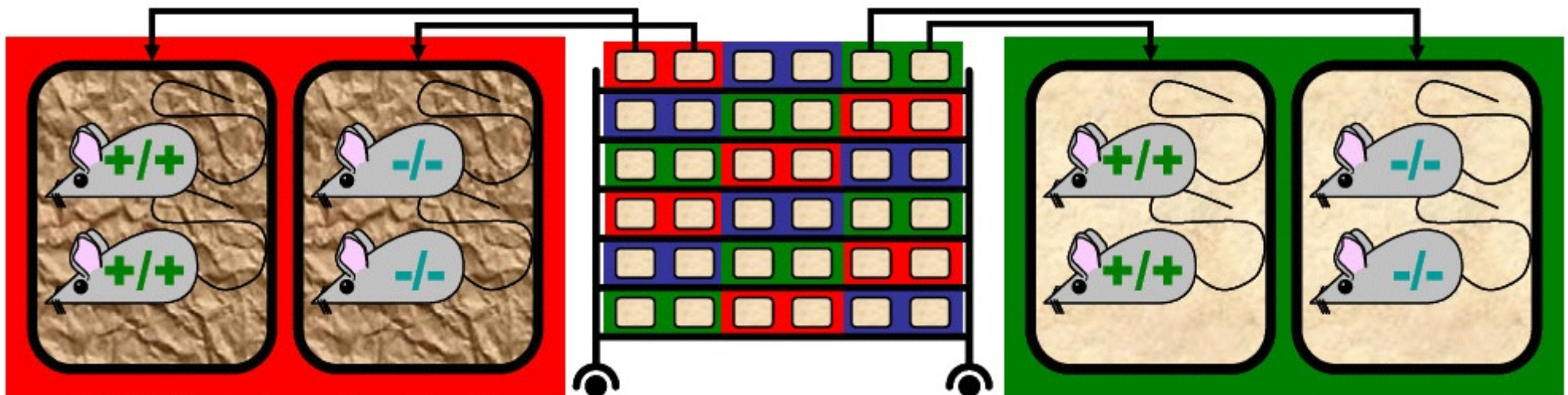
- Introdução de berlindes numa gaiola sem outros estímulos é um ***pseudo-enriquecimento***, e na verdade até fazem pior porque aumentam a ansiedade. Conclusão: o que parece ao investigador um melhoramento das condições não o é muitas vezes para o animal.
- A verdadeira reprodutibilidade só se consegue com a **maximização do bem-estar**. Que só é possível pelo conhecimento das necessidades de cada espécie, de cada estirpe, de cada mutante.
- Exemplo de bom enriquecimento: materiais para a **construção de ninhos** (papel higiénico, palha, papel triturado); paus para trepar; abrigos (embora estes, entre machos, possam estimular a territorialidade, induzindo comportamentos que interferem com o bem-estar); e introdução destes enriquecimentos de maneira faseada (elemento de novidade).

| Classification: | Pseudo-enrichments | | Conditionally beneficial enrichments | Beneficial enrichments |
|------------------------|----------------------|------------------------|---|-------------------------------|
| Biologically relevant? | No | No | Yes | Yes |
| Welfare benefits: | None | None | None to High: differs by individual, sex, strain, or management | High |
| Welfare detriments: | High to Low | Low to None | High to none: as above | Low to None |
| Welfare consequences: | Impaired | Impaired to unaffected | Impaired to benefited | Benefited |
| Mouse examples: | Marbles ¹ | ? | Shelters ² Cage ventilation ³ | Nesting material ⁴ |

Variação ambiental sistemática

Wrübel & Garner 2007 — Refinement, environmental enrichment and systematic randomization

- Introdução sistemática de variação ambiental **como parte inerente do desenho experimental**, para que se perceba a extensão da validade externa dos resultados.
- Não implica necessariamente o contrário da Redução, desde que se apliquem as boas lições do desenho experimental suportado pela Estatística, por exemplo (entre outras soluções) a subdivisão dos tratamentos por um pequeno número de blocos aleatoriamente distribuídos (as diferentes cores na figura abaixo), com repetições.



A relevância da experimentação animal

Questionada com base nos estudos toxicológicos
Greek et al. (2012) *BMC Medical Ethics* 13:16. doi:10.1186/1472-6939-13-16

«Se é problemático prever um resultado a partir dum sistema complexo e irreduzível, então prevê-lo com base noutra sistema complexo e irreduzível é praticamente impossível. No entanto, é isso exatamente o que se tenta fazer ao testar-se um potencial fármaco num murgancho ou num macaco, na tentativa de determinar o que fará num humano.»

