

MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS: UMA VISÃO ATUAL

Octavio Augusto França PRESGRAVE^{1*}, Cristiane CALDEIRA¹, Isabela GIMENES¹, João Carlos Borges Rolim de FREITAS¹, Saulo de Tasso Borges NOGUEIRA¹, Nathalia Duque Estrada de OLIVEIRA¹, Amanda Gleyce de OLIVEIRA¹, Ronald Santos SILVA¹, Eloisa Nunes ALVES¹, Rosaura de Farias PRESGRAVE¹.

RESUMO - O uso de animais na experimentação e no ensino tem sido severamente criticado. Desde o final da década de 1970, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas na busca de métodos alternativos ao uso de animais, sempre seguindo o princípio dos 3Rs, de Russel e Burch. Apesar de existirem alguns métodos alternativos, a substituição completa de animais ainda não é possível em diversas áreas da experimentação. No que tange a área do ensino, é possível usar alternativas, pelo menos, nos estágios básicos da educação superior. Um novo método necessita, obrigatoriamente, passar por um processo de validação. No Brasil, ainda não existe um órgão responsável por validar os métodos e indicar para a aceitação regulatória. Neste sentido, a criação de um Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos é necessária.

ABSTRACT - The use of animals in experimentation and teaching has been severely criticized. Since the end of 1970 decade many researches have being developed in order to establish alternative methods for animal use, following the Russel and Burch's 3Rs principle. Although we can already count on some alternative methods, the complete animals replace is not possible in many scientific areas yet. In the field of education, at least in the initial University stage, it is possible to replace animals already. A new method needs to be formally validated. Brazil does not have an organism responsible for validating and indicating a method for regulatory acceptance. By this way, the creation of a Brazilian Centre for Validation of Alternative Methods is needed.

¹Departamento de Farmacologia e Toxicologia, INCQS/FIOCRUZ, Avenida Brasil, 4.365 – Manginhos -21045-900 Rio de Janeiro, RJ. * Autor para correspondência

INTRODUÇÃO

O uso de animais na experimentação é muito antigo, uma vez que experimentos utilizando porcos já eram descritos no *Corpus Hippocraticum* (c. 350 a.C.) e vem proporcionando benefícios tanto para o Homem como para os outros animais (HENDRIKSEN, 1996).

O crescente movimento contrário ao uso de animais em pesquisa tem motivado a busca de métodos alternativos. Hoje em dia existem, basicamente, dois grupos distintos em opiniões e posicionamento em relação ao tema: a) os **defensores do bem estar animal**, que não se opõem ao uso de animais na pesquisa biomédica, entretanto, desejam que seja assegurado que, uma vez que os animais necessitem ser utilizados que os mesmos sejam tratados tão humanitariamente quanto possível; e b) os **defensores dos direitos dos animais**, que possuem uma posição mais radical sendo totalmente contrários ao uso de animais na pesquisa, além de se oporem à utilização de animais na alimentação e outras atividades e/ou finalidades, tais como: circo, zoológico etc (PAIXÃO, 2001).

MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS

Um método alternativo pode ser definido como sendo qualquer método que possa ser usado para substituir, reduzir ou refinar o uso de experimentos animais na pesquisa biomédica, ensaios ou educação (WORTH e BALLS, 2002).

Em 1760, Fergusson já demonstrava sua preocupação com o que ele denominava de métodos bárbaros aplicados aos animais. No século XIX, o filósofo e jurista inglês Jeremy Bentham (1748-1832) expressou sua preocupação para com os animais quando colocou que “a questão não é se os animais podem raciocinar, nem se eles podem falar, mas, se os animais sofrem?” (HENDRIKSEN, 1996).

Em 1831, o médico e fisiologista inglês Marshall Hall (1790-1857), lançou o que podemos definir como o primeiro “código de ética” na experimentação, onde ele propunha que: 1) nenhum experimento fosse levado à cabo se as informações pudessem ser obtidas através de observações; 2) nenhum experimento deveria ser conduzido sem um objetivo claro, preciso e passível de ser obtido; 3) os cientistas deveriam estar bem informados sobre o trabalho de seus antecessores, para se evitar qualquer tipo de repetição; 4) experimentos justificáveis deveriam ser

executados levando-se em conta a menor imposição de dor possível, inclusive devendo se utilizar organismos mais inferiores na escala zoológica, ou seja, menos sencientes; e 5) experimentos deveriam ser feitos de forma a produzirem resultados mais claros, diminuindo a necessidade de repetições (HENDRIKSEN, 1996).

