



SINDUSFARMA



V Fórum de Ensaaios não Clínicos

Fatores que afetam a reprodutibilidade de ensaios não clínicos

**Joel Majerowicz
Fundação Oswaldo Cruz**



FIOCRUZ

2 de setembro de 2019



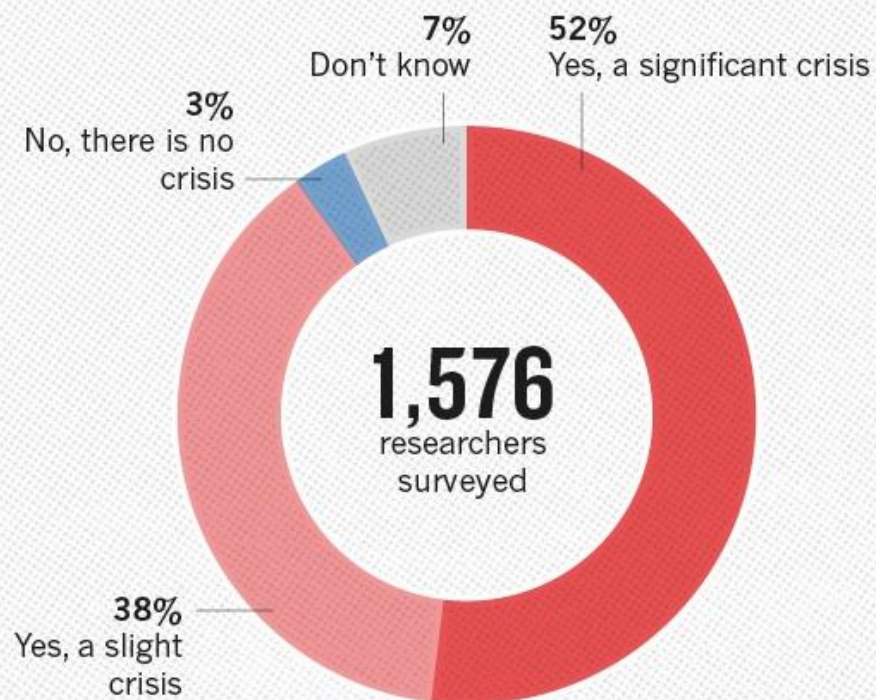
1,500 scientists lift the lid on reproducibility

Survey sheds light on the 'crisis' rocking research.

Monya Baker

25 May 2016 | Corrected: 28 July 2016

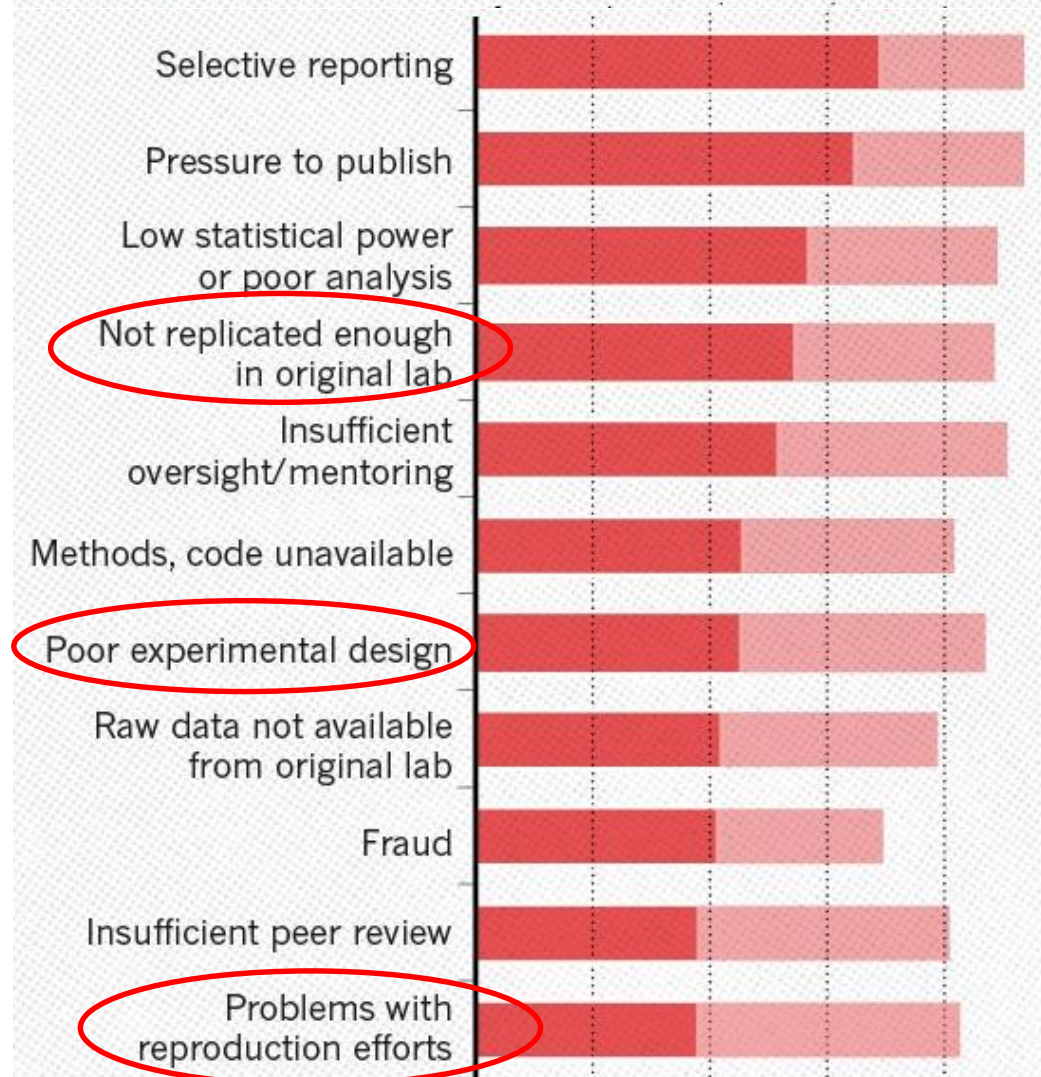
IS THERE A REPRODUCIBILITY CRISIS?



WHAT FACTORS CONTRIBUTE TO IRREPRODUCIBLE RESEARCH?

Many top-rated factors relate to intense competition and time pressure.

● Always/often contribute ● Sometimes contribute





National Centre
for the Replacement
Refinement & Reduction
of Animals In Research

The ARRIVE guidelines

Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments

As diretrizes pretendem:

- Melhorar o relato da investigação feita com animais.
- Guiar os autores na informação essencial que é necessário incluir num manuscrito, sem ser absolutamente normativo.
- Ser flexível de forma a acomodar relatos de um leque amplo de áreas de investigação e protocolos experimentais.
- Promover a publicação de manuscritos replicáveis, transparentes, precisos, detalhado, concisos, com uma ordem lógica e bem escritos.
- Melhorar a comunicação das observações científicas para toda a comunidade científica.