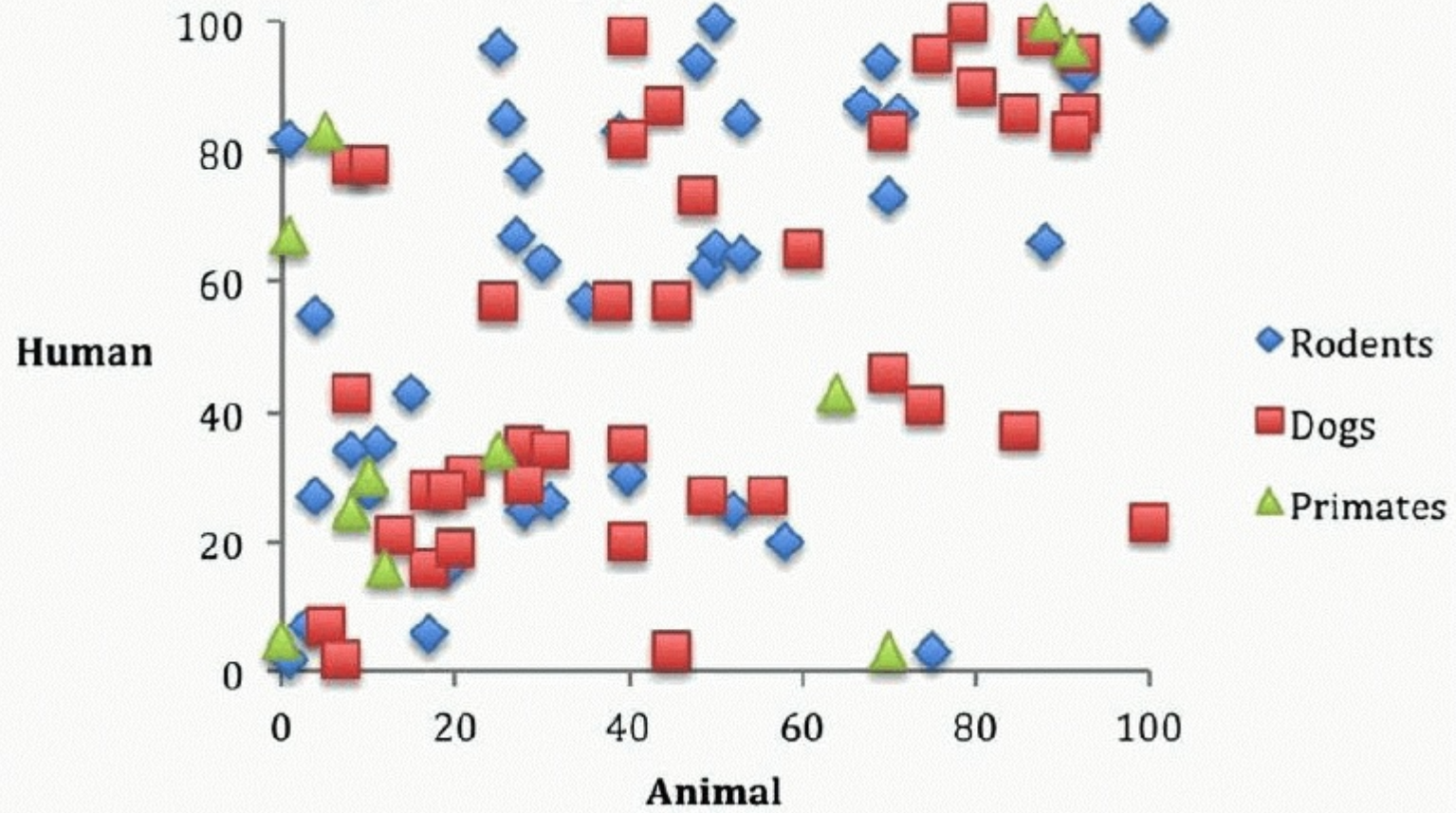
CYP 450 enzyme

| Family | Subfamily | Gene | | | | |
|--------|-----------|--------------|----------------|--------|------------------------|--------------------------------|
| | | Human | Monkey | Dog | Rat | Mouse |
| 1 | A | 1, 2 | 1, 2 | 1, 2 | 1, 2 | 1, 2 |
| 2 | A | 6, 7, 13 | 23, 24 | 13, 25 | 1, 2, 3 | 4, 5, 12, 22 |
| 2 | B | 6 | 17 | 11 | 1-3, 8, 12, 15, 21 | 9, 10, 13, 19, 23 |
| 2 | C | 8, 9, 18, 19 | 20, 74, 75, 76 | 21, 41 | 6, 7, 11-13, 22-24, 46 | 29, 37-40, 44, 50 |
| 2 | D | 6 | 1, 7, 42 | 15 | 1-5, 18 | 9-13, 22, 26, 34, 40 |
| 2 | E | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 3 | A | 4, 5, 7, 43 | 6, 8, 64, 66 | 12, 26 | 1, 2, 9, 18, 23, 62 | 11, 13, 16, 25, 41, 44, 57, 59 |

Three-way toxicity test results

| | | |
|-----|---|----|
| Man | Toxic effects found in man | 53 |
| | Toxic effects found in man only | 23 |
| Rat | Toxic effects also found in man | 18 |
| | Toxic effects not found in man | 19 |
| Dog | Toxic effects also found in man | 29 |
| | Toxic effects not found in man | 24 |
| Rat | 19 false positives 35 false negatives $Sn = 18 / (18 + 35) = 34\%$ $PPV = 18 / (18 + 19) = 49\%$ | |
| Dog | 24 false positives 24 false negatives $Sn = 29 / (29 + 24) = 55\%$ $PPV = 29 / (29 + 24) = 55\%$ | |

Variation in bioavailability among species



- Se os resultados em animais não são preditivos do que acontecerá nos humanos, ***os ensaios de Fase I são a forma mais arriscada de investigação humana***, e no entanto é realizada numa escala astronómica hoje, e há décadas.
- CITAR OS RESULTADOS DE ESTUDOS EM ANIMAIS PARA ACALMAR OS RECEIOS DAS COBAIAS HUMANAS **É ANTIÉTICO**.
- A opinião pública só irá apoiar a investigação com animais apenas se ela ajudar a desenvolver **melhores** fármacos.

- Em 2012, estima-se que a experimentação pré-clínica com animais, nos Estados Unidos, consome na ordem de 100000000000\$ por ano.
- «Cada \$ gasto em investigação com modelos animais é um \$ que não vai para investigação com humanos, nas ciências básica de Química e Física, ou na Engenharia. São estas áreas que se têm mostrado as mais produtivas para a descoberta de novos tratamentos e outras intervenções.»