

SCIENTIFIC AMERICAN BRASIL

ANO 14 | nº 162 | R\$13,90 | 4,90 €



CHIPS EVITAM TESTES COM ANIMAIS

Nova tecnologia
simula órgãos
humanos em
pesquisas para
desenvolver
medicamentos e
outros produtos

BIG SCIENCE

Grandes projetos são o
tema do relatório "O Estado
da Ciência no Mundo 2015"

OBESIDADE

Mutação em primatas há
milhões de anos pode ter
originado epidemia humana

ASTRONOMIA

Cientistas desvendam
mapas de estrelas em
tumbas do antigo Egito

BIOTECNOLOGIA

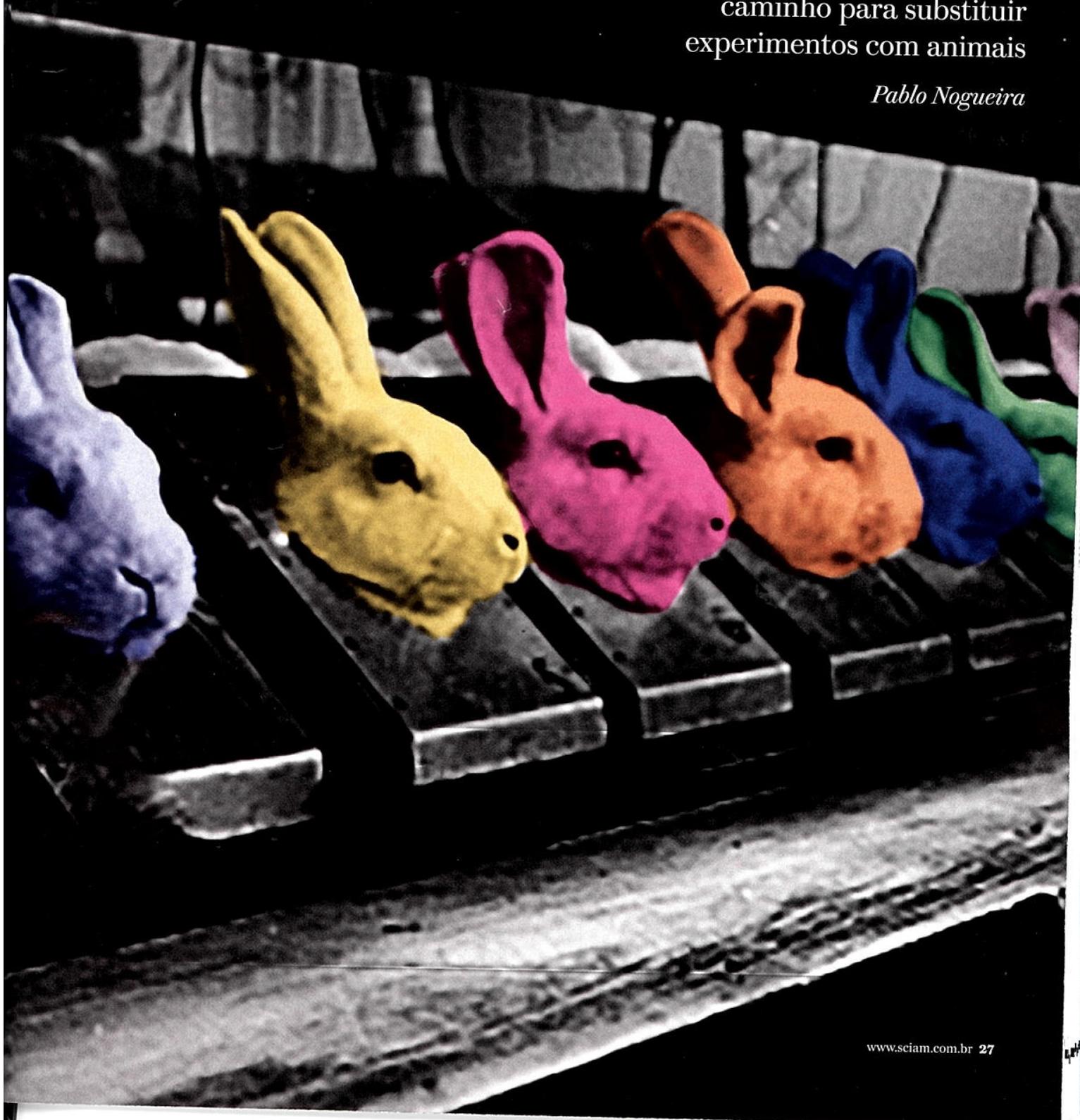
CHIPS SALVAM



BICHOS DE TESTES

Tecnologia que reproduz processos biológicos de órgãos humanos abre caminho para substituir experimentos com animais

Pablo Nogueira



Pablo Nogueira é jornalista de ciência e já trabalhou em publicações como *Veja*, *Galileu* e *Unesp Ciência*, da qual foi diretor.



A TÉ 2019, DEVERÃO CESSAR NO BRASIL 17 TIPOS de testes de medicamentos e cosméticos com animais. É o que determina uma norma da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) de julho deste ano. A lista inclui testes para o potencial de corrosão e irritação da pele, de irritação e corrosão ocular, de fototoxicidade e de toxicidade geral e aguda. Esses procedimentos, que envolvem a aplicação de substâncias diretamente em coelhos, cães, bois, galinhas e outros bichos vivos, inclusive em órgãos altamente sensíveis, como os olhos, já começaram a dar lugar a experimentos feitos apenas com equipamentos e reagentes químicos.

Em vários países, principalmente na União Europeia, é crescente o esforço pela substituição desses testes por métodos precisos de análise de novos medicamentos e outros produtos. A causa também se tornou motivo de protestos cada vez mais frequentes de ativistas de direitos dos animais. Em outubro e novembro de 2013, manifestantes invadiram duas vezes o laboratório Instituto Royal, em São Roque, perto de São Paulo. Os ativistas depredaram instalações e levaram 178 cães da raça Beagle, sete coelhos e cerca de 300 roedores que eram usados para testes. Essas ações levaram o instituto a anunciar o encerramento de suas atividades.