Promover a publicação de manuscritos replicáveis, transparentes, precisos, detalhado, concisos, com uma ordem lógica e bem escritos

	ARTIGOS	RECOMENDAÇÕES
Título	1	Permite uma descrição do conteúdo do artigo que seja precisa e concisa.
Resumo	2	Proporciona um sumário do contexto, objetivos do estudo, incluindo pormenores da espécie ou estirpe de animais usada, métodos e resultados mais importantes e conclusões do estudo que sejam precisas e concisas.
INTRODUÇÃO		
Contexto	3	a. Inclui suficiente contexto científico (incluindo referências relevantes de publicações prévias) de forma a compreender o motivo e o contexto para o estudo, e explica a estratégia e lógica experimentais. b. Explica como e porque a espécie e modelo animais usados podem atingir os objetivos científicos e, onde possível, descreve a pertinência do estudo para a biologia humana.
Objectives	4	Descreve com clareza os objetivos primário e secundários do estudo ou a hipótese a ser testada.
MÉTODOS		
Declaração ética	5	Indica as revisões por Conselhos de Ética e a natureza destes Conselhos de Ética. Inclui as diretrizes institucionais e nacionais para a utilização de modelos animais específicos para o estudo realizado.
Plano do estudo	6	Para cada experiência, fornece pormenores do desenho de estudo que incluam: a. Número de grupos experimentais e grupos controle. b. Iniciativas para minimizar os efeitos de enviesamento subjetivo no processo de escolha de animais para o grupo de estudo ou controle (processo de randomização) e na observação/coleta de resultados (situações em que os investigadores estavam "cegos"). c. A unidade experimental (animais isolados, em grupo e as caixas/gaiolas usadas, se estavam em isolamento). Um diagrama ou fluxograma é útil e ilustrativo no caso de estudo complexos.
Procedimentos das Experiências	7	Fornece detalhes de todos os procedimentos técnicos, para cada experiência em cada grupo experimental, incluindo controles. Exemplos: a. Como (i.e. dose e formulação do fármaco, via de administração e posologia; descrição de procedimentos para analgesia ou anestesia, incluindo o monitoramento, procedimento cirúrgico e método de eutanásia). Detalhes do equipamento especializado usado, incluindo fornecedores. b. Quando (hora do dia). c. Onde (caixa ou gaiola, bancada de laboratório, labirinto de água). d. Porque (lógica para a escolha de anestésico, via de administração, fármacos e doses usadas).
Animais	8	a. Descreve os animais usados, espécies e estirpes, sexo, idade (média ou mediana e variação), peso (média ou mediana e variação). b. Descreve a origem dos animais, a nomenclatura internacional, modificações genéticas (i.e. knock-out ou transgênico), genótipos, declaração veterinária de saúde, estado de saúde ou imunidade, procedimento farmacológico ou técnico, procedimentos prévios nos animais.

Instalações e condições veterinárias dos animais	9	Fornece dados de: a. Instalações: tipo de biotério (i.e. estéril, caixas em isolamento), tipos de caixas/gaiolas usadas, material do fundo das gaiolas/caixas, número de animais por caixa, forma e material de tanques (para peixes). b. Condições de manutenção de animais (programa de reprodução, tipo e frequência de alimentação, ciclos de luz e escuro, temperatura, qualidade de água, acesso a água e comida, enriquecimento do meio). c. Avaliação de bem-estar e intervenções atitudes durante ou pré e pós experiência.
Números da amostra	10	a. Descreve o número total de animais usados em cada experiência e o número de animais em cada grupo experimental. b. Explica como a decisão do número de animais a usar foi tomada (cálculo estatístico dependente do efeito esperado da intervenção). c. Indica o número de vezes que a experiência foi repetida, caso seja pertinente.
Atribuição de animais aos grupos experimentais	11	a. Detalha como os animais foram atribuídos a um ou outro grupo, randomização ou emparelhamento. b. Descreve a ordem usada para tratar ou observar cada animal.
Resultados experimentais	12	Definição clara dos resultados principais e secundários e da quantificação ou qualificação dos resultados medidos (morte celular, marcadores moleculares, mudanças comportamentais).
Métodos estatísticos	13	a. Descreve pormenores dos métodos estatísticos usadas para cada análise. b. Descreve a unidade usada em cada análise (um animal, grupo de animais, um neurónio). c. Descreve os métodos usados para avaliar, se os resultados atingiram os requisitos estatísticos.
RESULTADOS		
Valores de base	14	Para cada grupo experimental, descreve das características importantes e saúde dos animais (i.e. peso, infeções, fármacos/intervenções prévias) antes da intervenção (esta informação pode ser em tabelas).
Números analisados	15	a. Descreve o número absoluto de animais usados em cada grupo incluído em cada análise (por exemplo 10/20 e não 50%). b. Explicita caso algum animal ou valor não tenha sido incluído e a razão.
Resultados e estimativas	16	Descreve os resultados para cada experiência, com medidas da precisão usada (erro padrão e intervalos de confiança).
Efeitos adversos	17	a. Detalha os efeitos laterais em cada grupo experimental. b. Descreve quaisquer modificações feitas ao protocolo de forma a reduzir o aparecimento de efeitos laterais.
DISCUSSÃO		
Interpretação/implicações científicas	18	a. Interpreta os resultados, considerando os objetivos e hipóteses iniciais e o conhecimento corrente e publicado. b. Comenta as limitações do estudo, incluindo potenciais vieses, limitações do modelo animal e imprecisões dos resultados ² . c. Descreve quaisquer implicações dos métodos experimentais ou observações para os 3Rs (Substituição, Refinamento, Redução).
Generalização ou translação	19	Comenta se como os resultados do estudo podem ser traduzidos para outras espécies ou sistemas, incluindo se são relevantes para a biologia humana.
Financiamento	20	Lista as fontes de financiamento (número da bolsa ou subsídio) e qual o papel dos financiadores no estudo.

PREPARE: guidelines for planning animal research and testing

Adrian J Smith¹, R Eddie Clutton², Elliot Lilley³,
Kristine E Aa Hansen⁴ and Trond Brattelid⁵

Laboratory Animals
0103 1-7
© The Author(s) 2017
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/0023677217724823
journals.sagepub.com/home/lan
SAGE

Abstract

There is widespread concern about the quality, reproducibility and translatability of studies involving research animals. Although there are a number of reporting guidelines available, there is very little overarching guidance on how to *plan* animal experiments, despite the fact that this is the logical place to start ensuring quality. In this paper we present the PREPARE guidelines: Planning Research and Experimental Procedures on Animals: Recommendations for Excellence. PREPARE covers the three broad areas which determine the quality of the preparation for animal studies: formulation, dialogue between scientists and the animal facility, and quality control of the various components in the study. Some topics overlap and the PREPARE checklist should be adapted to suit specific needs, for example in field research. Advice on use of the checklist is available on the Norecopa website, with links to guidelines for animal research and testing, at <https://norecopa.no/PREPARE>.

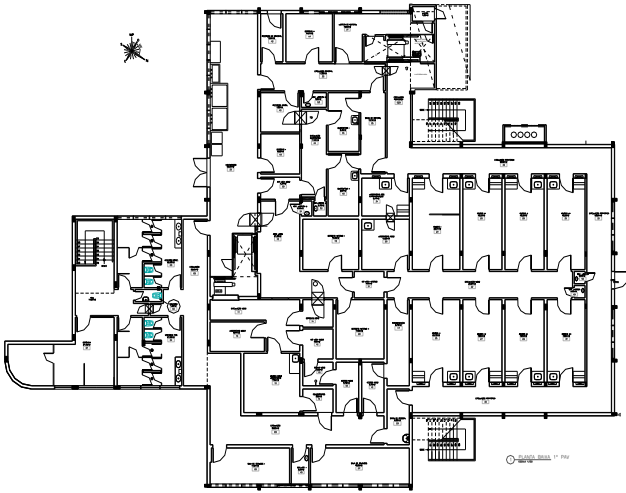
Preocupação com a qualidade, reprodutibilidade e translação dos estudos envolvendo animais

Qualidade da **preparação** para estudos em animais

Capacitação de pessoal



Instalação Animal



Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA

Roedores e Lagomorfos (RN 15/2014) – 2019

Primatas não humanos (RN 28/2015) – 2020

Anfíbios e Serpentes (RN 29/2015) – 2020

Peixes (Lambari, Tilápia e Zebrafish) (RN 34/2017) - 2022

Cães e Gatos (RN 41/2018) – 2023

Equídeos (RN 42/2018) – 2023

Peixes II (RN 44/2019) - 2024

**Pequenos e grandes ruminantes,
Suínos,
Aves,
Animais silvestres e
Répteis.**

Microbiológica

- ◆ Animais convencionais
- ◆ Animais livres de microrganismos patogênicos específicos - (specific pathogen free – SPF)

