

Modelos animais no estudo de doenças genéticas humanas

Felipe Tadeu Galante Rocha de Vasconcelos^{1*}, Laura Machado Lara Carvalho^{1*}, Lucas Santos e Souza^{1*}, Igor Neves Barbosa^{2*}, Carolini Kaid Dávila³, Mayana Zatz³, Mariz Vainzof³

¹Doutorando(a) do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biologia-Genética), Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP

²Mestrando do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biologia-Genética), Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP

³Pesquisadora do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Centro de Estudos do Genoma Humano e Células-Tronco, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP

*Felipe, Laura, Lucas e Igor contribuíram igualmente para o artigo.

Autor para correspondência - mvainzof@usp.br

Palavras-chave: modelos animais, genética humana, doenças genéticas, *zebrafish*, camundongo, cão, 3R's



Modelos animais são espécies não humanas que têm sido utilizadas em inúmeras pesquisas científicas, permitindo a compreensão do funcionamento de organismos vivos complexos, além do desenvolvimento de tecnologias aplicadas à saúde humana, como medicamentos, soros e vacinas. Esses modelos são utilizados na mimetização de doenças, na expectativa de se poder posteriormente utilizar o conhecimento gerado em humanos. Nesta leitura você poderá conhecer alguns dos principais modelos utilizados em experimentação, implicações éticas e legais do seu uso, além de exemplos de aplicações que contribuíram significativamente para a sociedade, principalmente no campo da genética humana.

Por que utilizar animais para estudar doenças humanas?

Ao longo da história, os estudos com animais permitiram melhor compreensão de aspectos de fisiologia, patologia, **farmacologia** e genética. Os modelos animais dão aos pesquisadores a possibilidade de experimentar em situações controladas e mimetizar condições biológicas complexas de um ser vivo, contribuindo para encontrar soluções para questões de saúde humana. A Figura 1 apresenta uma linha do tempo com alguns exemplos de avanços importantes a partir de estudos com animais no campo das ciências biomédicas.

Os experimentos com modelos animais contribuem para o conhecimento científico e melhorias na qualidade de vida, através do desenvolvimento de novos medicamentos e vacinas, bem como novas técnicas cirúrgicas e protocolos de administração de fármacos. Praticamente 90% das pesquisas laureadas com o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina utilizaram experimentos com animais.

Em genética, costuma-se usar modelos animais para identificar a função de genes e en-

tender como estão relacionados às doenças e a outras características fenotípicas. A partir da década de 1980, com o aperfeiçoamento das tecnologias de **biologia molecular** e **edição gênica**, houve uma explosão nas possibilidades de manipulação genética de animais modelo. Assim, pode-se, por exemplo, silenciar um gene específico e verificar o efeito resultante em escala molecular e fisiológica, como também observar as características visíveis a olho nu. Dessa forma, é possível avaliar se um **gene candidato** realmente é causador de uma doença. No extremo oposto, podemos aumentar a expressão, ou mesmo adicionar cópias de um ou mais genes, inclusive genes não pertencentes à espécie, e observar as consequências. Outras possibilidades são os **estudos funcionais** que investigam os mecanismos fisiopatológicos das doenças, além dos testes de novos tratamentos.

Com o advento recente de uma nova técnica muito eficaz e específica de edição gênica (**CRISPR**), aumentou consideravelmente o potencial de se obter resultados promissores para a sociedade a partir de estudos de doenças genéticas humanas utilizando modelos animais. Sobre a técnica de CRISPR, esta revista publicou dois artigos esclarecedores em 2017 (Carli e colaboradores; Souza e Pereira), de maneira que você pode consultá-los para entender melhor os mecanismos moleculares envolvidos e as implicações sociais.

Farmacologia - ciência que estuda como diferentes substâncias, os fármacos, interagem com o organismo e que resposta desencadeiam.

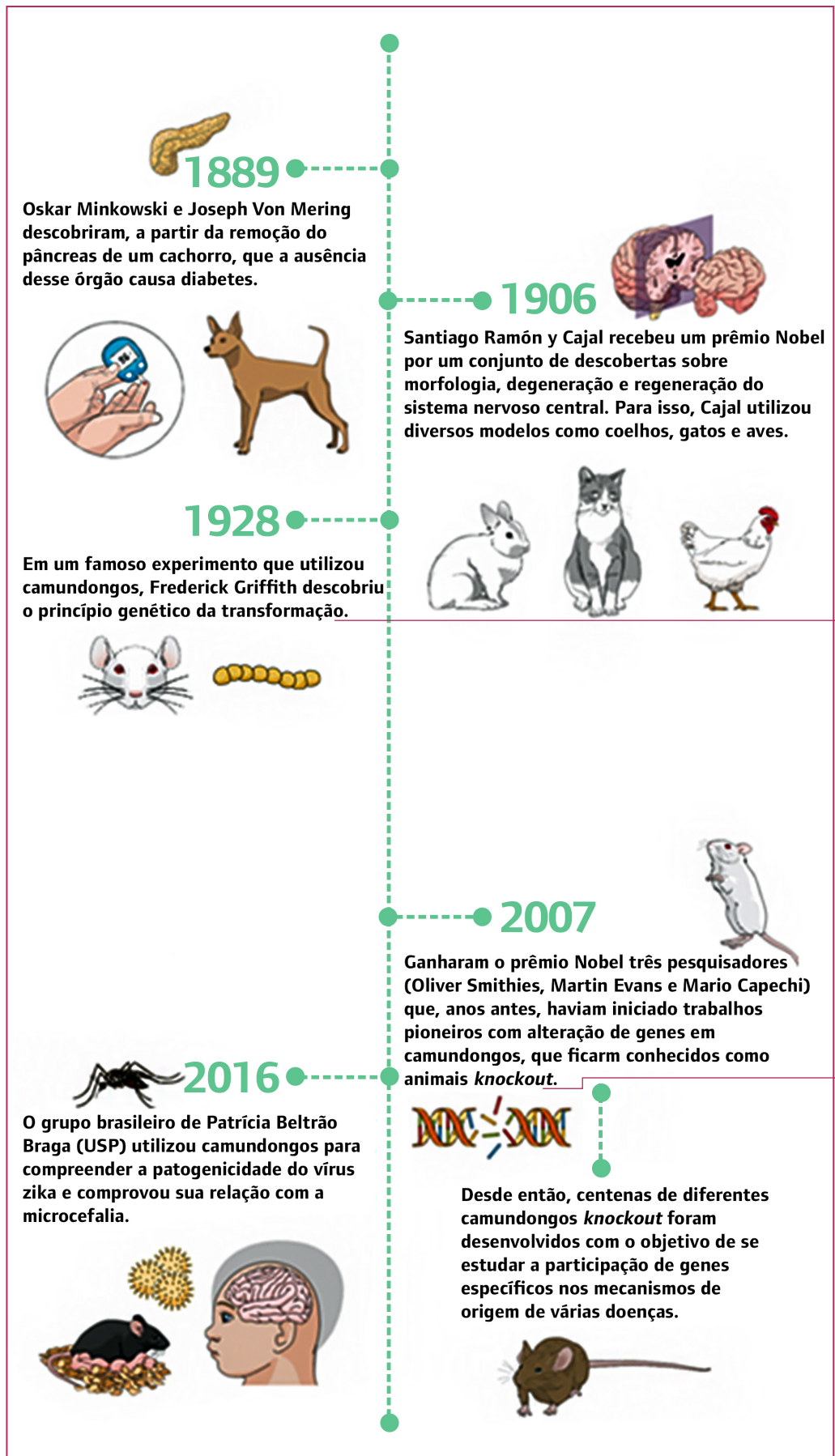
Biologia molecular - ciência que busca compreender a estrutura e o funcionamento de moléculas biológicas, em especial as que constituem o material genético.

