

Ministério da Ciência, Tecnologia,
Inovações e Comunicações (MCTIC)

CONCEA

Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

GUIA

BRASILEIRO DE PRODUÇÃO
MANUTENÇÃO OU UTILIZAÇÃO
DE ANIMAIS EM ATIVIDADES DE
ENSINO OU PESQUISA CIENTÍFICA

FASCÍCULO 2

ROEDORES E LAGOMORFOS MANTIDOS
EM INSTALAÇÕES DE INSTITUIÇÕES
DE ENSINO OU PESQUISA CIENTÍFICA

1ª Edição

Brasília, 30 de maio de 2019

MINISTRO DE ESTADO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES

MARCOS PONTES

SUBSECRETARIA DE CONSELHOS E COMISSÕES

ISABELA SBAMPATO BATISTA REIS DE PAULA

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

PRESIDENTE

MARCOS PONTES

COORDENADORA

RENATA MAZARO E COSTA

CONSELHEIROS:

I – Representantes do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações:

Renata Mazaro e Costa – Titular

Helder Lima de Queiroz - Suplente

II – Representantes do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico:

Ekaterina Akimovna Botovchenco Rivera – Titular

Luisa Maria Gomes de Macedo Braga – Suplente

III – Representantes do Ministério da Educação:

Isabella Fernandes Delgado – Titular

Catarina Segreti Porto – Suplente

IV – Representantes do Ministério do Meio Ambiente:

Luciana Carvalho Crema – Titular;

Eliana Reiko Matushima – Suplente;

V – Representantes do Ministério da Saúde:

Níve Aguiar Colonello Frattini – Titular

Lucas Francisco Ribeiro do Nascimento – Suplente

VI – Representantes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento:

VII – Representantes do Conselho de Reitores das Universidades do Brasil:

Nilton Abreu Zanco – Titular

VIII – Representantes da Academia Brasileira de Ciências:

Paulo Hilário Nascimento Saldiva – Titular

Dulciene Maria de Magalhães Queiroz – Suplente

IX – Representantes da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência:

Letícia Veras Costa Lotufo – Titular

Leda Quercia Vieira – Suplente

X – Representantes da Federação das Sociedades de Biologia Experimental:

Marcel Frajblat – Titular

Ingrid Dragan Taricano – Suplente

XI – Representantes da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório:

André Silva Carissimi – Titular

Octávio Augusto França Presgrave – Suplente

XII – Representantes da Federação Brasileira da Indústria Farmacêutica:

Lauro Domingos Moretto – Titular

Antônio Anax Falcão de Oliveira – Suplente

XIII – Representantes das sociedades protetoras de animais legalmente estabelecidas no País:

Stélio Pacca Loureiro Luna – Titular

Vanessa Carli Bones – Suplente

Thales Astrogildo e Tréz - Titular

XIV – Coordenadores-gerais do Guia

Marcel Frajblat – novembro de 2012 a junho de 2014

Norma Labarthe – julho de 2014 a novembro de 2015

Marco Antonio Stephano – dezembro de 2015 a julho de 2017

Luisa Maria Gomes de Macedo Braga – a partir de agosto de 2017

COMPOSIÇÃO DA SECRETARIA-EXECUTIVA DO CONCEA

Gabinete da Secretaria-Executiva do Concea

Márcia dos Santos Gonçalves - Secretária Executiva

Secretariado

Silmara Silva Cavalcanti

Elaine Alves da Silva

Lorena Karen Alves de Araújo

a) Técnicos

Antônio Américo Barbosa Viana – Tecnologista em Ciência e Tecnologia

Marcelo Kenji Nishida – Tecnologista em Ciência e Tecnologia

b) Assistentes

Rafael Augusto de Souza Viana – Assistente em Ciência e Tecnologia

Zélia Rodrigues Sardinha – Assistente em Ciência e Tecnologia

c) Apoio Administrativo

Paulo Roberto Costa

Leonice Santos Sousa

d) Auxiliar Administrativo

Leide de Souza Ferreira

e) Estagiário

Renato Gonçalves da Silveira Neto

B823g Brasil. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica: fascículo 2: roedores e lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica [recurso eletrônico] / coordenadora: Luisa Maria Gomes de Macedo Braga ; Vânia Gomes Moura Mattaraia... [et al.] – Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações, 2019. XX p. il.

Conteúdo: Estrutura física e ambiente de biotérios / Luisa Maria Gomes de Macedo Braga, Joel Majerowicz, Luiz Augusto Correa Passos, Rovilson Gilioli – Procedimentos / Vânia Gomes Moura Mattaraia, Ana Maria Guaraldo, Bruno Lourenço Diaz, Gui Mi Ko, Ingrid Dragan Taricano, Marcel Frajblat, Marco Antônio Stephano, Nanci do Nascimento, Silvia Maria Gomes Massironi, Valdevez Bastos Valero Lapchik. ISBN: 978-85-88063-76-1

1. Animais de laboratório. 2. Experiência com animais. 3. Pesquisa científica. 4. Projeto de pesquisa. I. Título.

CDU 636.028

ESTRUTURA FÍSICA E AMBIENTE DE BIOTÉRIOS

ESTRUTURA FÍSICA E AMBIENTE DE BIOTÉRIOS

Luisa Maria Gomes de Macedo Braga – Consultora em Ciência de Animais de Laboratório (autônoma)

Joel Majerowicz – Fundação Oswaldo Cruz

Luiz Augusto Correa Passos – Universidade Estadual de Campinas

Rovilson Gilioli – Universidade Estadual de Campinas

PROCEDIMENTOS

Vânia Gomes Moura Mattaraia – Instituto Butantan – Coordenadora

Ana Maria Guaraldo – Universidade Estadual de Campinas (in memoriam)

Bruno Lourenço Diaz – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Gui Mi Ko – Universidade Federal de São Paulo

Ingrid Dragan Taricano – Universidade Nove de Julho

Marcel Frajblat – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Marco Antônio Stephano – Universidade de São Paulo

Nanci do Nascimento – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

Rovilson Gilioli – Universidade Estadual de Campinas

Silvia Maria Gomes Massironi – Universidade de São Paulo

Valderez Bastos Valero Lapchik – Universidade Federal de São Paulo

FASCÍCULOS

GUIA BRASILEIRO DE PRODUÇÃO, MANUTENÇÃO OU UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS EM ATIVIDADES DE ENSINO OU PESQUISA CIENTÍFICA

Sumário dos Fascículos

- 1 Introdução geral
- 2 Roedores e lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica**
- 3 Cães e Gatos domésticos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica
- 4 Primatas não humanos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica
- 5A Peixes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica para fins de estudo biológico ou biomédico – I - Lampari, ilápia e Zebrafish
- 5B Peixes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica – II
- 6 Anfíbios e serpentes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica
- 7A Pequenos ruminantes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica
- 7B Grandes ruminantes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica
- 8 Equídeos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica
- 9 Suínos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica
- 10 Aves mantidas em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica
- 11 Estudos conduzidos com animais silvestres mantidos fora de instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica
- 12 Estudos conduzidos com animais domésticos mantidos fora de instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica
- 13 Reptéis (exceto serpentes) mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica
- 14 Animais silvestres de vida livre

INTRODUÇÃO GERAL	7
1 Bem-estar animal	9
2 Métodos alternativos ao uso de animais	12
3 Planejamento de novos projetos	14
4 Obtenção de aprovação para novos protocolos de pesquisa	35
5 Referências bibliográficas	38