Linhagem: Rato Wistar

Microorganismos	Amostra	Metodologia	Mai2011	Set2011	Dez2011	Fev2012	Histórico*
Vírus							
Adenovírus	Soro	ELISA	0/10	0/10	0/10	0/10	0/70
Coronavírus (Sialodacrioadenite)	Soro	ELISA	0/10	0/10	0/10	0/10	0/70
Vírus K (Kilham)	Soro	ELISA	0/10	0/10	0/10	0/10	0/70
Parvovirus de ratos	Soro	ELISA	0/10	0/10	0/10	0/10	0/70
Pneumovírus	Soro	ELISA	0/10	0/10	0/10	0/10	0/70
Reovirus tipo 3 (REO 3)	Soro	ELISA	0/10	0/10	0/10	0/10	0/70
Sendai vírus	Soro	ELISA	0/10	0/10	0/10	0/10	0/70
Bactérias							
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Traquéia/Fezes	Cultura	0/10	0/10	0/10	0/10	0/70
<i>Bacillus</i> associados aos cílios respiratórios	Soro	ELISA	0/10	0/10	0/10	0/10	0/70
<i>Citrobacter rodentium</i>	Traquéia/Fezes	Cultura	0/10	0/10	0/10	0/10	0/70
<i>Corynebacterium bovis</i>	Traquéia/Fezes	Cultura	0/10	0/10	0/10	0/10	0/70
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	Traquéia/Fezes	Cultura	0/10	0/10	0/10	0/10	0/70
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Traquéia/Fezes	Cultura	0/10	0/10	0/10	0/10	0/70
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	Soro	ELISA	0/10	0/10	0/10	0/10	0/70
<i>Pasteurella</i> spp.	Traquéia/Fezes	Cultura	0/10	0/10	0/10	0/10	1/70
<i>Pseudomonas</i> spp.	Traquéia/Fezes	Cultura	0/10	0/10	0/10	0/10	0/70
<i>Salmonella</i> spp.	Traquéia/Fezes	Cultura	0/10	0/10	0/10	0/10	2/70
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Traquéia/Fezes	Cultura	0/10	0/10	0/10	0/10	0/70
<i>Staphylococcus aureus</i>	Traquéia/Fezes	Cultura	0/10	0/10	0/10	0/10	0/70
<i>Streptococcus beta hemolitico (grupo D)</i>	Traquéia/Fezes	Cultura	0/10	0/10	0/10	0/10	0/70
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Traquéia/Fezes	Cultura	0/10	0/10	0/10	0/10	0/70
<i>Clostridium piliformis</i> – Tyzzer	Soro	ELISA	0/10	0/10	0/10	0/10	0/70
Parasitas							
Ectoparasitas: pulgas, ácaros e piolhos	pêlo	Estereoscópio	0/10	0/10	0/10	0/10	0/70
<i>Syphacia</i> spp.	intestino	Micro	0/10	0/10	0/10	0/10	0/70
<i>Aspiculuris tetráptera</i>	intestino	Micro	0/10	0/10	0/10	0/10	0/70
<i>Rodentolepis nana</i>	intestino	Micro	0/10	0/10	0/10	0/10	0/70
Tricomonídeos	intestino	Micro	0/10	0/10	0/10	0/10	0/70
<i>Spironucleus muris</i>	intestino	Micro	0/10	0/10	0/10	0/10	0/70
<i>Giardia muris</i>	intestino	Micro	0/10	0/10	0/10	0/10	0/70
<i>Entamoeba</i> spp.	intestino	Micro	0/10	0/10	0/10	4/10	4/70

Guidelines

» [A harmonized health reporting format for international transfer of rodents \(2014\)](#)

» [FELASA guidelines and recommendations \(2012\)](#)

» [FELASA guidelines for the refinement of methods for genotyping genetically-modified rodents \(2013\)](#)

Recommendations for health monitoring of rodent and rabbit colonies (2014)

These recommendations are primarily intended to standardize health monitoring programmes and reporting. In this way they may also help to standardize the microbiological quality of animals. However, it is not a requirement of these recommendations that animals tested are free from all of the microorganisms listed.

Documents

» [Laboratory Animals 2014, Vol. 48\(3\): 178-192](#)

Earlier reports

QUALIDADE

Microbiológica

- ◆ Animais convencionais
- ◆ Animais livres de microrganismos patogênicos específicos - (specific pathogen free - SPF)

- ◆ Animais gnotobióticos
 - ◆ Germ free
 - ◆ Flora definida
 - ◆ Monobióticos, dibióticos, polibióticos





GENÉTICA

QUALIDADE

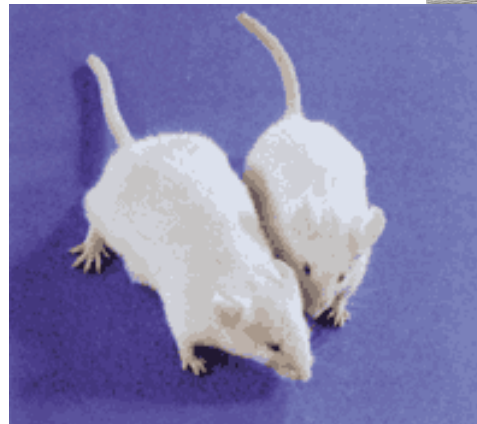
Não-consanguíneo, heterogênicos, “outbred”

- Que tenha menos de 1% de índice de homozigose (inbreeding) por geração.

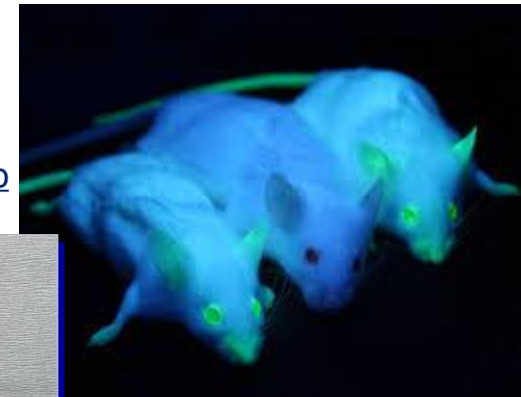
Consanguíneo, Isogênicos, “inbred”

- 20 gerações de acasalamentos entre irmãos, Tamanho da colônia Sistema de acasalamento

10 a 25



AO acaso



CONTROLE GENÉTICO

felasa

Federation of European Laboratory Animal Science Associations

[Working Groups](#)

[Recommendations](#)

[Policy Documents](#)

[Announcements](#)

[Accreditation Boards](#)

[Search](#)

[Board of Management](#)

[AALAS - FELASA liaison body](#)

Working groups - present

[» AALAS - FELASA working group on harm-benefit analysis of animal studies](#)

[» FELASA - AALAS working group on the transport of laboratory animals](#)

Genetic quality assurance and genetic monitoring of laboratory murines

Synopsis

In the past years the number of mouse and rat models has increased dramatically. This is partly due to a variety of techniques developed to manipulate the genome in a targeted manner, but also to the subsequent breeding experiments to generate two-, three-, and four-fold mutants. In addition many crossing experiments have been carried out to generate a huge number of conditional mutant strains. Unfortunately, the main focus in the majority of the crossing experiments lies on the manipulated loci; whereas the genetic background of the animals is often neglected. The working group will develop recommendations for the genetic quality assurance of laboratory murines. These recommendations should be a guide to animal facilities and researchers on how animal experiments can be carried out under genetically standardized conditions so that these recommendations will also contribute to the three R's.