A polícia investigou as denúncias de maus-tratos a animais pelo laboratório. O inquérito seguiu para o Ministério Público, onde segue em sigilo. Mas, ainda em 2013, no rastro da invasão, a Assembleia Legislativa do Estado de São Paulo aprovou em regime de urgência uma lei que entrou em vigor em janeiro de 2014, proibindo testes com animais para o desenvolvimento de cosméticos.

No nível federal, porém, está parado desde 2012 na Câmara dos Deputados um projeto de lei que, entre outras disposições referentes ao bem-estar animal, também prevê a proibição de testes para os quais existam métodos alternativos ou substitutivos. "Infelizmente é muito difícil em certos temas fazer o processo legislativo acompanhar o desenvolvimento da ciência", afirma o deputado Ricardo Trípoli (PSDB-SP), autor da proposta de lei.

No caso da indústria farmacêutica, o uso de animais em tes-

tes é obrigatório pelas normas regulatórias, explica o pesquisador Eduardo Paganini, gerente de desenvolvimento de fármacos do Laboratório Nacional de Biotecnologias (LNBio), sediado em Campinas, a cerca de 100 km de São Paulo. "Usar animais é algo caro, demorado e não gera previsões 100% precisas. Afinal, as proteínas de um rato não são as mesmas de um ser humano", explica. "As empresas também querem alternativas."

O LNBio é um dos laboratórios centrais que compõem a Rede Nacional de Métodos Alternativos ao Uso de Animais (Renama), que inclui o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) e o Instituto Nacional de Metrologia Qualidade e Tecnologia (Inmetro). Em atividade desde 2012, a Renama busca implantar no país o chamado princípio dos "três erres", conhecido pela sigla 3Rs, proposto em 1959 pelos britânicos William M. S. Russell e Rex L. Burch. Os três erres se referem às iniciais das exortações éticas para os cientistas buscarem, na medida do possível, formas de reduzir (*Reduce*), refinar (*Refine*) e substituir (*Replace*) a testagem animal.