Em 1842 é fundada a British Society for the Prevention of Cruelty to Animals, que mais tarde passaria a se chamar Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), que podemos considerar como sendo a primeira sociedade protetora dos animais estabelecida no mundo (HENDRIKSEN, 1996).

Quando, em 1959, William M. S. Russell e Rex L. Burch publicaram o livro intitulado *Principles of Humane Experimental Technique*, no qual foi introduzido o princípio dos 3Rs (Replacement, Reduction, and Refinement – Substituição, Redução e Refinamento), o tema passou a despertar maior interesse. Entretanto, foi somente no final da década de 1970, com a pressão exercida na Europa por grupos protecionistas contra o uso de animais, principalmente coelhos pela indústria de cosméticos, que as pesquisas realmente avançaram (BALLS e STRAUGHAN, 1996; HENDRIKSEN, 1996; PRESGRAVE, 2009a).

Os 3Rs

O termo método alternativo não deve ser entendido somente como substituição, mas sim, contemplando, também, a redução e o refinamento, muito importantes quando não podemos deixar de usar animais (BALLS, 2009; PRESGRAVE, 2009a).

Até o presente momento, a preocupação com os aspectos éticos reside sobre animais do Filo *Chordata*, Sub-filo Vertebrata. Existem alguns grupos e Comissões de Ética que avaliam estudos realizados, também, em insetos e cefalópodos. Entretanto, isso ainda é uma exceção. Em função desse pensamento, também pode ser considerado como substituição o uso de organismos inferiores na escala zoológica, classificados como não protegidos. Como exemplo podemos citar o uso de *Daphnia pulex*, *Artemia salina* e abelhas em estudos, principalmente, de ecotoxicologia (PRESGRAVE, 2009a).

A **substituição** é caracterizada pela não utilização de animais. Para tal, são utilizadas diferentes técnicas para substituir o uso dos mesmos, por exemplo, métodos físico-químicos (p. ex.: medida do pH para determinar se uma substância é

corrosiva e evitar o uso de animais em testes de irritação; HPLC na determinação da potência de insulina, antes, determinada por glicemias em camundongos), culturas de células (ensaios de citotoxicidade, com por exemplo, captação de vermelho neutro para determinar a fototoxicidade), entre outros (BALLS, 2009).

A **redução** pode ser entendida de duas formas: 1) redução do número de animais em um único teste, por exemplo, quando se deixou de usar o teste clássico de DL₅₀ (Dose Letal Média) e passou-se a utilizar métodos que necessitam de no máximo 10 animais para se obter a mesma classificação toxicológica (Método de Classe, Método de Doses Fixas e Up-and-Down); e 2) quando a redução se dá dentro de um processo contínuo, isto é, ao invés de se utilizar animais em todas as fases, seguimos um procedimento de *screening* ou hierarquização de metodologias onde, por exemplo, iniciamos a análise pelo pH; se não for considerado corrosivo, segue-se para uma análise usando um Sistema Inteligente, integrado com um método *in vitro*. Dessa maneira, nas primeiras seqüências de testes nenhum animal é utilizado e, somente nas fases finais, se usam animais, já com a possibilidade de toxicidade bastante reduzida (BALLS, 2009).

A idéia de **refinamento** implica em implementar cuidados e tratamentos aos animais de forma a minimizar qualquer dor ou sofrimento aplicado aos animais que porventura necessitam ser usados. Isto pode ser conseguido: 1) através do uso de anestésicos ou analgésicos, sempre que estes não interfiram nos experimentos (estudos que envolvem dor, o controle negativo não pode receber esses agentes); 2) manutenção dos animais em grupos (quando o desenho experimental não exigir o isolamento, como por exemplo, em estudos de toxicidade reprodutiva); ou 3) aplicação de um programa de enriquecimento ambiental, p. ex., feno autoclavado para coelhos e cobaios, tubos plásticos para camundongos etc (BALLS, 2009).