Microambiente

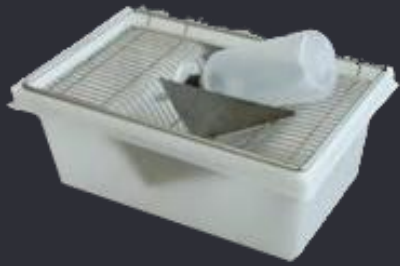
Gaiolas

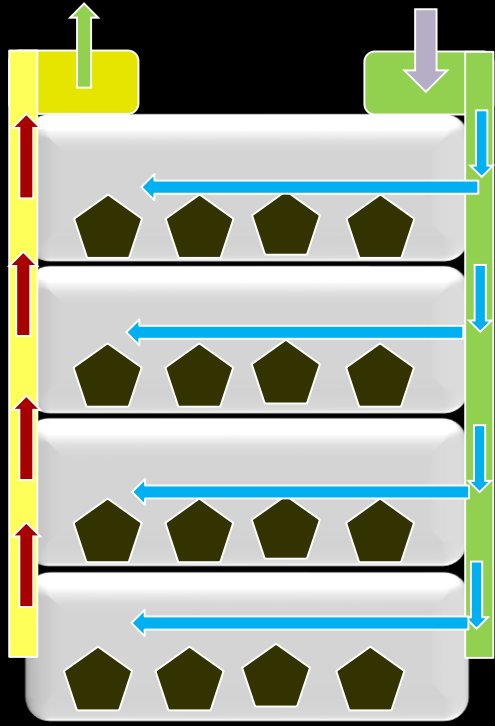


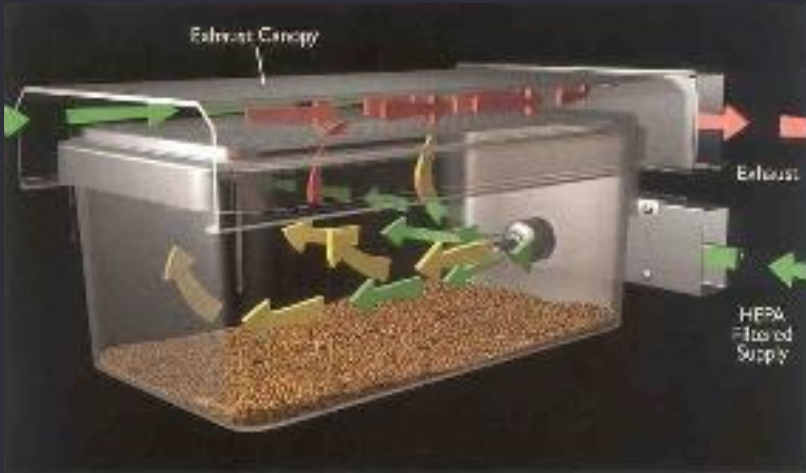
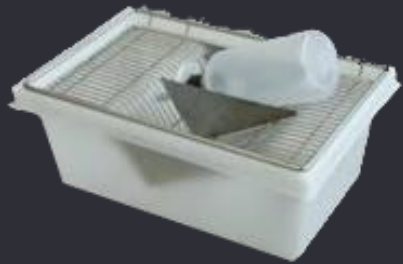
Alimentação (sólida e líquida)

Forração de gaiolas













Microambiente em Biotérios

Alimentação

- ▶ A dieta deve ser balanceada e padronizada.
- ▶ Isenta de contaminantes (pesticidas, herbicidas e etc.)
- ▶ O armazenamento deve ser em local fresco e ventilado. Temperatura elevada, luz e longo tempo de armazenamento podem afetar componentes da ração (vitaminas e aminoácidos).

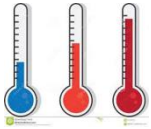
Microambiente em Biotérios



Forração de gaiolas – “Cama”

- ▶ Maravalha de pinus – de uso mais frequente no Brasil
- ▶ Sabugo de milho
 - Deve estar livre de contaminantes microbiológicos e substâncias químicas.
 - Esterilização é altamente recomendada – destruição de microrganismos e redução de resinas e óleos voláteis.

Macroambiente



Temperatura



Ventilação



Umidade relativa



Iluminação



Fotoperíodo

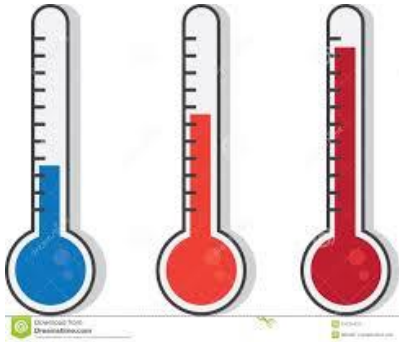


Ruído

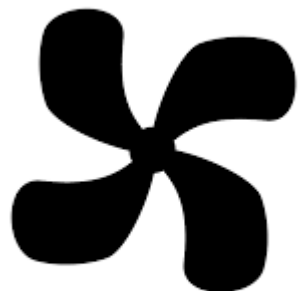


Vibração

Temperatura



- ▶ Animais homeotérmicos tentam manter a temperatura corporal constante.
- ▶ Mudanças na temperatura ambiente resulta em alterações compensatórias.
- ▶ Afetam a taxa metabólica, circulação, atividade e comportamento.
- ▶ A temperatura no interior das gaiolas tende a ser mais alta que a do ambiente e é dependente do número de animais alojados.



Ventilação

- Os animais homeotérmicos fazem constante troca de umidade, nutrientes e oxigênio.
- Estão sempre perdendo calor, umidade, dióxido de carbono e outros produtos metabólicos.
- Sem ventilação há acúmulo desses produtos no ambiente.
- Amônia é um dos mais prejudiciais produtos e é derivada da ação de bactérias urease positiva sobre a urina.

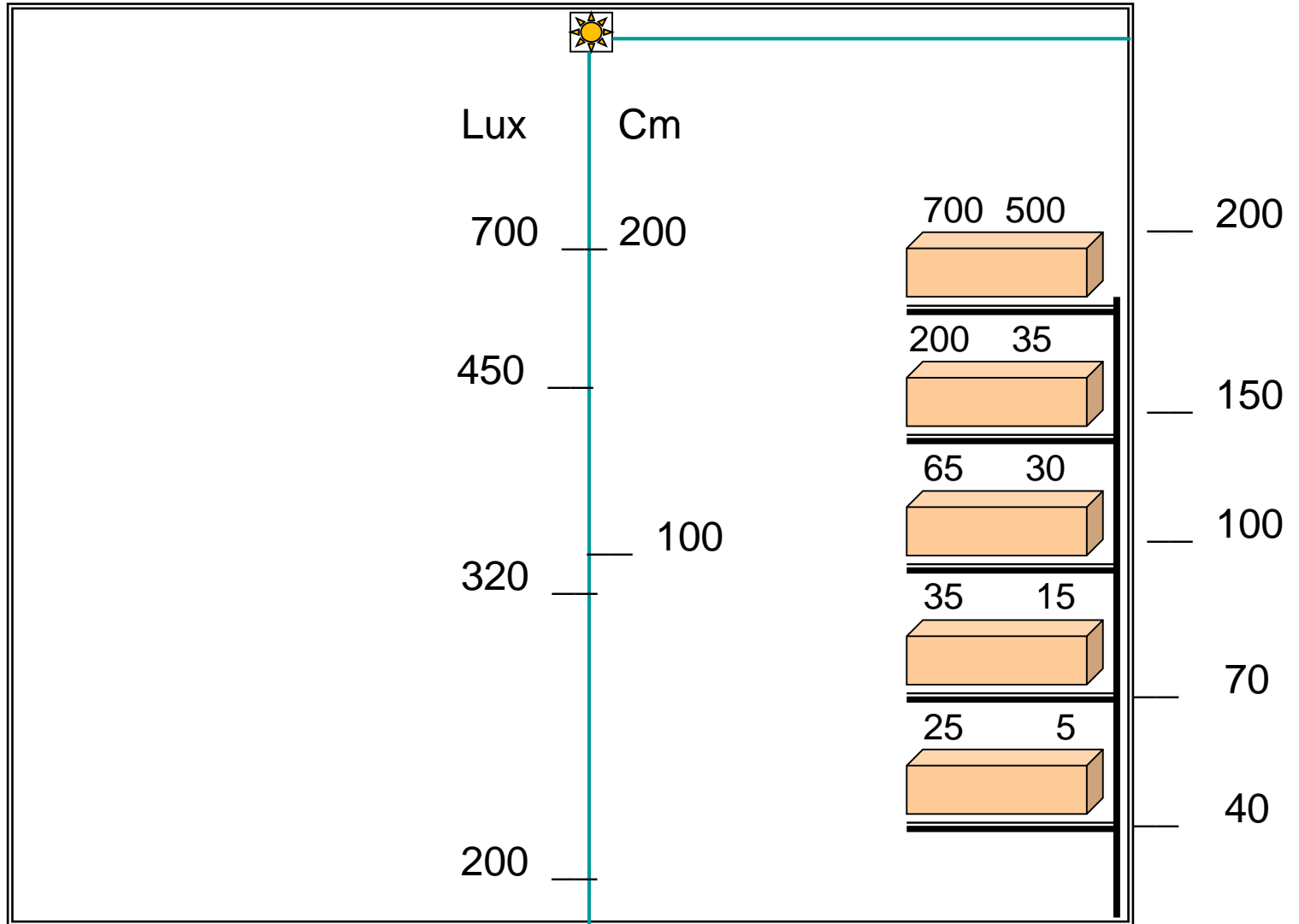
Afeta o sistema respiratório, propiciando infecções secundárias.