Edição gênica - alteração artificial de sequência de DNA em organismo vivo.

Gene candidato - considera-se como candidato um gene para o qual há evidências preliminares de que possa estar relacionado mecanisticamente à manifestação de determinada doença ou característica. A relação do gene candidato com uma doença é uma hipótese que precisa ser confirmada ou refutada a partir de evidências experimentais complementares.

Estudos funcionais - no âmbito da genética, são estudos que buscam entender mecanisticamente a relação entre genes e seus fenótipos.

CRISPR - técnica de edição gênica que mimetiza mecanismos bacterianos de clivagem de DNA. A clivagem é seguida de reparo do DNA pela célula utilizada no experimento, o que frequentemente resulta em mutações. A sigla significa Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaciais (do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), em referência ao locus bacteriano que desencadeia tal mecanismo de combate a DNAs exógenos.



Princípio genético da transformação - também chamado de transformação bacteriana. Por esse processo, ocorre a captura de pedaços de DNA do ambiente e incorporação ao genoma da bactéria.

Animais *knockout* - animais em que ocorreu a inativação ou deleção de um gene.

Figura 1. Exemplos de experimentos com modelos animais que foram importantes para a humanidade.



Figura 2.

Monumento ao camundongo de laboratório, em um parque em frente ao Instituto de Citologia e Genética da Academia de Ciências da Rússia, na cidade de Novosibirsk. Observa-se um camundongo tricotando uma molécula de DNA, que representa a gratidão da humanidade pelo animal que é utilizado em pesquisas genéticas para entender mecanismos biológicos e desenvolver novas drogas e tratamentos para doenças. Autora: Irina Gelbukh (2013). Licença *Creative Commons* atribuída.

Apresentaremos a seguir três modelos animais muito utilizados nas pesquisas de doenças genéticas humanas: o *zebrafish*, o camundongo e o cão.

Zebrafish ou peixe-zebra (*Danio rerio*)

O *zebrafish*, também conhecido no Brasil como paulistinha, é um peixe de água doce que tem origem asiática.

À primeira vista, o *zebrafish* não se parece muito conosco, mas as aparências enganam. Cerca de 70% dos genes humanos têm pelo menos um **ortólogo** em *zebrafish* e, vários órgãos desse modelo são bastante similares aos dos humanos. Isso quer dizer que, se nos perguntarmos para que servem determinados genes humanos, muitas vezes estudá-los no modelo *zebrafish* poderá nos levar a respostas. Além disso, trata-se de um modelo relativamente barato e de rápido desenvol-

vimento. Em cerca de três meses, o *zebrafish* atinge a maturidade sexual e cada casal pode produzir de 200 a 300 ovos semanalmente. Outra vantagem é que os embriões são transparentes e se desenvolvem fora do corpo, o que permite a visualização macroscópica para estudo desse desenvolvimento.

Não só o desenvolvimento, mas também a fecundação ocorre fora do corpo, fazendo com que a edição gênica seja metodologicamente facilitada. Em contraste, a fecundação e o desenvolvimento de mamíferos ocorrem dentro do corpo das fêmeas, dificultando sua manipulação. A edição gênica é realizada a partir da injeção em ovos de substâncias necessárias para modificar parte específica do gene de interesse. Assim, é possível obter animais com mutação em um gene de interesse, o que é importante, por exemplo, para desenvolver um modelo de *zebrafish* com determinada doença, no qual podem ser testados novos tratamentos que poderão em longo prazo ser aplicados em humanos acometidos pela mesma patologia.

Ortólogo - genes que estão em espécies diferentes, mas possuem funções semelhantes e origem evolutiva comum.

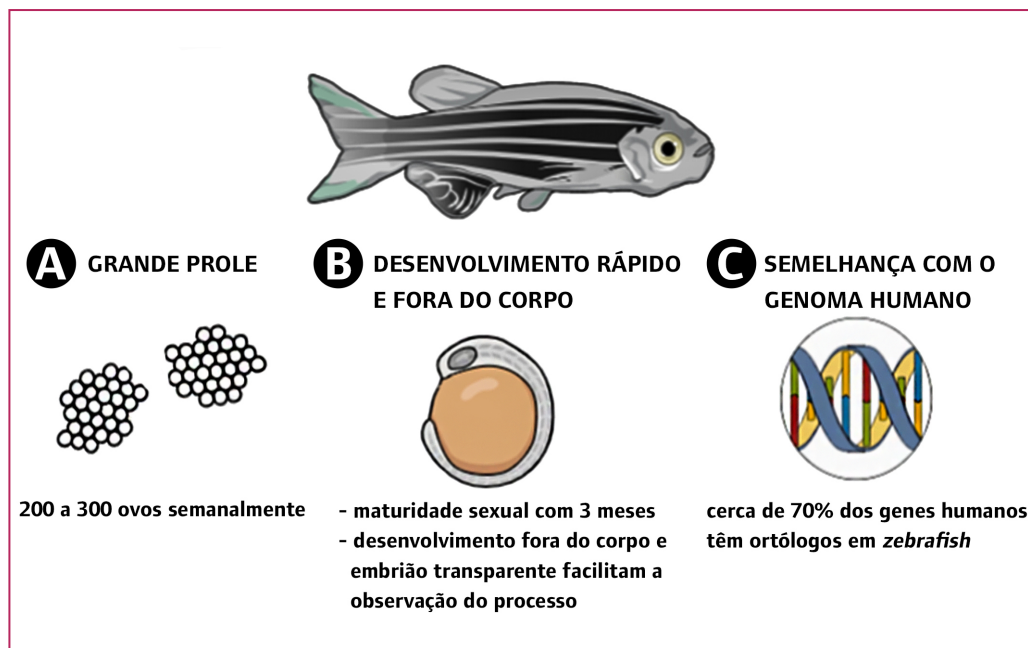


Figura 3. Alguns benefícios da utilização do *zebrafish* como modelo animal.