CULTURAS DE CÉLULAS

Cada laboratório procura fomentar o princípio 3Rs a partir de uma perspectiva própria de atuação. O LNBio tem como missão o apoio à inovação. Por isso, um de seus projetos consiste em trazer para o Brasil uma nova tecnologia de biorreatores que está sendo desenvolvida pela empresa alemã Tissuse, uma *start-up* do campo da biotecnologia. Denominada *Human on a chip* (o ser humano em um chip, em inglês) essa tecnologia busca substituir as experimentações em animais por testes feitos com dispositivos que contêm culturas de células humanas interligadas em circuitos que simulam fluxos de sangue e urina e os fluxos de oxigênio, nutrientes e outras substâncias.

EM SÍNTESE

Em 1959, os britânicos William M. S. Russell e Rex L. Burch propuseram o princípio 3Rs de redução, refinamento e substituição de testes com animais.

Nos últimos anos, ativistas dos direitos dos animais têm promovido ações, inclusive com violência, para impedir o uso de bichos em pesquisas científicas.

Entre as alternativas criadas por cientistas, a tecnologia *Human on a chip* usa dispositivos que reproduzem diversos processos biológicos de órgãos humanos.

Além de substituir o uso de animais, a tecnologia tem a vantagem de proporcionar previsões mais precisas por usar células humanas e não de outros seres.

Cultivar células e tecidos humanos em bancadas a fim de analisar como reagem ao contato com substâncias é algo comum. A diferença é que a nova tecnologia articula diferentes culturas celulares umas às outras por meio de um sistema circulatório. Dessa forma, é possível simular, por exemplo, a trajetória de uma droga que é aplicada sobre a pele, chega à corrente sanguínea e por essa via alcança o fígado e outros órgãos, monitorando as alterações que ela causa em cada etapa.

Aqui, a palavra “chip” não significa um microprocessador, mas a placa onde se insere o reator biológico, com o tamanho de um smartphone (ver quadro na página seguinte).

Os conjuntos de células são chamados de organoides, pois buscam reproduzir, com a maior fidelidade possível, as características e o funcionamento de órgãos humanos. O mais comum é as culturas de células terem apenas uma camada e formarem uma estrutura bidimensional. “Mas este formato é pouco fisiológico”, diz Ilka Maschmeyer, pesquisadora chefe da Tissuse e líder de estudos sobre essa tecnologia, um dos mais recentes publicado em setembro no *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*.

Graças a novas técnicas de cultivo, como a chamada *hanging drop*, os pesquisadores criam culturas multicelulares e tridimensionais, o que melhora a reprodução das condições *in vivo*. “Incrustamos as células em hidrogéis ou esferoides, e conseguimos que fiquem em contato umas com as outras. Não apenas contato lateral, mas também acima e abaixo”, diz Maschmeyer.

CULTURAS DE CÉLULAS

O foco dos pesquisadores está no cultivo das mínimas unidades funcionais que caracterizam cada órgão. Para criar um organoide de um fígado, por exemplo, equipe da Tissuse recorre tanto a células estreladas hepáticas quanto a hepatócitos (que constituem o tipo de célula mais comum no fígado) combinadas numa proporção de 1:24. Ao cultivar as duas variedades de forma agregada, os pesquisadores criam estruturas esferoides homogêneas, cada uma contendo centenas de milhares de células. O número varia, mas o objetivo é obter a proporção de uma para 100 mil do total encontrado no ser humano. No caso do fígado, um chip da Tissuse pode ter cerca de um milhão de células entre estreladas e hepatócitos. Além de células de fígado, os chips podem conter também as de pele, rim, intestino delgado e neurônios.