ROEDORES E LAGOMORFOS MANTIDOS EM INSTALAÇÕES DE INSTITUIÇÕES DE ENSINO OU PESQUISA CIENTÍFICA

ESTRUTURA FÍSICA E AMBIENTE DE BIOTÉRIOS	41
1. INTRODUÇÃO	42
2. INSTALAÇÕES	42
2.1 LOCALIZAÇÃO	43
2.2. AMBIENTES FÍSICOS	44
2.2.1. ÁREAS DE APOIO:	44
2.2.1.1.1 Administrativo	44
2.2.1.2. Áreas de Recepção de animais e Quarentena	44
2.2.1.3. Sala de procedimentos	44
2.2.1.4. Ambientes especiais	44
2.2.1.5. Salas de Descanso e Copa	45
2.2.2 ÁREAS DE SERVIÇO	45
2.2.2.1 Área de Higienização	45
2.2.2.2 Vestiários	45
2.2.2.3 Corredores	45
2.2.2.4 Lavanderia	45
2.2.2.5 Sanitários	45
2.2.2.6 Salas de Animais	46
2.2.2.7 Área para Eutanásia	46

2.2.3 DEPÓSITOS	46
2.2.3.1 Depósito para estocagem de Insumos: Ração e Forragem	46
2.2.3.2 Depósito de Resíduos	47
2.2.3.3 Depósito para Materiais Limpos	47
2.2.4 BARREIRAS SANITÁRIAS E DE CONTENÇÃO	47
2.2.5 DETALHES CONSTRUTIVOS	47
2.2.5.1 Paredes	47
2.2.5.2 Tetos	48
2.2.5.3 Pisos	48
2.2.5.4 Janelas	48
2.2.5.5 Portas	49
2.2.5.6. Fornecimento de Energia elétrica e Iluminação	49
2.2.6 AMBIENTE DE BIOTÉRIOS	50
2.2.6.1 Ruídos	50
2.2.6.2. Vibrações	51
2.2.6.3 Iluminação	51
2.2.6.4 Temperatura e Umidade	51
2.2.6.5 Ventilação, Exaustão e Qualidade do Ar	52
2.2.6.5.1 O emprego de racks ventilados em salas de animais e biotérios de experimentação	54
2.2.7 ALOJAMENTO	54
PROCEDIMENTOS	57
1. INTRODUÇÃO	57
1.2 ESPÉCIES	57
1.2.1 Camundongo	57
1.2.2 Rato	58
1.2.3 Cobaia	58
1.2.4 Hamster	58
1.2.5 Coelho	59

2. PROCEDIMENTOS PARA ÁREA DE PRODUÇÃO E MANUTENÇÃO DE ROEDORES E LAGOMORFOS	59
2.1 Recinto primário e secundário	60
2.2 Procedimentos para área de produção e manutenção de roedores e lagomorfos	60
2.2.1 Alimentação e Hidratação	60
2.2.1.1 Alimento	60
2.2.1.2 Estocagem dos alimentos	62
2.2.1.3 Água	63
2.2.2 Modificação da ingestão de alimento e água	63
2.2.2.1 Restrição alimentar	64
2.2.2.2 Restrição de líquidos	64
2.2.2.3 Modificação de comportamento alimentar ou hídrico	65
2.2.3 Manejo	65
2.2.3.1 Identificação	67
2.2.4 Troca	68
2.2.5 Área de higienização	68
2.2.6 Segurança do operador Manejo	69
2.2.7 Descarte de materiais	70
2.2.8 Cuidados de fins de semana e feriados Manejo	70
3. PROCEDIMENTOS DE COLETA DE FLUIDOS CORPORAIS, SECREÇÕES E EXCREÇÕES	70
3.1.1 Urina	71
3.1.2 Secreção nasal	71
3.1.3 Secreção ocular	71
3.1.4 Material bucal	71
3.1.5 Leite	71
3.1.6 Fezes	71
3.1.8 Sêmen	72
3.1.9 Sangue	72
3.2 Considerações gerais para minimizar os efeitos adversos da coleta de fluidos corporais, secreções e excreções para orientar a seleção dos métodos	72
3.3 Considerações importantes para a coleta de sangue	73

4. VIAS DE ADMINISTRAÇÃO DE SUBSTANCIAS	74
4.1.1 Via oral (VO)	74
4.1.2 Via intravenosa (IV)	74
4.1.3 Via intraperitoneal (VO)	75
4.1.4 Via subcutânea (SC)	75
4.1.5 Via intramuscular (IM)	75
4.2 Cuidados a serem considerados para administração de substancias em animais	75
5. ESTUDOS FETAIS E EMBRIONÁRIOS	76
5.1 Técnicas laparoscópicas – Dor ou distresse maternal	76
5.2 Dor e perturbação fetal	77
6. CONTROLE DA DOR: ANESTESIA, ANALGESIA E SEDATIVOS	77
6.1 Seleção do protocolo de anestesia	77
6.2 Questões específicas a considerar	78
6.3 Anestesia	78
6.4 Anestesia geral	78
6.5 Anestesia inalatória	79
6.6 Câmara anestésica	79
6.7 Anestesia injetável	79
6.8 Administração de anestésicos e via de predileção	80
6.9.1 Intravenosa (IV)	80
6.9.2 Intraperitoneal (IP)	80
6.9.3 Subcutânea (SC)	80
6.9.4 Intramuscular (IM)	80
6.10 Anestesia local	81
6.11 Técnicas especializadas	81
6.12 Cuidados gerais para a eficácia da anestesia	81
6.13 Profundidade da anestesia	83
6.14 Temperatura do corpo	84
6.15 Analgesia	85
6.16 Analgesia preventiva ou protetiva	85

6.17	Analgesia	85
6.18	Analgesia preventiva ou protetiva	85
6.19	Analgesia Multimodal	85
6.20	Monitoração da analgesia	86
6.21	Ansiolíticos	86
6.22	Manuseio seguro de analgésicos	86
6.23	Procedimentos cirúrgicos	87
7.	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	87
7.2	Técnica asséptica	87
7.8	Equipe técnica	90
8.	TOXICOLOGIA	91
8.1	Testes toxicológicos	91
8.2	Metodologias adotadas para avaliação de risco	92
8.4	Métodos alternativos	93
8.5	Projetos de estudo para atender às necessidades regulatórias	93
8.6	Minimizar a dor e a perturbação	94
9.	PROCEDIMENTOS PARA MODIFICAÇÃO NO COMPORTAMENTO ANIMAL	94
9.1	Estratégias para modificar o comportamento	95
9.5	Cuidados a serem considerados para a modificação do comportamento	97
10.	INDUÇÃO DE TUMOR	97
10.1	Considerações de bem-estar animal	98
10.2	Monitoramento da dor e distresse	99
11.	PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS	100
11.1	Materiais	102
11.2	Produção de anticorpos policlonais em coelhos com adjuvante oleoso (emulsão)	103
11.3	Produção de anticorpos policlonais em coelhos com hidróxido de alumínio	103
12.	ESTRATÉGIAS DE ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL	104
12.1	Cuidados a serem considerados para o enriquecimento ambiental	104
12.2	Sugestões de enriquecimento ambiental para roedores e lagomorfos	104
12.3	Enriquecimento ambiental para roedores	104

12.2.1.1	Social	104
12.2.1.2	Relação homem-animal	105
12.2.1.3	Alimento	105
12.2.1.4	Ambiente físico	105
12.2.1.5	Estimulação olfatória	106
12.2.1.6	Enriquecimento ambiental para coelhos	107
12.2.2.1	Social	107
12.2.2.2	Humano-animal	107
12.2.1.3	Alimento	107
12.2.2.4	Ambiente físico	107
12.2.2.5	Estimulação olfatória	107
12.2.2.6	Promoção de tipos de comportamento naturais	108

REFERÊNCIA

108

Introdução

GERAL

Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica

INTRODUÇÃO GERAL

Coordenador: *Bruno Lourenço Diaz – Universidade Federal do Rio de Janeiro*

Autores: *Adriano da Silva Campos – Fundação Oswaldo Cruz*
Bruno Lourenço Diaz – Universidade Federal do Rio de Janeiro
Ekaterina Akimovna Botovchenco Rivera – Universidade Federal de Goiás
José Mauro Granjeiro – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
Luisa Maria Gomes de Macedo Braga – Consultora em Ciência de Animais de Laboratório (autônoma)
Marcel Frajblat – Universidade Federal do Rio de Janeiro
Marco Antonio Stephano – Universidade de São Paulo

INTRODUÇÃO GERAL

O Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica (Guia) contempla uma das competências do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea).