No Brasil, com exceção das criações de primatas não humanos, pouca importância é para o enriquecimento ambiental. Embora não existam empresas nacionais especializadas na produção de artefatos para esta finalidade, pode-se conseguir implementar um programa de enriquecimento usando rolos de papel higiênico ou similares, tubos de PVC, garrafas plásticas recortadas em forma de iglu, papel toalha para os animais rasgarem, feno autoclavado etc. O importante é cuidar para que o material esteja limpo e não interfira com a experimentação (PRESGRAVE, 2009a).

MÉTODOS ALTERNATIVOS NA EXPERIMENTAÇÃO

O uso de animais de laboratório na experimentação é o mais criticado e combatido atualmente. Embora alguns métodos já possam ser substituídos, muitas áreas ainda necessitam do uso de animais (ABREU, 2008; PRESGRAVE, 2009a; WORTH e BALLS, 2002).

Grande parte dos métodos alternativos emprega técnicas que envolvem cultivos celulares, tendo como desfecho a citotoxicidade ou liberação de mediadores inflamatórios, podendo, também se basearem em outros mecanismos ou efeitos.

Outra área que vem crescendo muito é a de avaliação *in silico*, que trata de sistemas computacionais usados para predizer efeitos, com base em bancos de dados (ABREU, 2008; ALVES *et al.*, 2008; ARAÚLO, 2008; BRUCKNER e CORREA DE MOURA, 2009; CALDEIRA, 2005; DEARDEN *et al.*, 1997; DEWHURST *et al.*, 2006; HARTUNG e WENDEL, 1996; HARTUNG *et al.*, 2001; HOFFMANN *et al.* 2005).

MÉTODOS ALTERNATIVOS NA EDUCAÇÃO

Na educação, a substituição de animais em aulas prática tem apresentado um desenvolvimento maior, quando em comparação com a experimentação (BALCOMBE, 2000). Como principais exemplos de modelos alternativos na educação, podemos citar (GREIF, 2003):

- vídeos – através destes, várias práticas podem ser demonstradas, desde o manuseio de animais até técnicas cirúrgicas, procedimentos diversos etc. Existem diversos vídeos que mostram sinais clínicos, anestesia, técnicas de administração de drogas e coleta de sangue, entre outros procedimentos experimentais.

- simuladores – são CD-ROMs que apresentam ao aluno diversas possibilidades de aprendizagem, principalmente na área da farmacologia e fisiologia. Existem multimídias abrangendo ação de drogas nos sistemas nervoso e cardiovascular, por exemplo. Alguns *softwares* permitem o uso de várias concentrações de agonistas e antagonistas e, ainda direcionam os estudantes, através de perguntas, ao estudo mais aprofundado do fenômeno que está sendo observado.

- modelos – existem “cães” e “gatos” (Critical Care Jerry™ e Fluffy™), “rolos” feitos com diferentes materiais, com textura próxima às camadas da pele, para treinamento de incisões cirúrgicas e suturas (DASIE™ – Dog Abdominal Surrogate for Instructional Exercises). Aplicável às Ciências de Animais de Laboratório, o rato de borracha (Koken™ rat) é muito útil para treinamento de administração via oral (gavagem), injeção pela veia caudal, entubação oro-traqueal e manuseio em geral.

- cadáveres – muito utilizado no ensino de anatomia e técnicas cirúrgicas. O uso de cadáveres apresenta como vantagem a manutenção da fidelidade anatômica e possibilita a ocorrência de fatos que podem acontecer no procedimento real, tais como hemorragias. Deve-se ter especial atenção para que os cadáveres tenham origem ética, devendo ser aceitos somente os que resultaram de morte natural, por exemplo.