Outra diferença importante está no meio em que ficam as células. Nos métodos mais comuns de cultivo de tecidos, frequentemente não se consegue controlar adequadamente parâmetros importantes para a sua sobrevivência, como o fornecimento de oxigênio e de nutrientes, a influência de forças mecânicas e o acúmulo de subprodutos da atividade bioquímica. Isso faz com que as células muitas vezes experimentem um ambiente muito diferente daquele que existe no organismo humano. Isso pode ocasionar regressão na sua diferenciação celular e perda de suas funções.



ATIVISTAS RETIRAM cães da raça Beagle do Instituto Royal, em São Roque, a 59 km de São Paulo. Os ativistas protestaram contra o uso desses e de outros animais em testes de laboratório para indústrias farmacêuticas.

No *Human on a chip*, os organoides são constantemente banhados por um meio líquido que se movimenta e carrega nutrientes, à semelhança do que acontece com o sangue. Esse meio, por sua vez, passa por renovações parciais e periódicas, às vezes a intervalos de 24 horas. O fato de as células estarem banhadas pelo líquido em fluxo permite que suas secreções se misturem com o meio por perfusão. Através do controle do meio, os pesquisadores obtêm um microambiente celular bem definido e conseguem estabilizar o fenótipo celular.

A composição do meio líquido varia conforme os órgãos do sistema. Além dos nutrientes, ele também leva oxigênio para as células. Uma microbomba nele inserida exerce pressões da ordem de centenas de miliatmosferas, capazes de movimentar de 30 a 60 microlitros de fluidos por minuto. E os canais por onde o líquido se desloca podem ser envoltos por células endoteliais microvasculares humanas, imitando mais fielmente nosso sistema vascular.

O sistema mais complexo da Tissuse combina fígado, pele, intestino delgado e rim, e possui dois sistemas circulatórios. Um deles destina-se à passagem do meio líquido substituto do sangue, que interliga áreas de cultivo de células onde são abrigados os organoides do fígado, da pele e do intestino. Nesse modelo, o meio líquido primeiro passa pela cultura de células do intestino e, a seguir, para o compartimento com as células do fígado.

A seguir, o líquido atravessa uma membrana PET povoada com células de rim. Este organoide se conecta, por sua vez, com um circuito excretor, destinado a permitir a circulação dos metabólitos oriundos da sua atividade e assim impedir a contaminação do meio líquido. Já a cultura de células da pele serve como alternativa de porta de entrada do sistema e também como ponto de teste da substância-alvo ou de seus metabólitos.

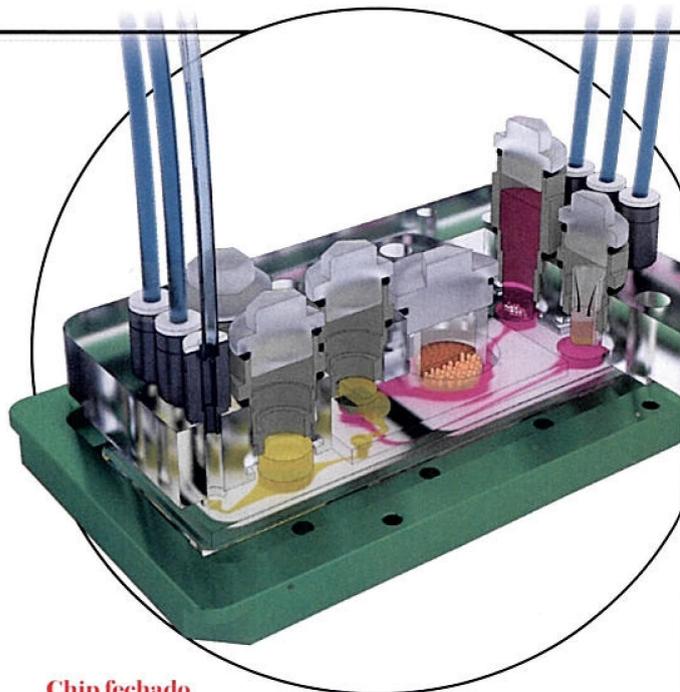
Os chips da Tissuse são capazes de apresentar atividade biológica ininterrupta por até 28 dias ou mais. Esse é o período requerido pelas agências europeias de saúde pública para análise de substâncias *in vivo*.