Outra utilidade é validar genes candidatos a doenças. Por exemplo, se for observado que alguns recém-nascidos com microcefalia têm mutação em certo gene, essa causalidade pode ser verificada em *zebrafish*. Pode-se editar o gene candidato no embrião de *zebrafish* para verificar se o peixinho expressará tal fenótipo (cabeça pequena) (Figura 4). Por exemplo, mutações nos genes *map11* e *cdc6*

induzidas pela metodologia CRISPR causaram microcefalia em *zebrafish* e o fenótipo em humanos é correspondente.

O *zebrafish* tem sido utilizado, por exemplo, em estudos sobre **distrofias musculares**, obesidade, câncer, **albinismo ocular**, microcefalia, **fendas orofaciais**, doenças hepáticas, surdez etc.

Distrofias musculares - grupo de doenças caracterizadas por fraqueza progressiva e perda de massa muscular.

Albinismo ocular - forma de albinismo que leva à falta de pigmentação da íris, prejudicando a visão.

Fendas orofaciais - malformações no palato (céu da boca) e/ou lábio.

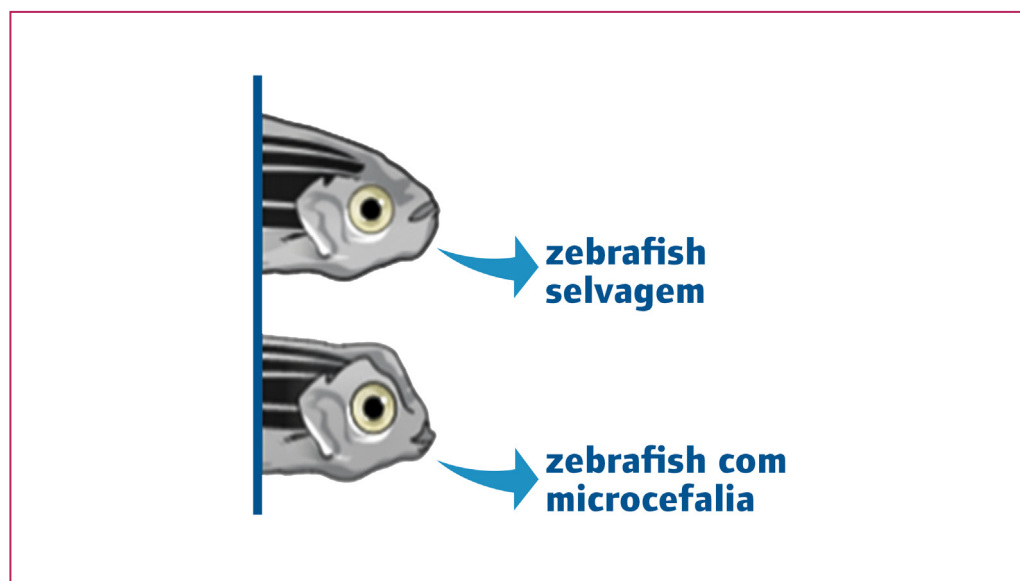


Figura 4. Microcefalia em *zebrafish*.

Roedores

O uso de roedores como modelo em pesquisa experimental já data de mais de um século e há muitas razões para isso: disponibilidade, facilidade de manuseio e cuidado, alta prolificidade (com gestações que resultam em vários filhotes por ninhada), e relativo baixo

custo. As **linhagens selvagens** de camundongo, por exemplo, têm entre cinco e dez filhotes por ninhada e cada fêmea pode ter até cinco ninhadas ao longo da vida.

Entre os roedores utilizados estão os camundongos, ratos, hamsters, porquinhos-da-índia e gerbis. Mas os mais utilizados são ratos e camundongos.

Linhagens - grupos de indivíduos de uma espécie cujos organismos apresentam a mesma composição genotípica e que geram descendentes com essa mesma composição quando entrecruzados.

Linhagens selvagens - formas típicas, como ocorrem na natureza.

A GRANDE NINHADA E GESTAÇÃO CURTA

- 5 a 10 filhotes por ninhada
- gestação de 21 dias
- ↓ fecundidade das fêmeas após 9 meses; elas raramente têm mais de cinco ninhadas ao longo da vida

B FÁCIL CUIDADO

- pequeno porte
- adaptação a ambientes variados
- docilidade
- fácil manuseio

C SEMELHANÇA COM O GENOMA HUMANO

cerca de 80% dos genes de camundongos têm ortólogos em humano

Figura 5. Benefícios de se utilizar o camundongo (*Mus musculus*) como modelo animal.

As linhagens dos animais de laboratório podem ser divididas em dois grandes grupos:

1. heterogênicas - *outbred*, não consanguíneas
2. isogênicas - *inbred* ou consanguíneas

Animais não consanguíneos são os que apresentam na constituição genética uma alta taxa de heterozigose (~99%), o que faz com que seja mantida uma grande diversidade genética e fenotípica num grupo de animais.

Um animal isogênico é o produto de pelo menos 20 gerações consecutivas do acasalamento entre irmãos, ou pais e filhos. Utilizando esse tipo de acasalamento, conseguimos obter um índice de homozigose de 99%, o que torna tais animais os mais semelhantes entre si que se pode obter.

As linhagens isogênicas são de especial interesse para os grupos de pesquisa pois apresentam um conjunto único de características. Mas, por que isso é interessante? Imagine que se pretende comparar um grupo de animais em que foi utilizada determinada terapia com um grupo em que não se utilizou. É importante, nesse caso, que ambos os grupos sejam geneticamente parecidos, porque variações genéticas poderiam interferir nos resultados do experimento. Ao se comparar um grupo de animais que teve um gene editado com um grupo não editado, deve-se seguir o mesmo raciocínio: é importante que os animais que os originaram tenham uma constituição genética muito próxima pois, do contrário, variantes em outros genes que não o editado podem interferir fenotipicamente, atrapalhando a análise dos resultados do experimento.

Doenças neurodegenerativas

- doenças nas quais ocorre perda progressiva da estrutura e do funcionamento dos neurônios.