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ALTERNATIVOS

Qualquer metodologia, *in vivo* ou *in vitro* necessita de uma validação formal para que possa ser utilizada de forma a atender o seu objetivo específico. Isso faz com que o desenvolvimento e disponibilização de métodos alternativos seja relativamente lento (hoje, estima-se um tempo ao redor de 10 anos para um estudo completo, incluindo validação e aceitação regulatória). Dessa forma, temos então, os métodos válidos e os validados (BALLS *et al.*, 1995; BALLS *et al.*, 2006; HARTUNG *et al.*, 2004; ICCVAM, 1997; OECD, 2005).

Métodos válidos – são aqueles não passaram, necessariamente, por um processo completo de validação, mas existe uma quantidade suficiente de dados científicos para mostrar sua relevância e confiabilidade (PAUWELS e ROGIERS, 2004). Isto significa dizer que são métodos ainda em estudo, entretanto, passíveis de serem usados, ou seja, com grande possibilidade de virem a ser validados (exemplos: HET-CAM e NRU).

Métodos validados – são aqueles para os quais a relevância e a confiabilidade estão estabelecidos para um propósito particular, de acordo com critérios estabelecidos (PAUWELS e ROGIERS, 2004). Dessa forma, um método válido é aquele que já passou por estudo colaborativo e tem sua metodologia e seus critérios bem definidos e aceitos oficialmente (exemplos: TER e UV-NRU).

A validação se define como sendo o ato de estabelecer a confiabilidade e relevância de um método para um propósito particular, onde, por confiabilidade se entende como a reprodutibilidade de resultados, intra- e inter-laboratorial, bem como ao longo do tempo, relevância é o valor científico e sua utilidade prática e propósito significa a aplicação pretendida do procedimento.

PROCESSO DE VALIDAÇÃO

No Brasil, não existe um procedimento formal para se validar um método, como existe na União Européia. O procedimento de validação envolve diversas etapas bem definidas. É importante ressaltar alguns pontos: a) um método alternativo somente pode ser tido como válido se cumpre dois critérios: confiabilidade e relevância; b) tem que existir independência entre os grupos que executam a distribuição, análise do material, análise dos dados, pois isto elimina qualquer tendência na avaliação dos dados; c) as amostras têm que ser codificadas; e d) os laboratórios participantes precisam seguir as Boas Práticas de Laboratório (BPL). O processo de validação envolve as seguintes etapas (BALLS *et al.*, 1995; BALLS *et al.*, 2006; HARTUNG *et al.*, 2004; OECD, 2005):

Pré-validação – estudo inter-laboratorial em pequena escala, realizado para assegurar que o protocolo está suficientemente padronizado para inclusão em um estudo de validação formal. esta etapa compreende 3 fases distintas:

Fase I - Refinamento – onde o *Lab 1* ou laboratório “líder” desenvolve o método, descreve o protocolo e define os parâmetros.

Fase II - Transferência – onde o *Lab 1* passa o protocolo para o *Lab 2*, que, por sua vez, repassa ao *Lab 3*. Nesta fase, aproveita-se para verificar a facilidade de transferência do protocolo.

Fase III - Execução – onde os *Labs 1, 2 e 3* executam o protocolo experimental e esses dados preliminares são avaliados.

Validação (propriamente dita) – estudo inter-laboratorial em larga escala, desenhado para garantir a confiabilidade e relevância de um método otimizado para um propósito particular. Nesta etapa podemos aumentar o número de laboratórios participantes, o número de amostras estudadas ou ambos.

CONCLUSÕES

O uso de métodos alternativos apresenta diversas vantagens que vão, desde as mais óbvias, como a não utilização de animais quando se trata de métodos de substituição até outras vantagens como a redução de custos, já que não se faz necessária a existência de infra-estrutura de biotérios para criação e manutenção dos animais. Também podemos apontar como vantagens que métodos *in vitro* podem ser menos sujeitos a interferentes externos, já que os animais sofrem influência de presença de ruídos, alterações de metabolismo em função de alguma modificação de temperatura, ciclo de luz, umidade etc. Da mesma forma, o espaço requerido para um teste *in vitro* é muito menor do que necessário para o estabelecimento de um biotério. Isso facilita de forma significativa a difusão e implantação desses métodos.

Quando se trata de métodos de redução ou refinamento, essas vantagens residem no uso de menos animais e na manutenção do bem-estar dos mesmos, uma vez que se melhora as condições experimentais e de manejo animal.