Dublê de corpo

Um chip multi-órgão tem aproximadamente o tamanho de um pequeno smartphone. O conjunto é feito a partir de uma lâmina para microscopia que é presa, através de oxidação de plasma de baixa pressão, a uma camada de dimetil polissiloxano (PDMS), e mede cerca de 70 mm por 25 mm, e 2 mm ou 3 mm de altura (as dimensões podem variar, dependendo do sistema que se está construindo).

Um chip com capacidade para dois órgãos contém dois compartimentos para cultivo das células ligados por um canal de apenas 100 micrômetros de altura por 500 micrômetros de largura. Uma placa adaptadora permite estabelecer conexões externas para os compartimentos de cultura de células.

É por esses canais que circula o meio líquido que simula o sangue. A composição do meio líquido varia de acordo com os órgãos que compõem o sistema. Além dos nutrientes, ele também faz o transporte de oxigênio para as células. Uma microbomba inserida no sistema exerce pressões da ordem de centenas de miliatmosferas, capazes de movimentar entre 30 e 60 microlitros de meio fluido por minuto. E os próprios canais por onde o meio líquido se desloca podem ser recobertos por células endoteliais microvasculares humanas, imitando assim com mais fidelidade nosso sistema vascular.



Chip fechado

“Nossos clientes poderão reduzir bastante o uso de animais em seus testes usando chips de dois e quatro órgãos”, diz Manschmeyer. “Estamos desenvolvendo também um sistema com dez órgãos, que vai usar sangue de verdade. Este, acreditamos, poderá substituir os animais quase definitivamente.” Até o fim deste ano, uma equipe de pesquisadores do LNBio irá à Alemanha estagiar nas instalações da Tissuse, a fim de aprender a trabalhar com o *Human on a Chip*. “Na metade do ano que vem, deveremos já dominar o seu uso de forma operacional”, diz Pagani.

MÉTODO PARA REDUZIR TESTES

Outro projeto do LNBio diz respeito ao uso de softwares para analisar potenciais efeitos químicos de novas moléculas. “Essa linha não tem como horizonte substituir os testes em animais, mas sim reduzir seu número”, explica Paulo Sérgio Lopes de Oliveira, pesquisador líder do grupo de biologia computacional do LNBio. Muito usado fora do Brasil, esse tipo de avaliação é chamado de *in silico*. Desde o ano passado, o laboratório adquiriu licenças para usar dois programas comerciais especializados: o Percepta, da ACD/Labs, e o Metadrug, da Thomson Reuters. O preço da licença de cada programa está na faixa dos US\$ 20 mil.

Esses programas vasculham gigantescos bancos de dados com informações sobre milhares de testes em animais. Recorrendo a ferramentas de programação e estatística, procuram determinar as chances de uma nova molécula poder apresentar um determinado efeito, com base no conhecimento previamente acumulado.