A Lei Federal 11.794, que em seu capítulo II, artigo 4º, criou o Concea, representa uma mudança de paradigma no que tange ao uso de animais vertebrados para ensino e pesquisa no Brasil. Como Lei Federal, gerou condições para que se estabelecesse uma política nacional para o uso de animais no ensino e na pesquisa. Nesse sentido, a pertinência, bem como a análise crítica da real necessidade do uso de animais em situações experimentais, constituem bases imprescindíveis para que a sociedade como um todo compreenda e aceite como justificável a participação de animais em procedimentos didáticos e científicos. Tarefa difícil que não se consolida sem a introdução de normas, diretrizes e guias que visem orientar a todos que utilizam animais nessas áreas.

A construção deste GUIA resulta de um trabalho do Concea em conjunto com especialistas, constituindo-se em um documento que tem por finalidade nortear pesquisadores quanto ao uso de animais para ensino e pesquisa. Deve-se ressaltar que este Guia se aplica aos animais do filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, utilizados em atividades de ensino e pesquisa, conforme prevê a Lei 11.794/08.

Este documento, além de considerar as particularidades e necessidades de nossas instituições de ensino, laboratórios e instalações animais, usou, a título de orientação, *Guidelines* internacionais com o objetivo de ofertar elementos para que os usuários possam priorizar o bem-estar animal e minimizar a dor e as consequências negativas da manipulação dos animais.

Serão apresentadas formas de como identificar e reconhecer evidências de dor e distresse e a potencial relação destes com a manipulação animal. Dará aos usuários indicações de como desenvolver estratégias para minimizar situações consideradas distressantes e de como manter e incrementar o bem-estar animal, além de oportunizar uma reflexão sobre a necessidade do uso de animais para atingir os objetivos de seus projetos de pesquisa.

Adicionalmente, identifica as estruturas mínimas necessárias às edificações em que os animais são criados, mantidos ou submetidos aos experimentos, bem como os equipamentos necessários para mantê-los com qualidade sanitária e bem-estar.

O Guia traz orientações aos usuários para o estabelecimento de uma reflexão crítica ao uso dos animais, de uma percepção da relação custo/benefício e do valor intrínseco aos resultados pretendidos em seus projetos de pesquisa e atividades didáticas. Preenchidas essas condições é imperativo que os usuários recebam previamente, ao início de suas atividades com animais, a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais, por meio do envio de formulários de proposta de uso animal (Formulário unificado para solicitação de autorização para uso de animais em ensino e/ou pesquisa; em *site* Concea – MCTIC).

A percepção de que os animais de experimentação são seres sencientes e que seu uso pode contribuir para a geração de conhecimento deve ser acompanhada da inserção dos pesquisadores aos conceitos dos 3Rs (“*reduction, refinement, replacement*”), que no Brasil são traduzidos como Redução, Refinamento e Substituição. Vale enfatizar que o não cumprimento das orientações estabelecidas neste Guia para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa poderá incorrer em sanções administrativas, bem como, posteriormente, em sanções penais, caso sejam configurados maus tratos.

I. BEM-ESTAR ANIMAL

O cuidado com animais em atividades de ensino ou pesquisa era limitado a prover manejo e alojamento adequados aos animais, com pessoas capacitadas, objetivando assim, um mínimo de variáveis em resultados de pesquisas. Atualmente persistem as mesmas exigências, todavia com especial atenção ao bem-estar dos animais. Nesse sentido, o *status* atual da Ciência considera a somatória da excelência de sólidas bases científicas com o bem-estar animal.

A lei 11.794/08, que regulamenta a utilização animal em nosso país, transformou o bem-estar dos animais não só em uma questão ética e humanitária, mas também em uma questão legal.

Existem várias definições de bem-estar animal e quase todas o caracterizam como um estado onde há equilíbrio físico e mental do animal com o seu ambiente. Porém, mais do que buscar definições, o objetivo de cada um deve ser o de prover condições aos animais para que suas necessidades possam ser satisfeitas e danos possam ser evitados. É importante saber reconhecer se o animal está em bem-estar ou não, para que se possa tomar providências quando necessário. Com essa premissa em mente alguns pontos deverão ser levados em consideração pelo pesquisador ou pelo técnico ao pensar no bem-estar dos animais que serão utilizados.

É importante salientar que uma proposta de utilização de animais deve avaliar, sempre, a relação custo (sofrimento dos animais) *versus* benefício (resultados advindos da pesquisa ou atividade didática). Não se pode deixar de citar que o custo para o bem-estar de animais produzidos, mantidos ou usados para procedimentos científicos possui dois componentes distintos: o primeiro é o custo inerente que compreende os aspectos negativos da produção e cuidados e o segundo é o custo direto (danos) resultante dos procedimentos experimentais aplicados (RUSSELL & BURCH, 1959).

Outro aspecto a ser considerado é o de lembrar que a utilização de animais na pesquisa ou ensino sempre impactará negativamente no seu bem-estar; seja porque os animais serão expostos a manipulações diversas; a alterações genéticas ou somente por mantê-los em ambientes padronizados, que podem não preencher totalmente suas necessidades e adaptações.

A elaboração do projeto de pesquisa ou atividade didática deve levar em consideração os seguintes aspectos:

- estar ciente de que a dor e o sofrimento dos animais devem ser minimizados ou evitados. Este item é tão importante quanto alcançar os objetivos científicos ou didáticos;
- seguir os princípios éticos da utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica e os conceitos dos 3Rs;
- conhecer a biologia e a etologia da espécie que será utilizada. Lembrar as diferenças entre espécies e que o bem-estar possui dois componentes: o físico e o comportamental;
- documentação da atividade didática por meio de filmagens, gravações ou fotografias de forma a permitir sua reprodução para ilustrar práticas futuras, evitando-se a repetição desnecessária de procedimentos didáticos com animais;
- prover alojamento, ambiente, alimentação e controle ambiental adequados para a espécie;
- realizar manejo adequado para a espécie e prever que ele seja executado por pessoas treinadas para esse fim, pois a intensidade de sofrimento causado pelo mau manejo e mau alojamento muitas vezes supera o sofrimento causado pelos procedimentos experimentais;
- possuir equipe técnica devidamente treinada e capacitada;
- ter médico veterinário responsável pela saúde e bem-estar dos animais;
- apresentar seu projeto à Comissão de Ética no Uso de Animais pertinente antes de iniciar sua execução.

1.1 Definições: dor, distresse e sofrimento

Dor, distresse e sofrimento são termos que descrevem basicamente estados humanos de percepção e experiência. Portanto, é difícil transferir essas definições para animais utilizados em atividades de ensino e pesquisa. De maneira geral, as seguintes definições podem ser atribuídas:

- a dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão real ou potencial;
- o distresse é a incapacidade de superar uma experiência estressante levando a uma ruptura do bem-estar individual;
- o sofrimento é qualquer experiência cuja emoção ligada a ele é negativa. Geralmente está associada à dor e ao comprometimento do bem-estar.

O pessoal envolvido na utilização animal deve conhecer os conceitos de dor, distresse e sofrimento e saber como reconhecer, avaliar, controlar e, preferencialmente, prevenir essa experiência em seus animais. Não há um consenso sobre a definição desses termos, mas, para o propósito deste Guia, serão usadas as definições da Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos – DBCA.

1.2 Efeitos do bem-estar de um animal em resultados científicos

A elaboração de um bom desenho experimental é essencial para o sucesso de um estudo, além de também ser um desafio quando sistemas biológicos complexos, como os animais são utilizados. O ideal é usá-los em um estado fisiológico estável e definido, de forma que a resposta à variável pesquisada não seja perturbada por fatores indesejados. Em estudos com animais, a ausência do controle desses fatores pode levar à interpretação incorreta dos dados devido a possíveis interferências nos efeitos de um tratamento. Especial atenção deve ser dada à dor e ao distresse, devido à complexidade e amplitude das respostas fisiológicas e comportamentais associadas à presença desses fatores durante a coleta e interpretação de dados. A dor e o distresse devem ser sempre minimizados de acordo com o objetivo do estudo, para que sejam evitadas alterações fisiológicas e comportamentais associadas a esses fatores.