Alzheimer - transtorno que causa a deterioração cognitiva e da memória, além de alterações comportamentais que comprometem a vida diária.

Neurodesenvolvimento - desenvolvimento físico e psíquico do sistema nervoso.

Imunodeprimido - indivíduo que tem baixa resposta imunológica devido a uma condição patológica.

Existem mais de mil linhagens diferentes de camundongos. E muitas delas são modelos para doenças humanas como câncer, **doenças neurodegenerativas** (como **doença de Huntington** e o **Alzheimer**); **neuromusculares** (como as distrofias musculares); do **neurodesenvolvimento** (como autismo); imunodeficiências, **doenças autoimunes**, obesidade, entres outras.

Uma outra razão pela qual camundongos são amplamente utilizados como modelos em pesquisa experimental é a alta similaridade com o genoma do ser humano, havendo semelhança de aproximadamente 85% nas regiões codificadoras de proteínas. Alguns genes apresentam quase 100% de equivalência. Além disso, cerca de 80% dos genes desses dois genomas são ortólogos.

Uma linhagem relevante nas pesquisas biomédicas é a *nude* (Figura 6). Ela apresenta uma mutação espontânea em homozigose no gene *Foxn1*, o que acarreta defeitos na produção das células do timo - glândula localizada no tórax que é responsável pela maturação de células do sistema imune. Em decorrência da ausência do timo, trata-se de um animal **imunodeprimido** e isso faz com que esse modelo seja amplamente utilizado para estudar diversos mecanismos, sem interferência do sistema imune. Além disso, apresenta deficiência na produção dos pelos, por isso a ausência de pelagem.

Doença de Huntington - doença genética que acomete progressivamente o sistema nervoso central, causando movimentos involuntários, alterações comportamentais e declínio cognitivo.

Neuromusculares - doenças neuromusculares são aquelas que afetam, direta ou indiretamente, a função muscular, isto é, incluem patologias intrínsecas do músculo e também aquelas do sistema nervoso que afetam o comando das contrações musculares.

Doenças autoimunes - são caracterizadas por respostas imunológicas contra estruturas do próprio organismo.



Figura 6. Camundongo *nude*.

Os pesquisadores aproveitam que os camundongos *nude* não apresentam uma boa resposta imunológica para fazer experimentos sobre câncer. É possível inserir um pedaço de tumor humano no animal, pois o organismo do modelo *nude* não reage adequadamente para combatê-lo. Assim, pode-se observar tanto o desenvolvimento de tumores derivados de pacientes humanos quanto testar a resposta a diferentes tratamentos.

Alopecia - também chamada de calvície, é a perda ou ausência de cabelo.

Mutação sem sentido - variante genética na qual um códon que levaria à inclusão de um aminoácido à cadeia polipeptídica é alterado, passando a sinalizar o término da tradução, isto é, torna-se um códon de parada (no RNA: UAG, UAA ou UGA).

Distrofina - proteína muscular que liga o citoesqueleto da célula do músculo a um complexo de proteínas de membrana que, por sua vez, interage com o colágeno extracelular.

Multifatorial - diz respeito a características cujas manifestações resultam de interações entre múltiplos fatores genéticos e ambientais.

Mutações homozigóticas no gene *FOXP1* em humanos também são muito prejudiciais, causando desde problemas na pele e **alopecia congênita** até deficiência do sistema imunológico, o que torna essas pessoas muito suscetíveis a infecções.

Existem algumas linhagens de camundongos que são utilizadas para estudar diferentes doenças neuromusculares. Uma delas é a linhagem *Dmd^{mdx}* para **Distrofia Muscular de Duchenne**, que tem uma mutação espontânea do tipo **mutação sem sentido** no gene *Dmd* murino, o que faz com que não haja a produção da proteína **distrofina** no músculo esquelético desses animais. Entretanto, diferentemente dos humanos, nos camundongos *Dmd^{mdx}* o quadro clínico é muito leve e a sobrevivência é bastante próxima da normal. Nos humanos, a Distrofia Muscular de Duchenne se manifesta em meninos desde os primeiros anos de vida e se caracteriza pela **degeneração** muscular progressiva, com perda da força muscular com uma série de consequências que comprometem a expectativa e a qualidade de vida.

Além dos modelos espontâneos de camundongo, também os modelos induzidos são muito úteis em pesquisas biomédicas. Uma das abordagens com esse tipo de modelo é o de validação de genes candidatos a diversas doenças. Um exemplo é o autismo, que é uma condição que pode ter origem monogênica ou **multifatorial**. Quando se tem um gene candidato para determinada forma de autismo, pode-se editar esse gene em camundongos e verificar se os animais apresentam características semelhantes às dos pacientes humanos. Um dos testes que pode ser feito para avaliar o comportamento social dos camundongos é o chamado teste de sociabilidade três câmaras (Figura 7). Nele, o camundongo central é observado pelos pesquisadores e suas ações são quantificadas. Entre os parâmetros avaliados, estão o tempo de exploração da gaiola, número de vezes e tempo gasto na interação com os outros camundongos etc.

Congênita - condição que, independentemente da sua causa, já se apresenta ao nascimento.

Distrofia Muscular de Duchenne - doença genética causada por variantes deletórias no gene da distrofina. Trata-se do tipo mais comum de distrofia muscular.

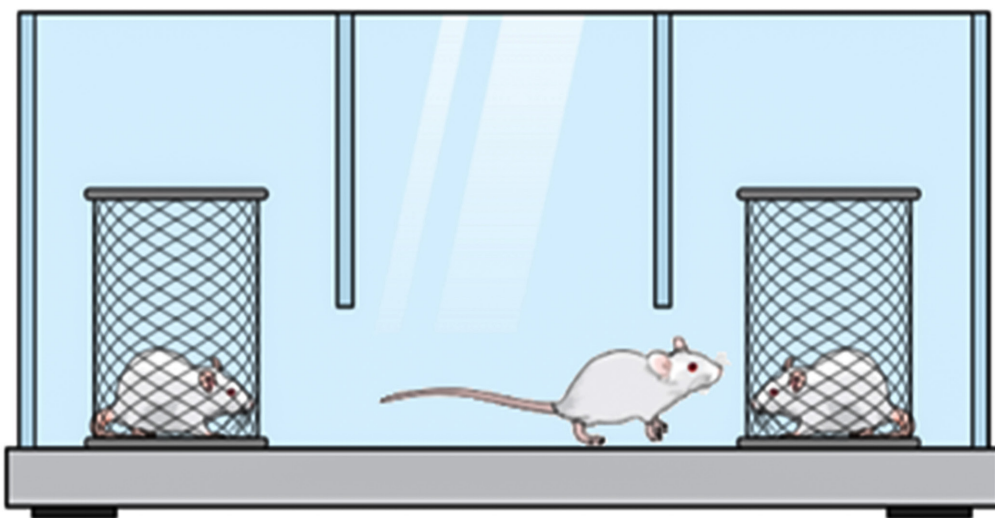
Murino - referente ao grupo *Murinae*, do qual fazem parte os camundongos.