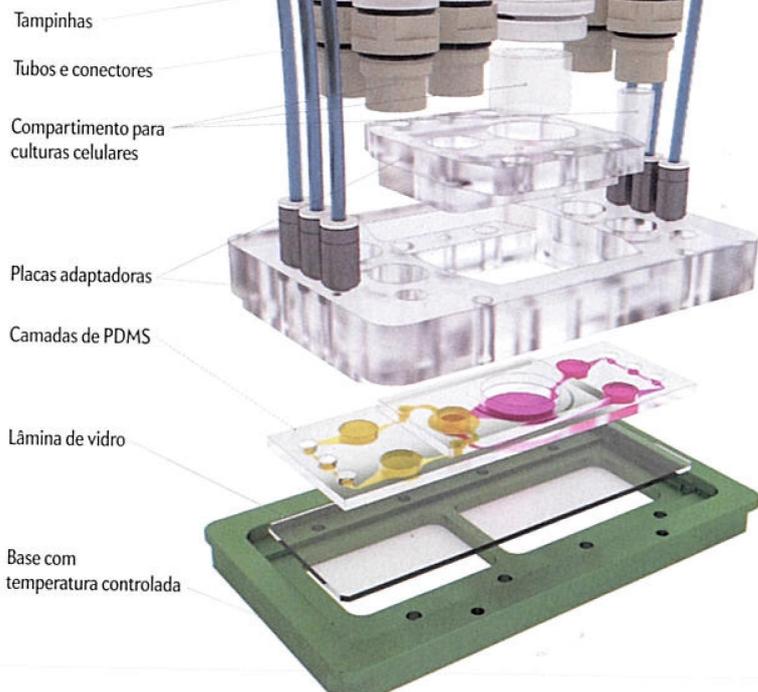
Fundamentais para essas análises poderem ser bem sucedidas são os modelos usados para previsões teóricas sobre a atividade biológica de determinadas substâncias, partindo de informações sobre suas propriedades físico-químicas.

Um dos métodos usados pelos programas é chamado de fragmental. Ele procura estabelecer as associações diretas entre características da molécula e seus efeitos observados. O método começa por uma análise rigorosa do composto. Ele possui, por exemplo, ligações de hidrogênio? Qual é sua massa? “Através dessas observações, o programa vai ‘fragmentando’ a molécula”, diz Oliveira. A etapa seguinte é correlacionar a informação obtida aos efeitos a serem estudados. A nova molécula corre o risco de efeito carcinogênico? O programa seleciona o conjunto de dados mais adequado para identificar efeitos indesejados do candidato a novo remédio.

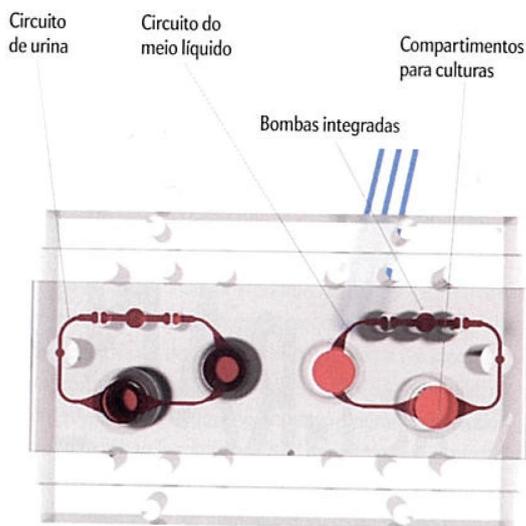
Como o foco principal da indústria farmacêutica é desenvolver novos produtos, são grandes as chances de *nenhum* experimento ter sido feito anteriormente com uma molécula *exatamente* igual à que está sendo submetida à avaliação *in silico*. Dada a extensa base de dados disponíveis, os programas podem mapear estudos prévios com moléculas *semelhantes* e seus resultados. A partir dessa análise, é feita a previsão com determinado grau de confiança. “Se a similaridade entre a molécula testada e o conjunto de informações disponível na base de dados for maior que 60%, [nós a] consideraremos uma previsão mais confiável”, diz Oliveira.

O LNBio abriu edital em 2014 para prover análises *in silico* gratuitas a empresas e outras instituições. Foram atendidas 18 solicitações consideradas relevantes, relativas desde o desenvolvimento de novos cosméticos ao tratamento de câncer e doenças negligenciadas. “Imagine que uma empresa está em dúvida quanto ao potencial de cinco moléculas. Se a análise mostrar que uma delas apresenta uma chance de ser eficaz bem maior do que as outras, a companhia vai realizar experimentos em animais apenas com essa, e não com todas as cinco. A análise *in silico* está agindo como um filtro, reduzindo a necessidade de testes *in vivo*”, diz Oliveira.