Além dos efeitos dos procedimentos da pesquisa no seu bem-estar, os animais podem também ser expostos a uma série de fatores ambientais que causam *stress*. Entretanto, quando esses efeitos são incidentais e não fazem parte do protocolo, os fatores que causam tais alterações devem ser eliminados ou controlados, de forma a não interferirem na coleta de dados e interpretação de resultados.

Claramente, no desenho e execução de protocolos, evitar efeitos indesejados ao bem-estar de animais envolve muito mais que a seleção de agentes anestésicos ou analgésicos adequados ou o fornecimento apropriado de água, comida, temperatura, umidade ou luz. A boa prática científica tem total interesse na preservação do bem-estar dos animais utilizados e na identificação, controle e, sempre que possível, na eliminação dos fatores que possam causar respostas fisiológicas ou comportamentais associadas com estresse ou dor. Quando o estresse (ou os fatores estressantes) ou a dor fazem parte de um procedimento de pesquisa, estratégias para minimizar ou controlar esses efeitos são componentes essenciais do desenho experimental.

Se o bem-estar de um animal for comprometido, as consequências podem incluir:

- aumento da variabilidade nos dados;
- necessidade de um maior número de animais;
- dificuldade na reprodutibilidade dos resultados;
- ausência de dados;
- credibilidade reduzida dos resultados;
- resultados que não podem ser aplicados a outras situações;
- resultados impublicáveis;
- comprometimento na universalidade experimental;
- uso desnecessário de vidas.

Qualquer resposta a um fator estressor que resulte em alterações nas medidas fisiológicas e comportamentais, por mais breve que seja, pode influenciar a confiabilidade, reprodutibilidade e interpretação dos dados.

II. MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS

O uso de animais nas Ciências da Vida remonta à Grécia antiga e aos primeiros experimentos médicos. Durante séculos, médicos e pesquisadores utilizaram animais para melhorar seus conhecimentos sobre a forma como os vários órgãos e sistemas do corpo humano funcionavam, bem como para aprimorar suas habilidades cirúrgicas.

A ascensão da ciência biomédica moderna no século XIX causou um aumento no número de animais utilizados em experiências, bem como na resistência à vivisseção. A publicação do livro “*Principles of Human Experimental Technique*” pelos pesquisadores William Russel e Rex Burch em 1959 iniciou o movimento de proteção aos animais usados em pesquisa e representou um marco na discussão sobre a utilização de animais para a avaliação de toxicidade. A partir desse movimento, o princípio dos 3Rs (*Reduction, Refinement e Replacement*) para o uso de animais foi estabelecido: a redução reflete a obtenção de nível equiparável de informação com o uso de menos animais; o refinamento promove o alívio ou a minimização da dor, sofrimento ou estresse do animal; a substituição estabelece que um determinado objetivo seja alcançado sem o uso de animais vertebrados vivos. De fato, métodos alternativos podem ser definidos como qualquer método que possa ser usado para substituir, reduzir ou refinar o uso de animais na pesquisa biomédica, ensaios ou ensino.

Em 1969, a criação, no Reino Unido, do *Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments (FRAME)*, órgão para promover junto na comunidade científica o conceito e o desenvolvimento de métodos alternativos, foi a primeira ação em favor do princípio dos 3Rs.

Nos anos posteriores, o avanço da ciência evidenciou as diferenças metabólicas e de respostas que controlam a homeostasia tecidual entre animais não humanos e humanos. A necessidade de modelos *in vitro* mais apropriados tornou-se ainda mais evidente, iniciando-se, então, uma nova fase de abordagem toxicológica. Nas décadas seguintes os pesquisadores e defensores do bem-estar animal se uniram em torno de um objetivo comum: encontrar alternativas cientificamente validadas para os testes feitos em animais.

A política declarada das instituições europeias, desde a implantação do “*Animal welfare guideline*” em 1986 por meio da Diretiva 86/609/EC, é de estimular e desenvolver o uso de métodos alternativos ao uso de animais. Nela fica estabelecido que “uma experiência não poderá ser executada em animal se outro método cientificamente satisfatório, que não implique na utilização de um animal, seja razoável e praticamente possível”. Vários esforços foram e têm sido efetuados para a busca de alternativas, com a criação de centros dedicados ao desenvolvimento e validação de métodos alternativos.

Em 1989 foi criado, na Alemanha, o *Zentralstelle zur ErfassungBewertung von Ersatz und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch – National Centre for Documentation and Evaluation of Alternative Methods to Animal Experiments (ZEBET)*. Em 1991 foi criado o *European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)* a partir da Diretiva 86/609/EC com objetivo de desenvolver e coordenar a validação de métodos alternativos ao uso de animais na Comunidade Europeia.

Em 1997 as agências governamentais dos Estados Unidos formaram o *Interagency Coordinating Center for the Validation of Alternative Methods (ICCVAM)*. O ICCVAM é composto por 15 agências regulatórias e de pesquisa, entre as quais se incluem a *Environmental Protection Agency (EPA)*, a *Food and Drug Administration (FDA)* e a *Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR)*, sendo que estas fornecem ou utilizam informações

dos testes toxicológicos para o processo de avaliação do risco. O Comitê coordena, por meio das agências, a discussão relativa ao desenvolvimento, validação, aceitação e harmonização nacional e internacional dos ensaios toxicológicos, por intermédio do governo federal dos Estados Unidos.

Da mesma forma, outros países estabeleceram centros de validação: em 2005, o governo japonês criou o *Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM)* e em 2012 foi estabelecido o Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM), fruto da cooperação entre o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (DOU, Seção 3, n. 13, p. 122, 18/01/2012).

Em 2003 a sétima emenda (2003/15/EC) da Diretriz de cosméticos (76/768/EEC) proibiu, nos países-membros da União Europeia, o teste de ingredientes de cosméticos, do produto final acabado em animais (*testing ban*) e proibiu a comercialização de produtos cosméticos acabados (ou seus ingredientes) que tenham sido testados em animais (*market ban*). O *testing ban* e o *market ban* estão em vigor desde 2009 e 2013, respectivamente.

De forma similar, a regulamentação de químicos (*Reach*) da Comissão Europeia, em vigor desde 2007, evita os testes em animais e prefere os testes alternativos *in vitro*. O propósito do *Reach* é registro, avaliação e autorização de químicos para sistematicamente avaliar os riscos para a saúde humana e ambiental de mais de 30.000 substâncias químicas que são produzidas ou importadas para a Comunidade Europeia em um volume de mais de uma tonelada por ano. No sentido de minimizar e racionalizar o uso de animais para estudos de toxicologia, o planejamento deve incluir a busca de informações relacionadas à molécula (pKa, pH, estrutura química, caracterização, etc.) que poderá determinar a indicação de vias de administração ou de exposição por meio de cálculos, eliminando a possibilidade de procedimentos desnecessários. Importante e relevante destaque vem sendo dado às análises *in silico* para identificação preliminar de moléculas não interessantes e evitar testes *in vivo* desnecessários.

Diante desse panorama regulatório, a União Europeia, com o intuito de aumentar o desenvolvimento de métodos alternativos, adotou a Diretiva 2010/63/EU que estabelece o ECVAM como laboratório de referência no âmbito da União, sendo este agora denominado *European Union Reference Laboratory ECVAM (UERL ECVAM)*, responsável por coordenar e promover o desenvolvimento de métodos alternativos. A partir também dessa Diretiva de 2010, os estados-membros foram convocados a contribuir para essa atividade crucial identificando e indicando laboratórios nacionais qualificados, garantindo a promoção de métodos alternativos no nível nacional.

A Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) – organização intergovernamental constituída de 34 países da América do Norte, Europa e Pacífico com objetivo de coordenar e harmonizar suas políticas, debater assuntos de interesses econômicos, sociais e ambientais, e colaborar para fazer frente aos problemas internacionais – desempenha um papel fundamental na harmonização dos métodos para classificação de substâncias químicas. As diretrizes de ensaios da OCDE são uma coleção de métodos de ensaio, internacionalmente aceitos, que são utilizados por laboratórios independentes, governos e indústrias para determinar a segurança dos produtos químicos e preparações químicas, incluindo agrotóxicos e produtos químicos industriais. Eles cobrem os testes para as propriedades físico-químicas de produtos químicos (seção 1), os efeitos ambientais (seção 2), degradação e acúmulo no meio ambiente (seção 3), efeitos na saúde humana (seção 4) e outras áreas (seção 5). De especial interesse, é na seção 4 que os métodos alternativos ao uso de animais são publicados (<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>).

No Brasil, a responsabilidade de monitorar e avaliar a introdução de técnicas alternativas que substituam a utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa é do Concea. Essa entidade é responsável por credenciar as instituições que utilizem animais em seus trabalhos, além de criar as normas brasileiras de produção e uso de animais. Em 2014 a Resolução Normativa nº 17 do Concea estabeleceu o processo de reconhecimento de métodos alternativos no Brasil e determinou o prazo para a substituição do uso de animais por métodos alternativos reconhecidos.

De forma complementar às leis nacionais, o Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) estabeleceu, por meio da Portaria nº 491 de 03 de julho de 2012, a Rede Nacional de Métodos Alternativos (Renama, <http://renama.org.br/>), que tem por objetivo:

- estimular a implantação de ensaios alternativos ao uso de animais por meio do auxílio e do treinamento técnico nas metodologias necessárias;
- monitorar periodicamente o desempenho dos laboratórios associados por meio de comparações inter-laboratoriais;
- promover a qualidade dos ensaios mediante o desenvolvimento de materiais de referência, químicos e biológicos certificados, quando aplicável;
- incentivar a implementação do sistema de qualidade laboratorial e dos princípios das boas práticas de laboratório (BPL);
- contribuir para o desenvolvimento, a validação e a certificação de novos métodos alternativos ao uso de animais.

A Renama disponibilizará, por meio de uma rede de laboratórios associados, os métodos alternativos ao uso de animais validados e disponíveis na OCDE, observando os princípios de boas práticas de laboratório. Dessa forma, a Renama contribuirá para a garantia da qualidade dos serviços ofertados ao setor produtivo e para o aumento, natural, da sua competitividade internacional, uma vez que os métodos alternativos ao uso de animais representam muitas vezes barreiras técnicas à exportação (legislações europeias anteriormente comentadas).

Há um amplo escopo para a aplicação dos 3Rs (Substituição, Redução e Refinamento) no uso de animais em estudos toxicológicos. Cada vez mais, alternativas validadas à utilização de animais sencientes são utilizadas em testes de toxicidade e, nesse sentido, a validação de um método é definida como um processo pelo qual a confiabilidade e relevância de um procedimento são estabelecidas para um fim específico. Todavia, nas situações em que a finalidade é regulatória, deverão ser usados os delineamentos propostos nos guias internacionalmente aceitos para esse fim, uma vez que só estão disponibilizados aqueles que se consideram validados.

III. PLANEJAMENTO DE NOVOS PROJETOS

Esta seção fornece informações para auxiliar pesquisadores e docentes a decidirem se experimentos com animais são necessários para atingir os objetivos propostos. Quando o uso dos animais é justificado, existem informações para todas as etapas da condução da pesquisa ou atividade didática que os envolva. Entre elas destacam-se: a

escolha correta do animal, sua origem, a forma de seu transporte e o tipo de abrigo, alimentação e ambiente; o planejamento do experimento ou atividade didática; a previsão e minimização da dor e das repercussões negativas para a saúde do animal; o treinamento de pessoal e a publicação dos dados.

Pesquisadores e docentes são responsáveis ética e legalmente por garantir que os princípios dos 3Rs sejam utilizados em seus projetos de pesquisa ou atividades didáticas. Antes de desenvolver um projeto de pesquisa que empregue animais, o pesquisador deverá considerar:

- se o uso de animais proposto é justificado;
- o “estado da arte” (avaliar se projetos similares já foram realizados);
- se os objetivos do projeto podem ser alcançados por meio de métodos alternativos, tais como cultura de tecidos, modelos matemáticos, métodos *in silico*, etc.

Os pesquisadores e os docentes devem avaliar se os benefícios potenciais do conhecimento científico gerado se sobrepõem às consequências negativas decorrentes da manipulação do animal. As informações contidas nesta seção devem ser consideradas pelos pesquisadores e pelos docentes antes de submeterem uma proposta de uso de animais à Comissão de Ética no Uso de Animais (Ceua) pertinente. Os projetos devem considerar o menor número possível de animais (ou quantidade de tecido animal) que conduza ao máximo de informações cientificamente válidas e os métodos utilizados na manipulação devem minimizar o impacto negativo sobre os animais.

A colaboração entre pesquisadores (intra e interinstitucional) concorre para reduzir o número de animais ou para a quantidade de tecido animal necessária para conduzir um estudo ou responder a uma questão específica do projeto de pesquisa. Os pesquisadores podem também colaborar para o refinamento de metodologias, confeccionando, por exemplo, procedimentos operacionais padrão que visem ao incremento do bem-estar animal e manutenção dos padrões éticos em pesquisa.

Para projetos a serem conduzidos em mais de uma instituição, a Ceua de cada uma desta deverá analisar, aprovar e monitorar o componente do projeto a ser realizado em instalações sob sua responsabilidade.

Atividades científicas envolvendo animais devem resultar de um esforço colaborativo entre pesquisadores, especialistas em cuidado animal, equipe técnica, professores e alunos. Para esse fim, todos os que trabalham com animais em atividades de ensino ou pesquisa devem ter treinamento e suporte adequados e, dessa forma, cuidar e utilizar animais em obediência ao CONCEA.

Isso garantirá que:

- a dor e o desconforto nos animais serão mínimos;
- todo o pessoal envolvido possua o conhecimento e as habilidades necessárias ao uso de animais;
- a segurança pessoal daqueles que realizarão o estudo será mantida durante o manuseio do animal;
- os melhores resultados científicos serão atingidos.

O fornecimento de treinamento apropriado (específico de um determinado procedimento e espécie específica) antes do início de um projeto é responsabilidade da instituição. O treinamento deverá ser fornecido conforme a necessidade e deve incluir aspectos técnicos e éticos em relação ao monitoramento dos animais. Além disso, as instituições de pesquisa deverão garantir que haja pessoas suficientes e com as habilidades apropriadas para os cuidados dos animais.

3.1 Modelos Animais

Os seres vivos compartilham propriedades e características. A ideia de “estudar características comuns entre as espécies a fim de compreender a função das espécies” advém, no mínimo, da época da obra “*Historia Animalium*”, de Aristóteles, e sustenta o valor da medicina comparativa.

Descobertas fundamentais acerca da fisiologia e da fisiopatologia advieram de estudos comparativos utilizando animais. Nesse contexto, esses organismos constituem-se em modelos ou substitutos para estudos sobre os humanos ou outros animais.

Modelos animais podem ser utilizados para investigar a fisiologia celular, tecidual de estruturas e órgãos e permitem avaliar a integração de órgãos e sistemas com o organismo ou em uma estrutura similar. Ofertam a possibilidade de compreender mecanismos subjacentes a doenças.

Na medida em que o conceito de modelo animal se aplica a toda utilização de animais para fins científicos, então, de forma geral, os mesmos critérios devem ser aplicados para a seleção e validação de um modelo animal específico. Inicialmente, os pesquisadores devem definir os objetivos do projeto e determinar qual o nível do sistema biológico que é relevante para a sua condução. Por exemplo, seus estudos envolverão um tipo específico de célula, tecido, órgão ou a interação de órgãos? Tendo a percepção de qual é o sistema biológico envolvido, o pesquisador poderá, então, decidir a melhor espécie ou linhagem animal que representa mais adequadamente o sistema biológico a ser investigado. A opção por um determinado modelo animal deve ter consistência científica e não ser influenciada por conveniência ou orçamento.