Praticamente não existem desvantagens no uso de alternativas, entretanto, duas limitações podem ser levantadas: a) a falta de interação com o organismo vivo, que, à medida em que se conhece bem o modelo experimental, pode ser contornado; e b) os custos, que na realidade, podem ser grandes no momento da implantação e na compra de *kits* comerciais, mas que, também, com a validação do método, fará com que esses *kits* sejam usados de forma mais otimizada reduzindo os custos.

Devemos ter em mente que estudos que envolvem toxicidade reprodutiva, aprendizagem, dor, metabolismo, cinética, toxicidade crônica, entre outros, ainda não são passíveis de substituição por modelo não-animal.

As Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs) possuem importante papel na orientação quanto aos métodos alternativos, bem como na conscientização dos pesquisadores no trato humanitário dos animais, quando estes necessitam realmente serem utilizados. Isto deve ser feito através da análise dos protocolos de pesquisa seguindo os guias internacionais, avaliando se os procedimentos descritos são repetitivos, se respondem à pergunta do projeto etc.

A interação entre pesquisadores e protecionistas é de suma importância, sempre considerando o respeito e que cada parte se ajude mutuamente, mostrando determinados aspectos que implementem o desenvolvimento de métodos alternativos sem que uma parte queira se sobrepor à outra, sempre tomando cuidado para não haver inversão de valores colocando a saúde das pessoas em risco.

No Brasil ainda não existe um órgão responsável diretamente por validar métodos alternativos. Por esse motivo, a criação de um Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos se faz necessária para manter contato com centros internacionais similares e se estabelecer programas de validação internamente, além de unir os diversos grupos que trabalham de forma isolada, muitas vezes por falta de fomento específico para estes estudos (PRESGRAVE, 2008; PRESGRAVE, 2009b; ESKES *et al.*, 2009)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, C. L. C.; PRESGRAVE, O. A. F.; DELGADO, I. F. Metodologias alternativas à experimentação animal: aplicação no controle da qualidade de produtos sujeitos à ação da Vigilância Sanitária. **Revista do CFMV**, Brasília, v. 45, p.20-27, 2008.

ALVES, E. N.; PRESGRAVE, R. F.; PRESGRAVE, O. A. F.; et al. A reassessment of the *in vitro* RBC haemolysis assay with defibrinated sheep blood for the determination of the ocular irritation potential of cosmetic products: comparison with the *in vivo* Draize Test. **ATLA**, v. 36, p.75-284, 2008.

ARAÚJO, H. P. **Avaliação de metodologia oficial *in vivo* e desenvolvimento de metodologia de inibição da citotoxicidade *in vitro* para a determinação de potência de soro antibotrópico**. 2008. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2008.

BALCOMBE J. **The use of animals in higher education: problems, alternatives and recommendations**. Washington DC: Humane Society Press, 2000.

BALLS, M. **The Three Rs and the Humanity Criterion**. Nottingham, UK: FRAME, 2009.

BALLS, M.; BLAAUBOER, B. J.; FENTEM, J. H.; et al. Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. **ATLA**, v. 23, p. 129-147, 1995.

BALLS, M.; STRAUGHAN D.W. The 3Rs of Russel & Burch and the testing of biological products. In: BROWN F., CUSSLER K., HENDRIKSEN C. (Eds). Replacement, reduction and refinement of animal experiments in the development and control of biological products. **Dev. Biol. Stand.**, v. 86, p. 11-18, 1996.

BALLS, M.; AMCOFF, P.; BREMER, S. et al. The principles of weight of evidence validation of test methods and testing strategies. The report and recommendations of ECVAM workshop 58. **ATLA**, v. 34, p. 603-20, 2006.

BRUCKNER, L.; CORREA DE MOURA, W. Potency testing of rabies vaccine for human and veterinary use, possibilities for alternatives. In: Abstracts of the 7th WORLD CONGRESS ON ALTERNATIVES & ANIMAL USE IN THE LIFE SCIENCES; 2009 Aug 30-Sep03; Rome, Italy. **ALTEX**, v. 26, n. Spec. Issue, p. 163, 2009.