Chip aberto



CANAIS DE CIRCULAÇÃO DE FLUIDOS



Lâmina vista de baixo

ILKA MASCHMEYER/TISSUE GMBH

O INCQS, no Rio de Janeiro, é uma unidade da Fundação Osvaldo Cruz (Fiocruz) com tradição de pesquisa de métodos alternativos e controle de qualidade de diversos produtos. "Desde os anos 1980 percebemos que é possível substituir o uso do animal para testes", diz Isabela Delgado, vice-diretora de pesquisa do INCQS. Por conta dessa expertise, está instalado na Fiocruz o Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (Braevam). Neste ano, a vice-coordenadora do Braevam, Cristiane Caldeira da Silva, defendeu, sob orientação de Isabela, uma tese de doutorado sobre a validade do teste de ativação de monócitos (MAT, na sigla em inglês) no controle de qualidade de soros hiperimunes e vacinas.

MAIOR SENSIBILIDADE

Atualmente é muito usado o RPT (sigla em inglês para teste de pirogênese em coelhos) para medir a contaminação de produtos, o que pode provocar febre. No RPT são usados coelhos, e acompanham-se suas eventuais variações de temperatura. Se os animais têm aumento de temperatura de mais de 0,5°C, o teste é repetido com mais cobaias. Após os experimentos os animais são eutanasiados. "Os soros hiperimunes são muito usados no Brasil, e correspondem a 90% dos produtos avaliados pelo RPT. Por isso, se conseguirmos implantar outro método, já haverá uma grande redução no número de animais usados", explica Cristiane.

Outra vantagem do MAT é ele usar material biológico humano. O soro a ser analisado é posto em contato com o sangue de doadores. Esse contato faz os monócitos no sangue liberarem mediadores inflamatórios que atuam no hipotálamo e provocam elevação de temperatura no organismo. Ao se medir a quantidade de mediadores inflamatórios que surgem, é possível prever se aquela amostra está ou não adequada para uso.

A fim de demonstrar uma nova aplicação para o teste, Cristiane submeteu 43 amostras de soros antitetânicos, antiescorpiônicos e antiofídicos à análise com o MAT e com o RPT e depois comparou os resultados de cada um. "O MAT é conhecido há duas décadas, mas ainda não plenamente reconhecido como alternativa ao RPT justamente porque faltavam estudos detalhados", diz a pesquisadora.

Das 43 amostras analisadas, o teste RPT detectou atividade pirogênica em oito. Todas as oito foram também identificadas através do MAT. Porém, houve duas que o MAT classificou como contaminadas, mas o RPT aprovou no resultado final. Seria um falso-positivo? Cristiane acha que não. "O MAT é mais sensível. Ele é capaz de detectar o problema num estágio inicial, que a avaliação por RPT não é capaz de apontar. O problemático seria se a comparação mostrasse algum caso de falso negativo, pois isso poderia significar, numa situação real, a liberação para uso de um produto com problemas. Mas não houve nenhum", diz.

"Às vezes a gente tem como 'padrão ouro' testes que nem são tão bons assim. A ideia agora é que este método seja incorporado na Farmacopeia Brasileira, possibilitando realmente uma mudança de práticas", explica Isabela Delgado. 

PARA CONHECER MAIS

A multi-organ chip co-culture of neurospheres and liver equivalents for long-term substance testing. Eva-Maria Mateme et al., em *Journal of Biotechnology*, 2015, págs. 36-46; 2015.

A four-organ-chip for interconnected long-term co-culture of human intestine, liver, skin and kidney equivalents. Ilka Maschmeyer et al., *Lab Chip*, 15, pág. 2688; 2015.

Chip-based human liver-intestine and liver-skin co-cultures -- A first step toward systemic repeated dose substance testing in vitro. Ilka Maschmeyer et al., *Eur J Pharm Biopharm*, 95 (Pt A), págs. 7-87; setembro de 2015.