3.1.1 Escolhendo o animal adequado

A correta escolha do modelo animal é fundamental para o sucesso de um projeto de pesquisa. Além disso, há de se considerar a variabilidade biológica que pode interferir na qualidade dos resultados ou no rigor do procedimento experimental em detectar efeitos de tratamentos. Com isso, a geração de dados cientificamente não válidos pode acarretar no aumento do número de animais necessários para manter um nível adequado de precisão. Por outro lado, a própria variabilidade biológica pode ser relevante para a pesquisa. Por causa disso, as razões para a escolha de uma determinada espécie devem estar claramente justificadas na proposta (ver Seção 4.4.1 da DBCA para informações sobre a seleção de animais apropriados).

Questões que devem ser consideradas na decisão do animal adequado:

- **Espécie:** garantir que a espécie seja a mais apropriada para o protocolo de pesquisa proposto.
- **Raça, linhagem e variabilidade genética:** existe variação biológica entre as raças das espécies animais. A variabilidade pode ser reduzida escolhendo apropriadamente o modelo animal.

- o A variabilidade genética pode reduzir a precisão dos resultados e dessa forma levar ao aumento no número de animais necessários. Outros aspectos importantes são a definição genética de espécies híbridas que é de difícil controle e a dificuldade na determinação da equivalência de colônias distintas de animais.
- o Linhagens isogênicas possuem um fenótipo mais uniforme do que heterogênicas, permitindo a melhor detecção de respostas ao tratamento, reduzindo o número de animais necessários.
- **Estado sanitário:** ter controle e conhecimento sobre o estado de saúde dos animais permite melhor compreensão dos efeitos e consequências específicas da manipulação. O fornecedor deve dar atestados sanitários que esclareçam ao pesquisador quanto ao estado sanitário dos animais com os quais ele irá trabalhar.
- **Comportamento:** garantir que o animal escolhido tenha comportamento adequado ao ambiente onde o estudo será desenvolvido. Os pesquisadores devem, sempre que possível, selecionar espécies domesticadas e animais habituados ou acostumados a humanos e ambientes antropizados.

3.1.2 Origem dos animais

A maior parte dos animais utilizados em atividades de ensino ou pesquisa é produzida especificamente para esse fim, principalmente os roedores. Por essa razão os animais de cativeiro, ao contrário de animais capturados em estado selvagem, devem ser prioritariamente utilizados. A aquisição de animais para utilização nos projetos de pesquisa ou procedimentos de ensino, quando houver no Brasil a produção da espécie/linhagem de escolha, só pode ser feita de instituições credenciadas no Concea. Nos casos da aquisição por meio de fornecedores eventuais, garantir que os animais a serem utilizados tenham qualidade condizente com os objetivos do estudo é responsabilidade do pesquisador principal e da Ceua de sua instituição.

É imprescindível que os pesquisadores definam a origem dos animais a serem utilizados nos projetos encaminhados às Ceuas.

3.1.3 Transporte dos animais

O transporte de animais é crítico devido aos vários riscos a que estão sujeitos. Problemas diferentes podem surgir, seja no transporte externo (de um estabelecimento para outro), seja no transporte interno (dentro das unidades, entre barreiras, diferentes salas). Os pesquisadores e docentes devem estar cientes das regulamentações específicas para o transporte de animais. A troca de informações claras entre a pessoa que despacha os animais e a que os recebe é vital para minimizar o tempo de permanência dos animais em trânsito. Atenção especial deve ser dada ao transporte de animais geneticamente modificados, que deve atender às exigências da Comissão Interna de Biossegurança e, quando necessário, da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança.

Alguns fatores que podem causar estresse aos animais são: o barulho excessivo, movimento das gaiolas de transporte e ambiente e pessoal estranhos. A extensão do estresse em um animal depende de sua espécie, sexo, idade, saúde, estágio de prenhez, número de animais viajando juntos e relações sociais. O desconforto dos animais é afetado pela duração e condição do ambiente durante o transporte e pela qualidade do cuidado dispensado ao longo da viagem.

As condições e agendamento de transporte devem ser planejados para levar em consideração extremos climáticos, necessidades específicas da espécie e contingências.

Para minimizar o desconforto durante o transporte, os pesquisadores e docentes devem:

- utilizar contêineres seguros, confortáveis e à prova de fuga;
- fornecer alimento e água adequados sempre que possível;
- garantir que todo o pessoal responsável pelo manuseio e transporte tenha capacitação para reconhecer sinais de desconforto e dor e que seja capaz de atuar para mitigar;
- assegurar que o tempo de transporte seja o mínimo possível.

3.1.4 Aclimação e quarentena

Animais são extremamente sensíveis ao novo, seja o ambiente ou alterações deste, outros animais ou pessoas e esses fatores devem ser sempre considerados. Introduzir animais em um novo local, com as respectivas mudanças em sua condição de vida e de grupos sociais, produz uma resposta estressante que, embora possa ser temporária, pode levar ao distresse. Portanto, é necessário que os animais passem por um período de aclimação antes que sejam utilizados em atividades de ensino ou pesquisa. Quanto à extensão desse período, depende da espécie animal e, portanto, devem ser observadas todas as suas exigências.

Durante o período de aclimação, os animais devem ser habituados ao manuseio e à presença das pessoas que trabalharão com eles. No caso de pesquisadores, esse período é importante para que se familiarizem com o comportamento normal dos animais. Indivíduos que não se aclimataram não deverão ser utilizados na pesquisa.

As áreas designadas para quarentena devem ser observadas com mais frequência, e todas as observações devem ser registradas para que problemas possam ser identificados e medidas possam ser tomadas para saná-los. O tempo de duração da quarentena deverá ser apropriado para que seja assegurada a saúde dos animais que ali estão e os seus congêneres já alojados na instalação.

3.1.5 Alojamento e manejo

As condições ambientais afetam a biologia e a qualidade de vida dos animais. Para reduzir a variação nas respostas decorrentes do ambiente, os animais devem ser mantidos em local seguro, apropriado e controlado.

Os alojamentos dos animais devem ser projetados, mantidos e manejados para atender às exigências da espécie. Necessidades comportamentais de cada espécie, incluindo a disponibilidade de espaço para permitir a livre movimentação e atividade, sono, privacidade, contato com outros da mesma espécie, enriquecimento ambiental, entre outras, devem ser levadas em consideração. Os pesquisadores devem tomar precauções para prevenir o acesso de pessoas não autorizadas, bem como ter planos de contingenciamento no caso de emergências, como falhas na ventilação, iluminação, aquecimento, refrigeração ou escape de indivíduos.

Se um animal apresentar um estado sanitário ou genético diferente de outros da mesma instalação, pode ser necessária a indicação de um local específico para ele. Exigências podem também ser direcionadas pelo estado reprodutivo do animal, necessidades da pesquisa ou experiência anterior.

Necessidades ambientais específicas para uma espécie, tais como iluminação, temperatura, qualidade do ar, ciclos apropriados de luz e proteção contra ruídos excessivos e vibrações, deverão ser atendidas. O acesso rápido ao alimento e à água e o fornecimento regular de acomodações limpas e livres de parasitas e patógenos também precisam ser considerados.

Animais possuem necessidades específicas de nutrientes nos diferentes estágios de suas vidas. Ao fornecerem dietas balanceadas e reconhecidas internacionalmente aos animais, os pesquisadores reduzem a variação dentro e entre estudos e assim evitam a necessidade de duplicação de experimentos, reduzem o número de animais necessários e melhoram a qualidade de sua pesquisa.

A qualidade da dieta também pode ser afetada pelas condições de armazenamento dos alimentos e pela frequência de fornecimento.

3.2 Biossegurança

A biossegurança deve ser entendida como elemento de grande importância e deve integrar-se rotineiramente em qualquer atividade de ensino ou pesquisa envolvendo animais, principalmente naqueles laboratórios onde os perigos (sejam químicos, físicos ou biológicos) sejam maiores. A biossegurança é o conjunto de ações voltadas para a prevenção, minimização ou eliminação de riscos inerentes às atividades de pesquisa, produção, ensino, desenvolvimento tecnológico e prestação de serviços, visando à saúde do homem, dos animais, do meio ambiente e à qualidade dos resultados. Biossegurança como condição de segurança deve ser alcançada por meio de um conjunto de ações destinadas a prevenir, controlar, reduzir ou eliminar riscos inerentes às atividades realizadas (DIRETRIZES GERAIS PARA O TRABALHO EM CONTENÇÃO COM AGENTES BIOLÓGICOS, 2010).