Degeneração - deterioração de um tecido ou órgão.



Teste de sociabilidade três câmaras

Normalmente, os roedores preferem passar mais tempo com outro roedor e investigam um novo indivíduo mais do que um familiar (novidade social). Com base nessa tendência, este teste é útil para avaliar o comportamento social dos animais. Nele, a gaiola é dividida em três câmaras com aberturas entre elas. Após a habituação à câmara vazia (a do meio), o animal em análise encontra outros indivíduos nas outras câmaras. O tempo gasto cheirando cada animal, o tempo gasto em cada câmara e o número de entradas são registrados e analisados.



É aplicável, por exemplo, a estudos envolvendo autismo, efeito de medicamentos na sociabilidade, comportamento parental e interesse em novidades sociais.

Figura 7.
Teste de sociabilidade.

Cão (*Canis lupus familiaris*)

Por que utilizar o melhor amigo do homem em pesquisas? Existem pelo menos 450 doenças que surgem espontaneamente em cães e 80% delas também afetam humanos. Além disso, em muitos casos, a manifestação dessas doenças nos cães é comparável ao que ocorre em humanos - considerando sua complexidade social, comportamental, e do ambiente em que estão inseridos - e, assim sendo, o **potencial translacional** do modelo canino para o estudo de doenças humanas é

maior que de outros modelos que são mais utilizados como, por exemplo, camundongos e zebrafish.

A resposta imune dos cães tem maior similaridade com a do humano do que outros modelos. Além disso, o tamanho maior dos cães torna-os fisiologicamente mais próximos dos humanos. Isso contribui, por exemplo, para mimetizar melhor a **biodistribuição** de fármacos em um tratamento experimental. Afinal, a biodistribuição tende a ser facilitada no corpo de animais menores. Muitos medicamentos testados em pequenos animais podem não alcançar seus alvos moleculares em humanos com a mesma eficácia, já que somos muito maiores, o que é uma barreira translacional.

Potencial translacional - potencial de gerar informações ou ferramentas aplicáveis à saúde humana.

Biodistribuição - passagem de um fármaco da corrente sanguínea para os tecidos. É afetada por fatores fisiológicos e propriedades físico-químicas do próprio fármaco.

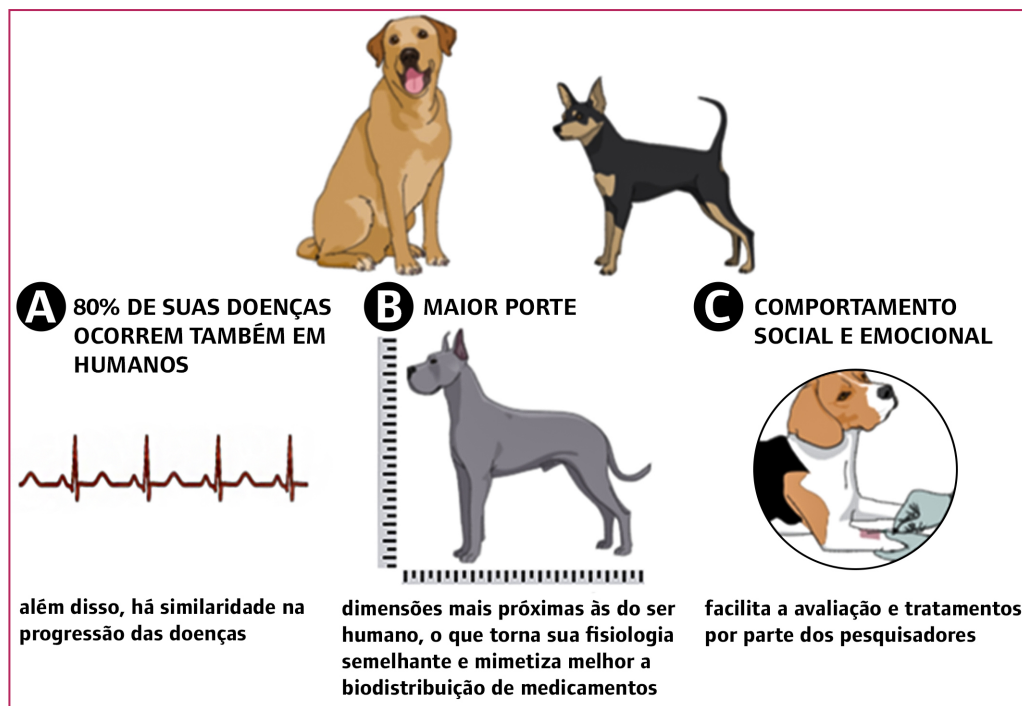


Figura 8. Alguns benefícios de se utilizar o cão como modelo animal.

A variação genética entre cães de raças diferentes é maior que entre os da mesma raça. Assim sendo, cada raça de cão possui uma alta homogeneidade de fenótipo, em grande parte por causa do processo de **seleção artificial** conduzida por humanos para gerar animais com características desejadas em aparência e comportamento. No entanto, esse processo de seleção imposto por criadores acabou gerando também uma alta frequência de doenças genéticas em cães ditos “de raça/ pedigree”. Isso acontece porque a consanguinidade propicia uma maior probabilidade de ocorrer em homozigose alelos recessivos potencialmente patogênicos, ou seja, cães ditos “de raça” são mais propensos a certas doenças (as autossômicas recessivas) que os sem raça definida (ditos “vira-latas”). Isso abre oportunidades na pesquisa científica para elucidar a relação entre genes e doenças.

Doenças são causadas por alterações genéticas, condições ambientais, ou por uma interação entre variantes genéticas e o ambiente. Os cães domésticos compartilham, em grande parte, do mesmo ambiente que os seres humanos e, em consequência, disso podem desenvolver diversas patologias que nos afetam, já que estão expostos a microrganismos, poluentes, toxinas e outras variáveis am-

bientais. O mesmo não ocorre com animais mantidos em **biotérios** especializados com ambiente rigidamente controlado (quanto à temperatura, dieta, luminosidade, condições sanitárias etc.). Embora em muitos contextos científicos o ambiente controlado seja positivo para o sucesso do experimento, é importante avaliar também uma intervenção em um ambiente mais comparável ao do ser humano e, nesse caso, o cão doméstico tende a reproduzir melhor o que acontece conosco.