CALDEIRA, C.; GIMENES, I. C.; FREITAS, J. C. B. R. et al. The use of Mono Mac 6 cells as indicators of endotoxin contamination in the quality control of injectable products. In: Abstracts of the 5th WORLD CONGRESS ON ALTERNATIVES & ANIMAL USE IN THE LIFE SCIENCES; 2005 Aug 21-25; Berlin, Germany. **ALTEX**, v. 22, n. Special Issue, p. 213, 2005.

DEARDEN, J.C.; BARRATT, M.D.; BENIGNI, R. et al. The development and validation of expert systems for predicting toxicity the report and recommendations of an ECVAM/ECB workshop (ECVAM workshop 24). **ATLA**, v. 25, n. 3, p. 223-252, 1997.

DEWHURST, D.; CROMAR, S.; ELLAWAY, R. RECAL: Creating Computer-assisted Alternatives Using a Sustainable Learning Objects Approach. **ALTEX**. V. 23 Suppl. p. 54-7, 2006.

ESKES, C.; SÁ-ROCHA, V. M.; NUNES, J. et al. Proposal for a Brazilian centre on alternative test methods. **ALTEX**, v. 26, p. 295-298, 2009b.

GREIF, S. Alternativas ao uso de animais vivos na educação: pela ciência responsável. Instituto Nina Rosa, São Paulo, 2003.

HARTUNG, T.; WENDEL, A. Detection of pyrogens using human whole blood. **In Vitro Toxicol**, v. 9, n.4, p.353-359, 1996.

HARTUNG, T.; AABERGE, I.; BERTHOLD, S. et al. Novel pyrogen tests based on the human fever reaction. **ATLA**, v. 29, p. 99-123, 2001.

HARTUNG, T.; BREMER, S.; CASATI, S. et al. A modular approach to the ECVAM principles on test validity. **ATLA**, v. 32, p. 467-472, 2004.

HOFFMANN, S.; PETERBAUER, A.; SCHINDLER, S. et al. International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoid cells. **J Immunol Methods**, v. 298, n. 1-2, p. 161-73, 2005.

HENDRIKSEN, C.F.M. A short history of the use of animals in vaccine development and quality control. *In*: BROWN F, CUSSLER K, HENDRIKSEN C (Eds). Replacement, reduction and refinement of animal experiments in the development and control of biological products. **Dev. Biol. Stand.** v. 86, p. 3-10, 1996.

ICCVAM. **Validation and regulatory acceptance of toxicological test methods: a report of the ad hoc Interagency Coordinating Committee of Alternative Methods**. 1997. NIH Publication No: 97-3981, National Institutes of Health, March 1997.

OECD. **Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. 2005. OECD Series on Testing and Assessment, Number 34. ENV/JM/MONO(2005)14**, 96pp. Paris, France: Organisation for Economic Co-operation and Development.

PAIXÃO, R. L. **Experimentação animal: razões e emoções para uma ética**. [Doutorado] Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública; 2001.

PAUWELS, M., ROGIERS, V. Safety evaluation of cosmetics in the EU: Reality and changes for the toxicologist. **Toxicol. Letters**, v. 151, p. 7-17, 2004.

PRESGRAVE, O. A. F. The need of the establishment of a Brazilian Centre for the Validation of Alternative Methods (BraCVAM). **ATLA**, v. 36, p. 705-708, 2008.

PRESGRAVE, O. A. F. Métodos alternativos. *In*: LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G. M.; KO, G. M. (Org.). **Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório**. São Paulo: Atheneu Editora, 2009a.

PRESGRAVE, O. A proposal of establishing a Brazilian center for validation of alternative methods (BraCVAM). In: Abstracts of the 7th WORLD CONGRESS ON ALTERNATIVES & ANIMAL USE IN THE LIFE SCIENCES; 2009 Aug 30-Sep03; Rome, Italy. *ALTEX*; 26 (Spec. Issue):19, 2009b.

WORTH, A.P.; BALLS, M. Alternative (non-animal) methods for chemical testing: current status and future prospects. *ATLA*, v. 30, Suppl. 1, p.13-19, 2002.