Umidade relativa

- ▶ Muitos dos animais de laboratório não transpiram pela pele, fazendo a troca de calor pela respiração.
- ▶ Se a umidade relativa do ambiente estiver muito alta afetará a capacidade do animal ajustar sua temperatura corporal.
- ▶ Alta umidade estimula a produção de amônia.
- ▶ A umidade no interior das gaiolas de roedores é em torno de 10% maior que a do ambiente.

Iluminação



Adaptado de Weihe & Strittmatter, 1969



Fotoperíodo

- ▶ A maioria dos animais de laboratório necessitam um período de luz de 12 /12h – 10/14h.
- ▶ A sazonalidade é percebida pelos animais mesmo em ambiente controlados.



Ruído

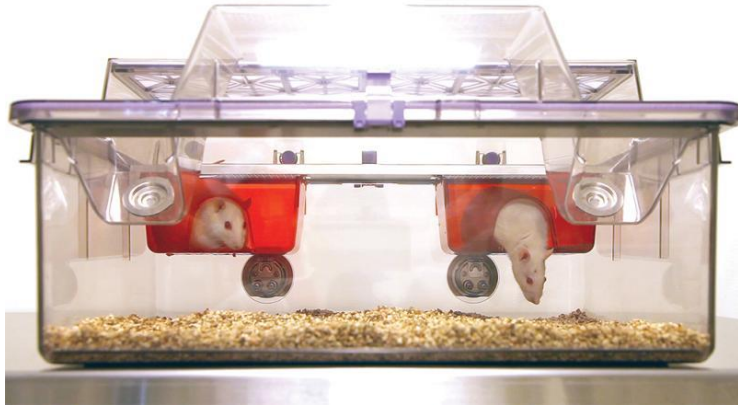
- ▶ Frequências inaudíveis aos seres humanos, infra e ultrasom, são perceptíveis por diversas espécies animal.
- ▶ Animais de laboratório ouvem sons de frequência superiores as audíveis pelo homem.



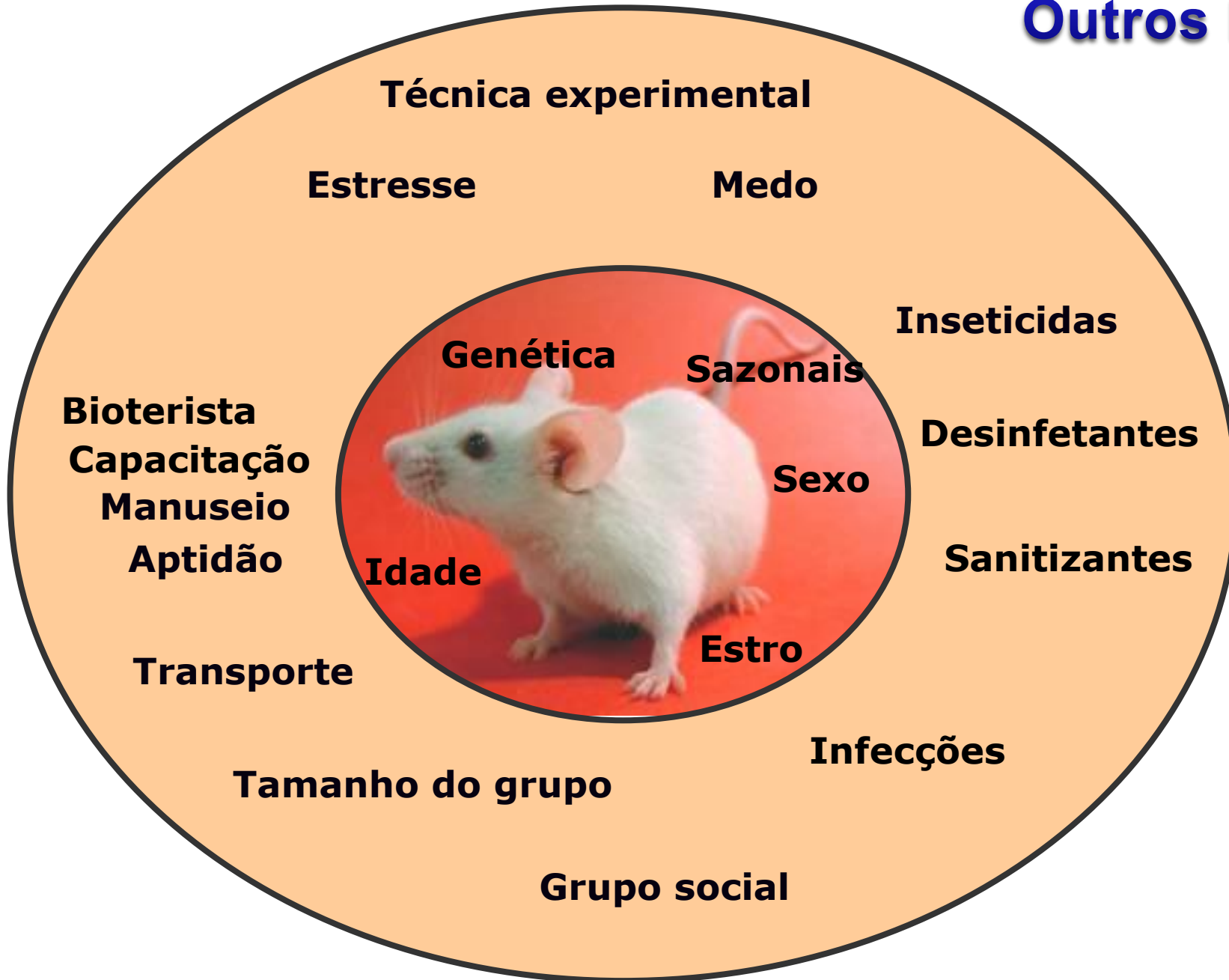
Vibração

- ▶ Evitar construção próxima de vias de transporte (estradas e ferrovias)
- ▶ Utilizar amortecedores em equipamentos instalados no piso técnico