A sociabilidade e o comportamento emotivo dos cães facilitam a avaliação clínica das condições de saúde e intervenções terapêuticas, pois eles expressam mais claramente dor e incômodo. Essas características também permitem que os próprios donos consigam relatar a melhora ou a piora dos cães, o que também pode facilitar a detecção de efeitos colaterais e efetividade de tratamentos a longo prazo.

Apesar das vantagens apresentadas, os estudos com cães não são tão frequentes e as principais razões são a dificuldade de se obter o número necessário de indivíduos com a condição estudada (o que é importante para que os resultados sejam estatisticamente significativos) e o alto custo de manutenção de

Biotérios - ambientes em que são mantidos animais em condições adequadas à utilização em experimentos científicos ou produção biotecnológica (ex.: de vacinas e soros).

Seleção artificial - processo pelo qual humanos selecionam animais ou plantas com características desejáveis para efetuar cruzamentos, com o objetivo de obter organismos com fenótipos desejados.

um canil - desde a alimentação, contratação de pessoal especializado (como médicos veterinários e cuidadores), à alocação de espaço físico adequado e limpeza.

Um bom exemplo de modelo canino para o estudo de uma doença humana é a Distrofia Muscular em Golden Retrievers (GRMD), que ocorre por mutação espontânea no gene da distrofina. Ao contrário do camundongo

Dmd^{mdx}, que tem um quadro leve, os cães GRMD têm uma progressão clínica comparável com a Distrofia Muscular de Duchenne em humanos. Em ambos os casos (cão e humano), os afetados têm perda progressiva de massa muscular e a doença culmina na morte por insuficiência respiratória ou cardíaca em idade prematura. Por isso, esse modelo canino mimetiza melhor tal condição humana que o modelo *Dmd^{mdx}* murino (Figura 9).

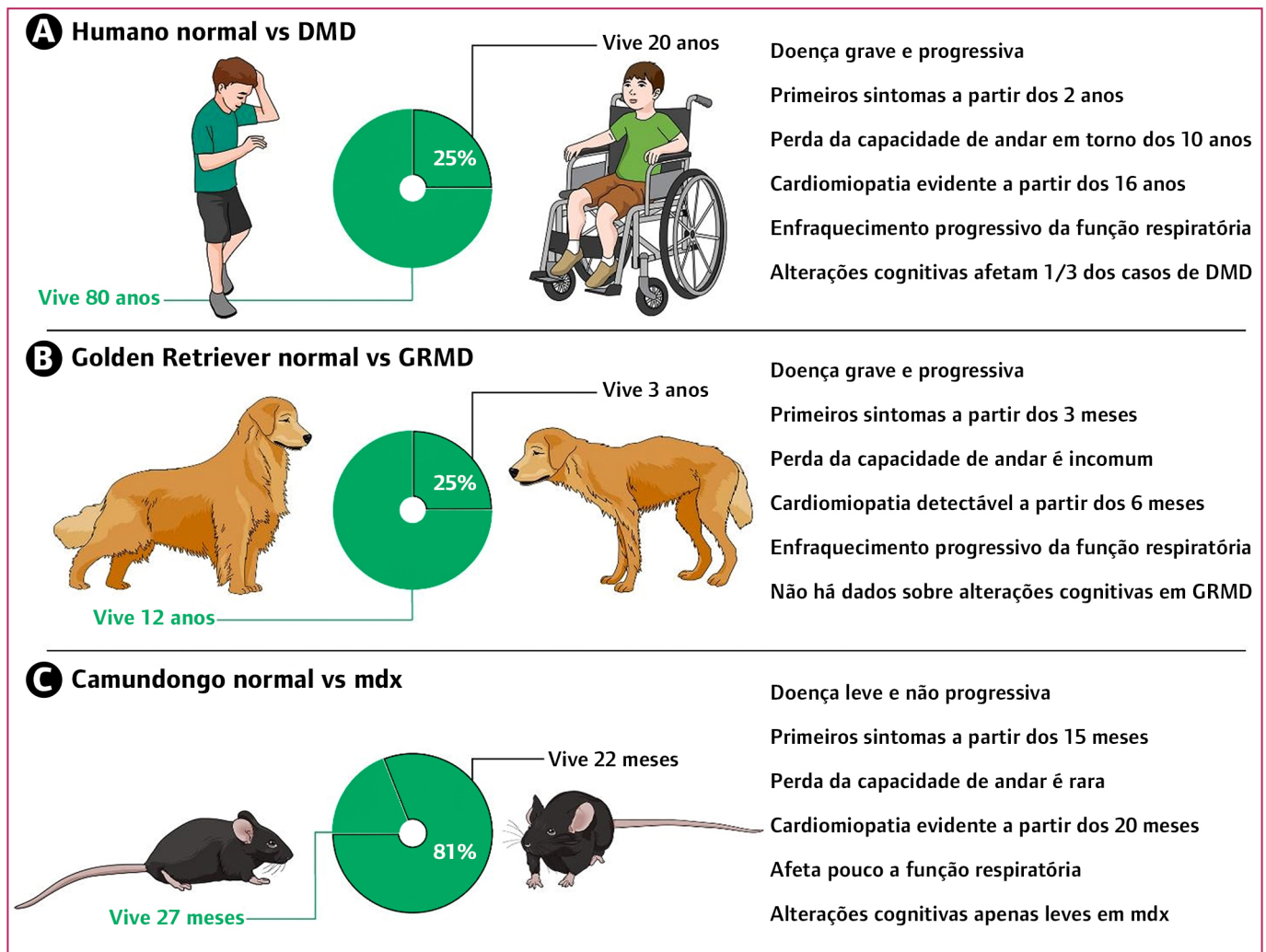


Figura 9. Análise comparativa entre modelos de Distrofia Muscular de Duchenne.

Recentemente, percebeu-se que uma variante genética rara no gene *JAGGED1*, quando presente no modelo GRMD, é protetiva para a progressão da doença, isto é, animais com variante patogênica no gene da distrofina tinham uma melhor qualidade de vida (mais semelhante à dos cães selvagens) se apresentassem também a variante em *JAGGED1*. Os pesquisadores agora procu-

ram estudar o gene *JAGGED1* para tentar encontrar soluções técnicas terapêuticas para a Distrofia Muscular de Duchenne em humanos. Esse tipo de descoberta pode ajudar no desenvolvimento de novas terapias para esta e outras doenças, tendo como alvo genes que podem impedir que o indivíduo desenvolva a patologia, os chamados “genes protetores”.