Os manuais de biossegurança tradicionalmente enfatizam o uso de boas práticas de laboratório (BPL), no sentido de *práticas laboratoriais seguras* (não confundir com a BPL relacionada à gestão da qualidade no laboratório), a utilização apropriada dos equipamentos de proteção, instalações bem planejadas e construídas e procedimentos que visam minimizar riscos de infecção ou acidentes involuntários para trabalhadores do laboratório, além de impedir a contaminação do ambiente externo.

No Brasil, a legislação vigente trata exclusivamente da biossegurança com organismo geneticamente modificado (OGM), entretanto, existem regras de atuação profissional para organismos comuns ou não geneticamente modificados. Deve-se obedecer às condições estabelecidas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), que atualmente define organismo como: toda entidade biológica capaz de reproduzir ou transferir material genético, inclusive vírus e outras classes que venham a ser conhecidas (Resolução Normativa Nº 2, de 27 de novembro de 2006). Por outro lado, os setores que manipulam OGMs ficam, também, obrigados por lei a requisitarem o Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) à CTNBio, conforme a Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005, além de atenderem rigorosamente às RN emanadas da CTNBio na sua área de atuação, sem o quê estarão trabalhando à margem da Lei. De grande relevância é a conscientização de que a espinha dorsal da prática da biossegurança são a avaliação de risco e as autoinspeções periódicas de biossegurança. Apesar das ferramentas disponíveis para ajudar nessa avaliação, o componente mais importante é o julgamento profissional. Portanto, tais avaliações devem ser executadas pelos indivíduos com experiência e conhecimento das características específicas dos organismos que são considerados para

uso. O domínio dos equipamentos laboratoriais, dos modelos animais e dos equipamentos de contenção que podem ser utilizados, bem como das instalações disponíveis, é fundamental.

3.2.1 Biossegurança em instalações animais

A biossegurança em instalações animais assume dimensão diferenciada de outras atividades uma vez que a presença dos animais agrava o risco biológico. A flora microbiana e parasitária, a produção de alérgenos e a agressão animal são capazes de causar danos à saúde ou à vida dos profissionais envolvidos nessa atividade. A produção constante de proteínas eliminadas pela urina, secreções e descamação da pele – que são encontradas em suspensão no ar ou depositadas nos materiais e equipamentos – tornam as instalações animais ambientes propícios para o desenvolvimento de reações alérgicas nos expostos. Fora isso, agressões animais podem causar ferimentos e determinar infecções. As instalações animais onde se realizam infecções experimentais assumem papel de maior importância tendo em vista os riscos potenciais e efetivos das atividades com agentes patogênicos de diferentes classes de risco. Os riscos específicos ficam, portanto, na dependência das espécies animais envolvidas e da natureza da atividade de ensino ou pesquisa realizada.

Quanto às medidas específicas de segurança com agentes perigosos, deve ser dada especial atenção aos procedimentos sobre cuidados e alojamento dos animais; armazenamento de agentes de risco e prevenção contra perigos causados por esses agentes; dosagem e administração de medicamentos; manuseio de tecidos e fluidos corporais; eliminação de excretas, cadáveres ou carcaças; e proteção pessoal. Exige-se o emprego de equipamento de segurança específico, bem como um manejo adequado, além de práticas laboratoriais seguras. Em suma, para uma segurança eficaz, é necessário pessoal treinado e que siga rigorosamente as normas de proteção contra riscos. Claro é que os indivíduos que lidam com animais em atividades de ensino ou pesquisa, em locais onde agentes infecciosos são utilizados, são expostos a riscos maiores de exposição devido à possibilidade de transmissão por mordidas, arranhões ou aerossóis. Todos os presentes nessas instalações devem utilizar (técnicos envolvidos diretamente no trabalho ou qualquer um presente nas instalações) equipamentos de proteção individual – EPI. Todas as instalações devem ser adequadas e credenciadas pelo órgão competente, quando for o caso. Logo, um programa eficiente de **saúde, biossegurança e ambiente** deve concentrar seus esforços para que os riscos inerentes ao uso de animais sejam reduzidos a níveis aceitáveis. Portanto, cada instalação animal deverá desenvolver ou adotar um manual de biossegurança ou de operações que identifique os riscos e que especifique as práticas e procedimentos para minimizar ou eliminar as exposições aos perigos.

3.3 Desenho da pesquisa científica

A pesquisa científica deve ser bem planejada e contar com um planejamento adequado (desenho da pesquisa).

O desenho deve estar associado a uma análise estatística de tal forma que se aproxime do menor número de animais necessários à obtenção de resultados válidos, evitando, por conseguinte, o uso em excesso ou insuficiente de modelos. Desenhos mal elaborados produzem resultados inconclusivos, conduzem à repetição do estudo e ao aumento no número de animais.

Os pesquisadores e as Ceuas devem garantir que os objetivos e as hipóteses estejam plenamente considerados e completos antes do início de qualquer atividade envolvendo animais.

3.3.1 Análise estatística¹

1 O Centro Nacional para a Substituição, Refinamento e Redução de Animais para Pesquisa (NC3Rs) é uma organização do Reino Unido que lidera a descoberta e a aplicação de novas tecnologias e estratégias para substituir, reduzir ou refinar o uso de animais para fins científicos (3Rs). Entre suas atividades, o NC3Rs desenvolveu um roteiro para auxiliar o delineamento experimental e análise estatística. A versão original e em inglês desse roteiro pode ser encontrada no seguinte endereço eletrônico: <http://www.nc3rs.org.uk/>.

Como ressaltado anteriormente, desenhos envolvendo animais devem garantir que resultados sejam estatisticamente válidos e obtidos com o menor número possível de indivíduos. Os pesquisadores devem, sempre que possível, buscar orientação do bioestatístico de sua instituição para a elaboração do projeto a fim de que saibam, antecipadamente, como os dados serão analisados.

Outro ponto que deve ser considerado ao desenhar uma pesquisa é o tamanho da amostra. Uma amostragem muito pequena não permitirá que o efeito estudado seja detectado com algum grau de confiabilidade. Entretanto, uma amostragem muito grande leva a um uso desnecessário de animais.

Pesquisas bem concebidas e analisadas corretamente podem levar a uma redução no uso de animais e aumentar a validade científica dos resultados. Uma pesquisa bem concebida deve ser:

IMPARCIAL

Quando dois ou mais grupos são comparados, os animais nos grupos devem estar em ambientes idênticos e serem semelhantes em todos os sentidos exceto pelos tratamentos aplicados. O viés pode ser minimizado por:

- alocação aleatória dos animais aos diferentes grupos (um processo físico é necessário, por exemplo, jogar uma moeda, a escolha de um número);
- assegurar que todos os procedimentos subsequentes (incluindo alojamento) sejam aplicados em uma ordem aleatória;
- garantir que os investigadores que analisam os resultados não tenham conhecimento do tratamento recebido (duplo-cego) até a análise estatística final.

PODER DE ANÁLISE ADEQUADO (ou seja, uso de animais suficientes)

Pesquisas robustas são aquelas que têm a oportunidade máxima de detectar um efeito verdadeiro do que se estuda. O poder de análise (robustez) é obtido por:

- Uso de um número adequado de animais (tamanho da amostra);
- Controle da variação intersujeito (por exemplo, usando a randomização).

O **tamanho da amostra** deve ser determinado utilizando um método formal, tal como poder de análise ou usando o método da equação de recursos (ver abaixo). Embora o poder de análise seja ampliado pelo aumento do tamanho da amostra, uma pesquisa desnecessariamente grande envolverá animais em excesso e desperdiçará recursos científicos.