Enriquecimiento ambiental



Outros Fatores



NCBI Resources How To
 PubMed.gov
 US National Library of Medicine
 National Institutes of Health
 Format: Abstract
 Clin J Gastroenterol
 Gut microbiota
 Nishida A¹, Inoue

O microbioma é reconhecido como variável importante em estudos não clínicos e clínicos

nature
 International journal of science
 Community

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect
Best Practice & Research Clinical Gastroenterology
 ELSEVIER
 7
 Diabetes, obesity and gut microbiota
 Amandine Everard, M.S.
 Patrice D. Cani, PhD, P
 Université catholique de Louvain, WE
 Drug Research Institute, Metabolism
 Brussels, Belgium

nature
 International journal of science
 Letter | Published: 17 July 2019
 Intestinal infection triggers Parkinson's disease-like symptoms in *Pink1*^{-/-} mice
 Mathéoud, Tyler Cannon, Aurore Voisin, Anna-Maija Penttinen, Lauriane Ramet, Ahmed M.
 Charles Ducrot, Annie Laplante, Marie-Josée Bourque, Lei Zhu, Romain Cayrol, Armelle Le
 Louvain

nature
 International journal of science
 Article | Published: 03 June 2019
 Mapping human microbiome drug metabolism by gut bacteria and their

SPECIAL SECTION CANCER IMMUNOTHERAPY
 REVIEW
The microbiome in cancer immunotherapy: Diagnostic tools and therapeutic strategies
 Laurence Zitvogel,^{1,2,3,4*} Yuting Ma,^{5,6} Didier Raoult,⁷
 Guido Kroemer,^{8,9,10} Thomas F. Gajewski^{11*}

ding Edge
 review
 Cell

YALE JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE 89 (2016), pp.375-382.

MINI-REVIEW

YJBM

The Central Nervous System and the Gut Microbiome

Cancer Cell
 Previews

Immunotherapy Not Working? Check Your Microbiota

Nathan R. West¹ and Fiona Powrie²
¹Kennedy Institute of Rheumatology
²Translational Gastroenterology Unit
 *Correspondence: fiona.powrie@ke
 http://dx.doi.org/10.1016/j.ccell.201

W J G World Journal of Gastroenterology

The Impact of the Gut Microbiota on Drug Metabolism and Clinical Outcome

Elaine F. Enright^{a,b}, Cormac G.M. Gahan^{a,b,c,*}, Susan A. Joyce^{a,d}, Brendan T. Griffin^{a,b}

^aAPC Microbiome Institute, University College Cork, Cork, Ireland; ^bSchool of Pharmacy, University College Cork, Cork, Ireland; ^cSchool of Microbiology, University College Cork, Cork, Ireland; ^dSchool of Medicine, University College Cork, Cork, Ireland

AP&T Alimentary Pharmacology and Therapeutics

Submit a Manuscript: <http://www.wjnet.com/esps/>
 Help Desk: <http://www.wjnet.com/esps/helpdesk.aspx>
 DOI: 10.3748/wjg.v21.i17.5359

World J Gastroenterol 2015 May 7; 21(17): 5359-5371
 ISSN 1007-9327 (print) ISSN 2219-2840 (online)
 © 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Review article: alcohol and gut microbiota - the possible role of gut microbiota modulation in the treatment of alcoholic liver disease

G. Vassallo^a, A. Mirijello^a, A. Ferrulli, M. Antonelli, R. Landolfi, A. Gasbarrini & G. Addolorato

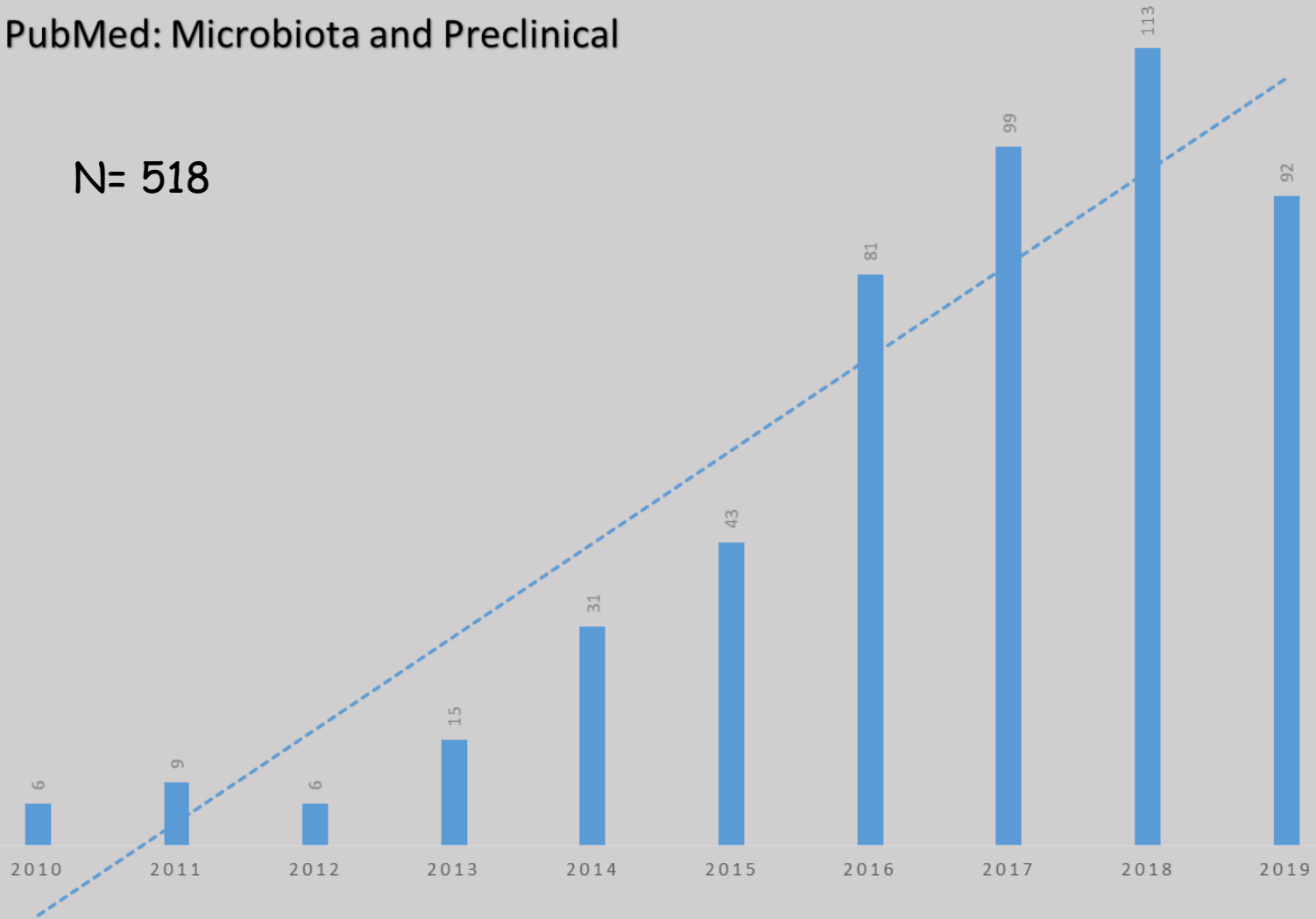
SYSTEMATIC REVIEWS

Fecal microbiota transplantation as novel therapy in gastroenterology: A systematic review

Noortje G Rossen, John K MacDonald, Elisabeth M de Vries, Geert R D'Haens, Willem M de Vos, Erwin G Zoetendal, Cyriel Y Ponsioen