Os cães também são um interessante modelo para avaliar tratamentos de câncer. A partir de um estudo de **necropsias** de 2000 cães descobriu-se que 23% do total e 45% daqueles acima de 10 anos morreram de câncer. Outro estudo, realizado pelos grupos de Mayana Zatz e Oswaldo Keith Okamoto, da Universidade de São Paulo, avaliou o potencial do vírus Zika para combater células tumorais do sistema nervoso central e os cães foram um dos modelos utilizados. Sabia-se até então que esse tipo de vírus causa microcefalia em bebês durante a gestação por atacar **células progenitoras neuronais**, mas que não há prejuízo neuronal em indivíduos adultos infectados. O resultado deste estudo mostrou que o vírus Zika é capaz de reduzir tumores cerebrais, o que pode ser uma possível terapia para cânceres no cérebro.

ou linhagens disponíveis. Um modelo inadequado pode implicar em resultados pouco confiáveis ou um menor potencial translacional.

Não há um melhor modelo animal para pesquisas envolvendo doenças genéticas humanas. Há modelos mais adequados a depender do tipo de doença, objetivo do estudo e infraestrutura disponível (espaço físico, dinheiro e equipamentos). E não se pode presumir que uma espécie é melhor por ser geneticamente mais semelhante aos humanos, ainda que esse possa ser um bom ponto de partida caso as evidências na literatura científica ainda sejam escassas para fundamentar uma escolha, por isso, é preciso verificar se alguma pesquisa anterior indicou que determinada espécie poderia ser inadequada para o tipo de estudo pretendido.

Necropsias - exame de cadáver para determinar a causa da morte.

Células progenitoras neuronais - células que se diferenciam nas células maduras do sistema nervoso (neurônios, astrócitos e oligodendrócitos).

Como escolher um modelo animal?

Cada modelo animal tem suas particularidades (Figura 10). Uma escolha criteriosa do modelo animal é um ponto fundamental do planejamento da pesquisa. A decisão por um modelo específico depende dos objetivos do projeto e deve ser tomada com base em argumentos científicos e verificação de características intrínsecas das opções de espécies

Sabemos que naturalmente existem diferenças entre humanos e modelos animais e, a depender do modelo, uma mutação em um gene pode ser patogênica em humanos, mas ter consequências mínimas em animais no contexto clínico, isto é, alterações fenotípicas imperceptíveis ou mesmo inexistentes. A escolha do melhor modelo depende de que pergunta queremos responder e de que maneira podemos extrapolar e aplicar os resultados obtidos à espécie humana.




| | zebrafish | camundongo | cão |
|--------------------------------|---|---|---|
| |  |  |  |
| Prolificidade | 200-300 ovos/semana | 5-10 filhotes/ninhada | muito variável |
| Tempo de gestação | - | 21 dias | 58-68 dias |
| Maturidade sexual | 3 meses pós-fertilização | 6-8 semanas pós-parto | 6-9 meses |
| Expetativa de vida | média de 3,5 anos | média de 2 anos | 10-13 anos |
| Comprimento do adulto | 1,8-3,8 cm | 8,2-8,7 cm (sem cauda) | 15-110 cm |
| Custo | \$ | \$\$ | \$\$\$ |
| Potencial translacional | + | ++ | +++ |

Figura 10. Comparações entre zebrafish, camundongo e cão.

Em casos de divergência funcional entre animais e humanos, pode-se procurar aperfeiçoar o uso do modelo a fim de responder às questões centrais da pesquisa. Um exemplo é o caso do camundongo duplo mutante $Dmd^{mdx}/Large^{myd}$ desenvolvido em 2013 pelo grupo de pesquisa coordenado por Mariz Vainzof da Universidade de São Paulo. Enquanto o camundongo Dmd^{mdx} apresenta as mesmas características genéticas e bioquímicas que pacientes humanos com Distrofia Muscular de Duchenne, a fraqueza muscular é um componente que não está presente de forma muito evidenciada, ou seja, tal modelo não manifesta todos os aspectos funcionais da doença. Então os animais Dmd^{mdx} foram cruzados com animais com mutação (também espontânea) no gene *Large1* (relacionado a uma outra forma de distrofia muscular). A linhagem obtida, $Dmd^{mdx}/Large^{myd}$, apresenta grave e progressiva fraqueza muscular, semelhante ao que acontece em humanos, associada a deficiência de distrofina no músculo, de forma que é um modelo para estudo das distrofias musculares em geral.

Há um debate a respeito da usabilidade e confiabilidade dos animais para modelagem de algumas características humanas. Parte dos críticos argumenta que, mesmo em casos em que há grande similaridade genética, algumas características podem não ser tão similares. Sobre isso, cabe dizer que a **reprodutibilidade** de estudos nos quais são usados modelos animais, que são organismos complexos, depende de um rigoroso controle de variáveis que podem influenciar nos resultados. Essas variáveis podem ser o **background genético** de uma linhagem, tipo de alimentação oferecida, controle do ciclo de dia/noite, exposição a fatores estressantes, como barulho etc. Os animais de experimentação, sempre que possível, devem ainda ser mantidos em biotérios cuja estrutura e responsáveis pelo seu cuidado sejam adequadamente preparados para seu uso em pesquisa. Dessa forma, reduz-se a chance de observações experimentais contraditórias.

Vale a pena lembrar que toda **pesquisa clínica** realizada em humanos para validação de qualquer medicamento é precedida pela experimentação em modelos animais. A

quantidade de trabalhos científicos em todo o mundo em que foram usados modelos animais em seu desenvolvimento para uma infinidade de aplicações e todos os avanços que propiciaram à sociedade, como medicamentos, vacinas, técnicas etc, não deixam dúvidas de que são importantes ferramentas quando usados corretamente.

Aspectos legais da experimentação animal no Brasil

No Brasil, todos os projetos de ensino ou pesquisa que envolvam animais vertebrados devem passar por uma apreciação ética prévia da CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) da instituição na qual os animais serão utilizados. Trata-se de um procedimento obrigatório. As CEUAs são credenciadas e reguladas por um órgão hierarquicamente superior, o CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), que está vinculado ao Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovações do governo federal. Somente após a aprovação do projeto pela CEUA podem ser iniciados experimentos envolvendo animais. A apreciação ética da CEUA envolve a verificação de que o plano de trabalho proposto pelos pesquisadores está de acordo com legislação vigente, sobretudo a Lei nº. 11.794/2008, conhecida como **Lei Arouca**.