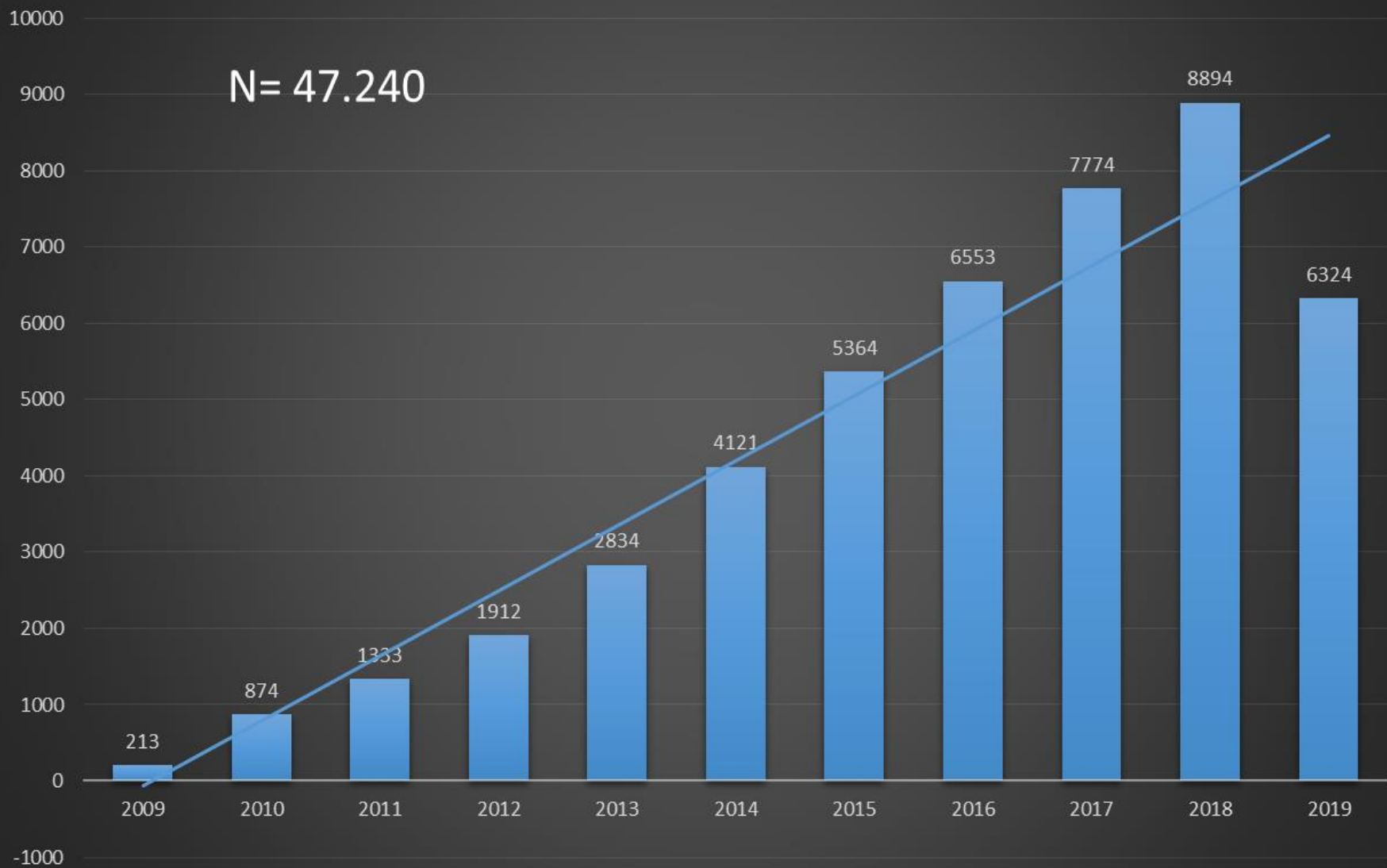
PubMed: Microbiota and Preclinical

N= 518



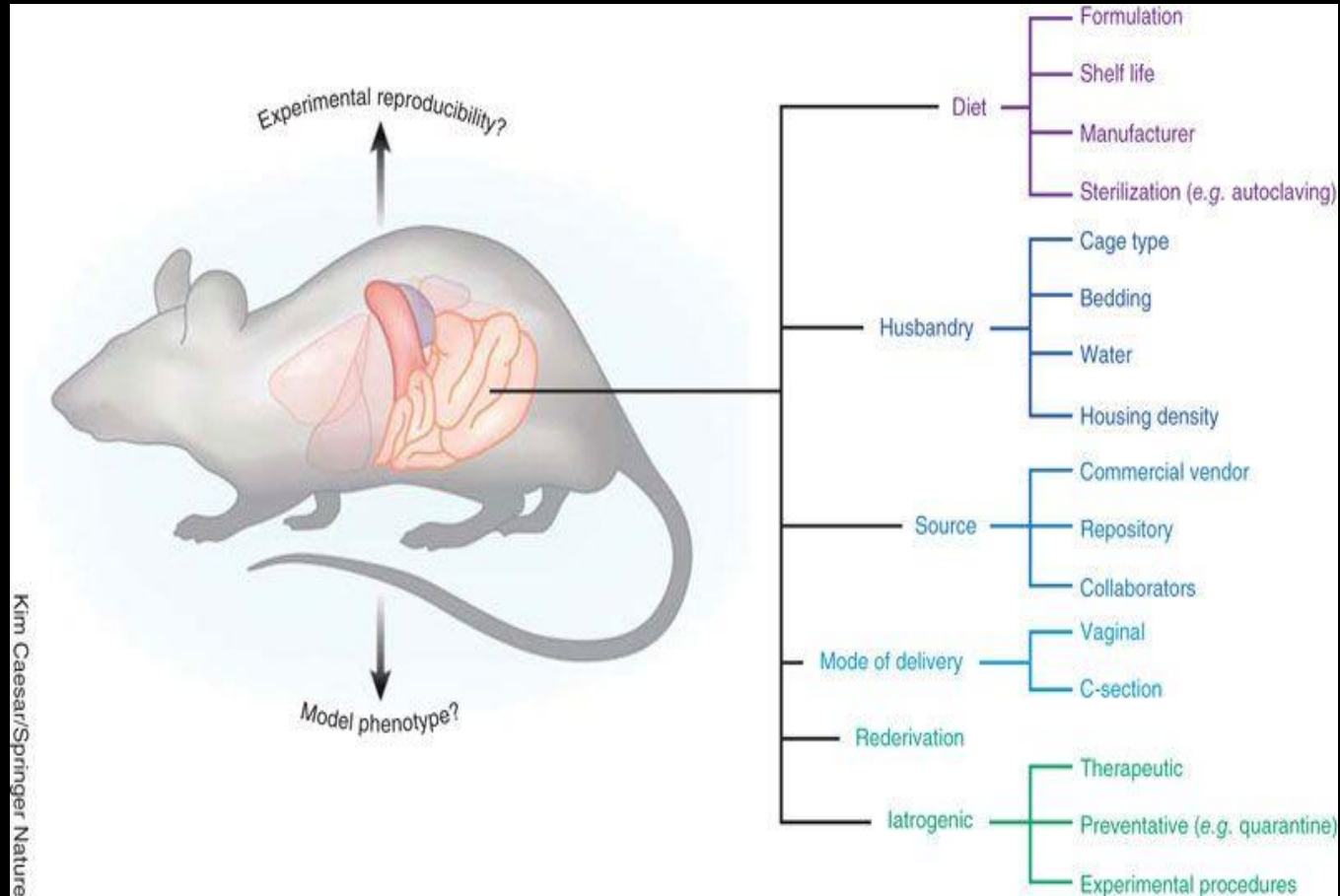
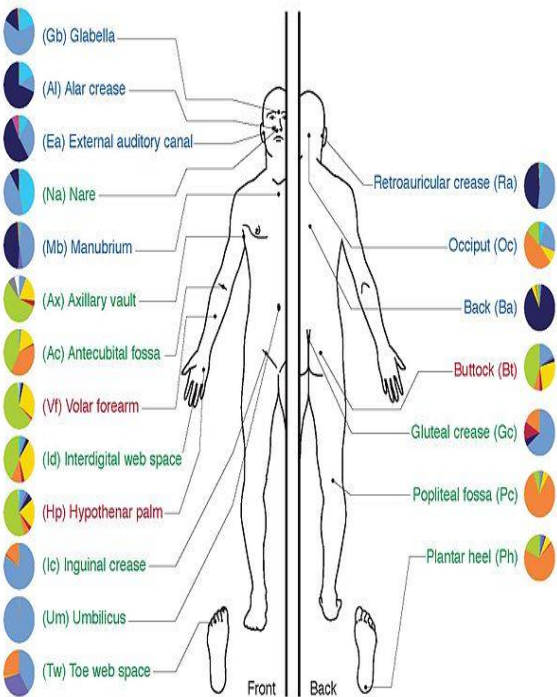
PubMed: microbiota

N= 47.240



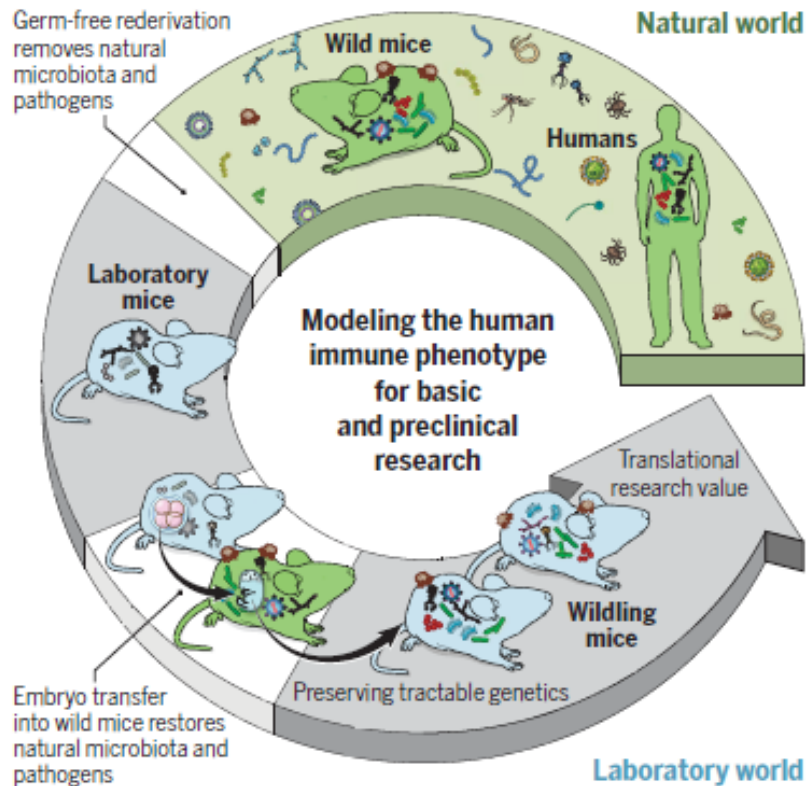
► O corpo humano contém 10 trilhões de células; e 100 trilhões de bactérias na sua microbiota!

- Actinobacteria
 - Corynebacterineae
 - Propionibacterineae
 - Micrococccineae
 - Other Actinobacteria
- Bacteroidetes
- Cyanobacteria
- Firmicutes
 - Other Firmicutes
 - Staphylococaceae
- Proteobacteria
- Divisions contributing < 1%
- Unclassified



Franklin and Ericsson, 2017

Laboratory mice born to wild mice have natural microbiota and model human immune responses



Rosshart e cols, 2019

- Os camundongos selvagens "previram" que as células imunes desejadas não aumentariam em número, ao passo que o trabalho anterior havia sugerido que elas iriam aumentar.



No tratamento da sepse

- camundongos de laboratório apresentaram taxa de sobrevivência em torno de 80% após 4 dias do tratamento.

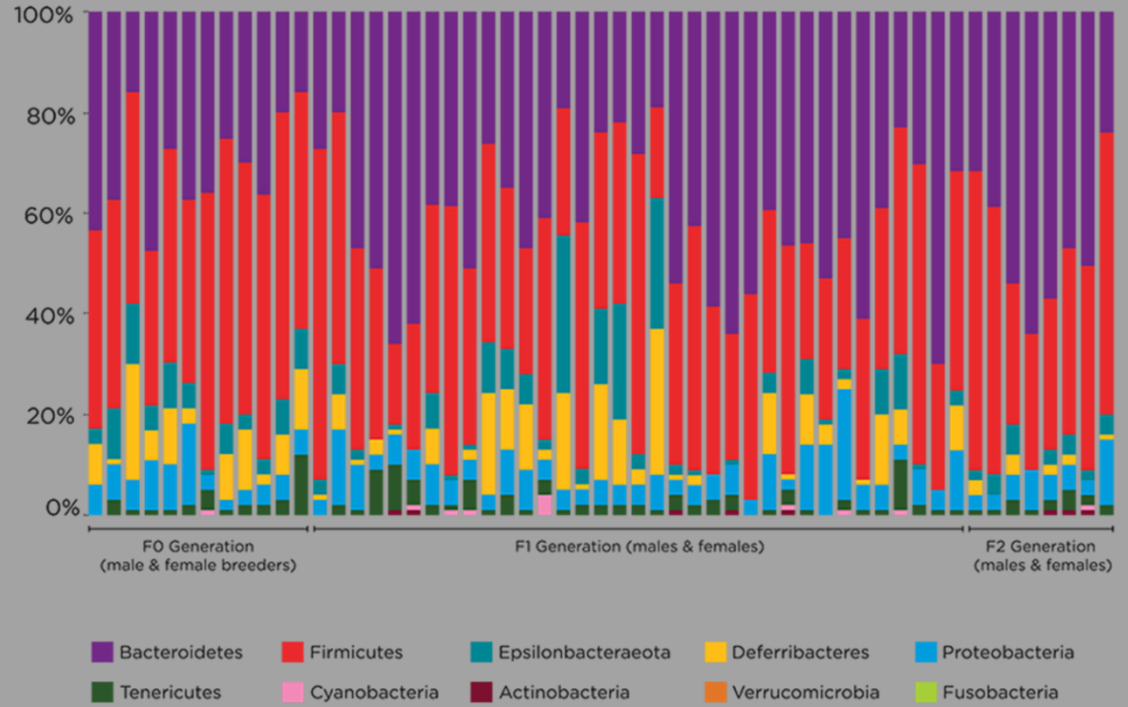
- Camundongos selvagens apenas metade dos ratos sobreviveram no 4º dia, e no 5º dia, apenas 40% sobreviveram

"Nossos camundongos, neste caso, podem ter sido capazes de prever a resposta das pessoas"

Rosshart

Practical Considerations for Fecal Transplantation Experiments in Rodents



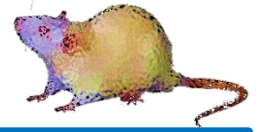


**Qual o melhor modelo animal para minha pesquisa?
- Convencional, SPF ou Gnotobiótico**

Qual a melhor microbiota para meu ensaio?

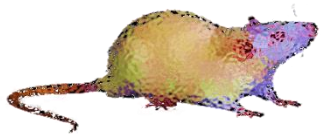
Utilizar diferentes microbiotas?





**“Há um lugar para todos esses modelos,
dependendo da pergunta para sua pesquisa.”**

Rosshart



Obrigado

joelmajerowicz@gmail.com