De maneira geral, a apreciação ética envolve as seguintes verificações:

1. A real necessidade da realização do experimento, tendo em vista os benefícios que poderia trazer à sociedade:
 - Vale a pena investigar/solucionar o **problema de pesquisa** em questão?
 - Foi verificado se alguém já solucionou ou estudou esse problema anteriormente?
 - Quais benefícios a pesquisa trará?
 - Que parcela da população e que segmentos da economia serão beneficiados?

Reprodutibilidade

- característica de um experimento científico passível de ser reproduzido novamente apresentando resultados equiparáveis aos de execuções anteriores. Trata-se de uma condição importante para que os experimentos científicos tenham credibilidade, pois é preciso evitar conclusões errôneas a partir de efeitos aleatórios, erros de análise ou mesmo manipulações inadequadas.

Lei Arouca - é assim conhecida por ser de autoria do Deputado Sergio Arouca. Link de acesso a essa legislação: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/11794.htm

Background genético -

“fundo genético”; composição genética de uma linhagem ou espécie (todos os alelos do genoma), excluindo-se o(s) gene(s) de interesse do estudo.

Problema de pesquisa -

questão para a qual se buscam respostas em uma pesquisa científica.

Pesquisa clínica -

testes realizados em humanos, após etapas prévias em modelos animais, para averiguar a segurança e a eficácia de uma intervenção (vacinas e medicamentos).

2. Se o projeto de pesquisa segue o princípio dos 3R's, que será apresentado mais adiante;
3. Se há pessoas na equipe capacitadas tecnicamente para os procedimentos propostos.

Além disso, a Lei Arouca proíbe a utilização de animais em atividades educacionais de primeiro e segundo graus, ficando restrita somente a estabelecimentos de ensino superior ou de educação profissional técnica da área biomédica.

A Lei Arouca também prevê sanções legais às pessoas físicas (pesquisadores) e jurídicas (instituições) que transgredirem essa legislação. As sanções variam entre advertência, multa, interdição, impedimento temporário ou definitivo do exercício da atividade com animais e suspensão de financiamentos provenientes de fontes oficiais de crédito e fomento científico.

Os princípios dos 3R's

Os Princípios dos 3Rs compõem uma norma técnica proposta em 1959 por William Russell e Rex Burch e amplamente difundida entre os países para uso de animais em pesquisas. Baseia-se em três pilares: “reduzir, substituir e aprimorar/refinar” (do inglês: *reduction, replacement and refinement*) (Figura 11). É imperativa, de acordo com esses princípios, a reflexão de sempre tentar reduzir o número de animais por procedimento experimental, substituir sempre que possível o uso de animais e aprimorar métodos para minimizar o desconforto animal.

Para minimizar o desconforto animal, utilizam-se, por exemplo, instalações limpas e adequadas (em espaço, temperatura, com disponibilidade de água, alimento, etc), além de sedativos, analgésicos ou anestésicos durante eventuais procedimentos que poderiam causar dor. Também é preciso que os pesquisadores que os manipulam tenham passado por treinamento prévio de capacitação e recomendável que não utilizem cosméticos que

possam ter odores durante os procedimentos com animais, porque isso causa desconforto.

Uma opção bastante factível de substituição de animais, especificamente para fins de ensino, são vídeos e técnicas modernas de apresentação 3D em computador, pois permitem a demonstração de fenômenos fisiológicos. Além disso, o uso de bonecos realísticos para treinamento de estudantes da área de saúde (por exemplo, na realização de suturas) são aliados muito interessantes na redução do uso desnecessário de animais nas aulas práticas.

Do ponto de vista da pesquisa científica, além das melhorias que têm ocorrido no desenvolvimento de melhores modelos animais, um grande esforço está sendo dedicado à busca de abordagens alternativas ou mesmo prévias ao uso de animais: **culturas celulares**, abordagens **in vitro** e o uso de **células-tronco** para diferenciação no tecido de interesse.

Quando nos referimos a “abordagens prévias”, quer dizer que resultados pouco promissores nesses ensaios preliminares podem levar à desistência de se seguir avaliando tal hipótese, excluindo a necessidade de se testar em animais. No entanto, cabe dizer que nenhum processo vivo ocorre isoladamente. Portanto, em algumas situações, os estudos envolvendo animais tendem a mimetizar melhor a complexidade dos processos biológicos de organismos vivos.

Para saber mais

ANDERSEN M. L., WINTER L. M. F. Animal models in biological and biomedical research - experimental and ethical concerns. *AnAcadBras Cienc.* v. 91, 2019. doi:10.1590/0001-3765201720170238.

CARLI, G. J., SOUZA, T. A. J., PEREIRA, T. C. A revolucionária técnica de edição genética “CRISPR”. *Genética na Escola.* v. 12, n. 2, p. 114-123, 2017.

SOUZA, T. A. J., Pereira, T. C. O impacto na sociedade da tecnologia de edição gênica com base no sistema CRISPR-Cas9. *Genética na escola.* v. 12, n. 2, p. 124-131, 2017.

Modelos animais na pesquisa em DMD #Fala, Mariz!
- Com Mariz Vainzof: <https://youtu.be/y5uk33rYlrs>

Culturas celulares - são conjuntos de células desenvolvidas sob condições controladas em ambientes artificiais.

In vitro - expressão latina que designa experimentos da área biológica que têm lugar fora de sistemas vivos como, por exemplo, em tubos de ensaio.

Células-tronco - células que conseguem se diferenciar e se transformar em diversos tipos celulares.



R1 *REPLACEMENT* SUBSTITUIÇÃO

sempre que possível, substituir experimento com animais por outra metodologia

R2 *REDUCTION* REDUÇÃO

utilizar estritamente o número necessário de animais para o experimento

R3 *REFINEMENT* APRIMORAMENTO

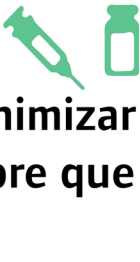
aprimorar protocolos experimentais para minimizar a dor ou o estresse sempre que possível 

Figura 11.
A norma técnica dos 3R's.

Ilustrações

As figuras 1 e 3 a 11 foram produzidas pelos autores utilizando recursos *Mind the Graph* (<https://www.mindthegraph.com/>), respeitando as condições de seus termos de uso.

Financiamento

Os autores são gratos pelo apoio das agências de fomento FAPESP, CAPES e CNPq, que financiam seus projetos (CEPID e INCT) e bolsas de pós-graduação.