Variação é controlada por meio da atribuição aleatória de animais de genótipos similares, de peso e idade similares, que tiveram um ambiente semelhante ao longo de suas vidas. Variação devido a ritmos circadianos ou flutuações no ambiente muitas vezes podem ser reduzidas em delineamento adequado, por meio de uso de bloco randomizado ou estudos do tipo quadrados latinos (*Latin Squares*).

O **erro de medição** deve ser minimizado por técnica cuidadosa e boa instrumentação, mantendo o pesquisador “às cegas” quanto à alocação de tratamento.

Análise do Poder: um método de análise do poder para comparar dois grupos, por exemplo, requer as seguintes informações:

- tipo de teste estatístico a ser utilizado (por exemplo, um teste t ou o teste do qui-quadrado para comparar duas proporções);
- nível de significância para ser utilizado (com frequência um nível de 5%);
- poder estatístico exigido (geralmente 80%-90%);
- lateralidade do teste (um teste de 2 lados é usual);
- tamanho do efeito de interesse biológico (ou seja, quanto de uma diferença no efeito biológico ou clínico é necessário detectar);
- estimativa do desvio padrão (quando se comparam as médias, deve vir de um estudo anterior).

O site StatPages.org oferece cálculos *on-line* de tamanho da amostra combinando os fatores acima.

A equação de recursos: $E = N$ (número de animais por tratamento x número de tratamentos) - T (número de tratamentos), onde N = o número total de sujeitos (por exemplo, animais individuais ou grupos / gaiolas de animais) e T = número de combinações de tratamento, E (o tamanho da amostra) deve ser de aproximadamente entre 10 e 20.

Por exemplo, uma pesquisa comparando quatro tratamentos, utilizando seis indivíduos por tratamento, terá $N = 24$ (6×4) e $T = 4$, então $E = 24 - 4 = 20$. Isso está dentro da faixa aceitável. No entanto, pode haver boas razões para ir acima desse limite superior. Se E for 30 ou 40, a pesquisa pode ser muito grande, possivelmente desperdiçando recursos. Essa equação é mais adequada para pequenas, não rotineiras e mais complexas experiências usando animais que provavelmente serão analisadas pelo método estatístico de variância (ANOVA).

TENHA UMA AMPLA FAIXA DE APLICABILIDADE

Muitas vezes é útil saber se resultados semelhantes são obtidos em machos e fêmeas, em diferentes linhagens, ou como resultado de dietas ou ambientes diferentes. Do mesmo modo, a resposta a um fármaco pode depender de um tratamento prévio, do efeito de outras drogas, ou da via de administração. Esses efeitos podem ser estudados de forma eficiente utilizando desenhos fatoriais.

Desenhos fatoriais: podem ser usados para investigar o efeito de uma droga tanto em machos quanto em fêmeas sem fazer duas experiências separadas ou utilizando o dobro de animais. Simplesmente, em cada um dos dois grupos a metade dos sujeitos são fêmeas e a outra metade machos. Um estudo fatorial com poder adequado mostrará se os dois sexos responderam da mesma forma, o que não é possível se os dois sexos forem usados em pesquisas diferentes.

SEJA SIMPLES E EFICIENTE

Pesquisas não devem ser complicadas a ponto de erros serem cometidos em sua execução, ou a análise estatística tornar-se excessivamente complicada. Estudos-piloto pequenos devem ser utilizados antes de iniciar um grande estudo

para assegurar que ele é logisticamente eficiente e para dar alguma indicação preliminar de resultados prováveis. Todas as pesquisas devem ser pré-planejadas e não podem ser alteradas enquanto estiverem em andamento.

INDIQUE A FAIXA DE CERTEZA

Cada pesquisa deve ser analisada estatisticamente de modo que os resultados possam ser utilizados para o planejamento futuro. Uma análise estatística adequada deve indicar a faixa de incerteza nos resultados, ou a medida de variação, normalmente indicada por níveis de significância ou intervalos de confiança.

3.3.2 Métodos utilizados

Antes de iniciar uma pesquisa, também é importante certificar-se de que os métodos utilizados foram planejados para garantir o bem-estar dos animais, e que as variáveis não controladas, o modelo escolhido e as condições de alojamento foram levados em consideração. Fatores estressantes não ligados ao estudo podem causar uma grande variação e afetar a precisão dos resultados. Outras variáveis, tais como ritmos circadianos, erros de coleta dos dados e a qualidade e validade dos reagentes, precisam ser ponderadas.

3.3.3 Após a coleta de dados

As etapas finais do estudo (publicação dos resultados) também devem ser consideradas no planejamento do projeto. A metodologia, os dados e suas análises devem ser acessíveis a outros pesquisadores e dessa forma podem contribuir para a redução e refinamento do uso de animais por outros grupos de pesquisa. Essa informação deve ser apresentada de forma clara, precisa e com detalhes suficientes para permitir que ela seja entendida e replicada, incluindo:

- os objetivos e hipóteses da pesquisa;
- os animais utilizados (ex.: espécies, linhagens, fontes, tipos, estado sanitário);
- condições de transporte e a duração do período de aclimação antes do início;
- condições do alojamento do animal, da alimentação e da água;
- os métodos estatísticos utilizados para analisar os dados obtidos.

3.4 Prevenção da dor e do distresse potencial

Todo protocolo de pesquisa deve descrever claramente os pontos finais humanitários (“*endpoints*”) que serão utilizados. Esses pontos finais devem ser adequados para a espécie utilizada no estudo e o monitoramento das condições deve ser feito para cada animal envolvido. Idealmente os objetivos científicos do projeto de pesquisa devem ser atingidos sem afetar negativamente o bem-estar animal. Entretanto, muitas vezes não é possível atingir os objetivos nessa condição, assim deve se considerar: os requisitos científicos do projeto; efeitos negativos previstos e/ou esperados sobre o bem-estar dos animais; cinética provável e progressão dos efeitos adversos; indicadores preditivos precoces de efeitos adversos atuais ou iminentes.

As fases de um projeto que podem ter impacto negativo sobre a qualidade de vida dos animais não são limitadas aos protocolos da pesquisa. Outras fontes potenciais de dor, estresse e distresse podem ser consideradas, tais

como captura, transporte, manuseio, contenção, alojamento, ambiente social e físico e manipulação genética. A prevenção de dor e distresse requer conhecimento do comportamento normal da espécie em questão e do que pode ser esperado se o protocolo utilizado causar efeitos adversos.

3.4.1 Estudos-piloto (CN3Rs - <http://www.nc3rs.org.uk/conducting-pilot-study>)

Estudos-piloto podem ser utilizados para determinar os efeitos do protocolo de pesquisa no bem-estar dos animais. Eles são valiosos no planejamento e gerenciamento do projeto de pesquisa, pois ajudam a refinar e a reduzir o impacto adverso nos indivíduos, antes que pesquisas empregando um grande número de animais sejam realizadas.

Os estudos-piloto devem ser considerados como integrantes de um projeto ou protocolo como um todo, especialmente para permitir a avaliação da viabilidade do projeto ou protocolo e a potencial inserção ao princípio dos 3Rs. Os estudos-piloto devem ser avaliados pela Ceua de acordo com os critérios normais aplicados à aprovação de estudos plenos. Os resultados do estudo-piloto devem ser considerados quando da análise pela Ceua do projeto pleno.

Estudo-piloto, ou de viabilidade, é um pequeno estudo destinado a testar a logística e reunir informações antes de um estudo mais amplo, a fim de melhorar a qualidade e eficiência deste último. Ele pode revelar deficiências na concepção de um projeto de pesquisa ou protocolo, que poderão ser resolvidas antes que animais, tempo e recursos sejam utilizados em vão. Uma boa estratégia de pesquisa requer um planejamento cuidadoso e o estudo-piloto, muitas vezes, é uma parte dessa estratégia.

Um estudo-piloto é normalmente pequeno em comparação com a pesquisa principal e, portanto, pode fornecer apenas informações limitadas sobre as fontes e magnitude da variação das medidas. É improvável, por exemplo, que um estudo-piloto isoladamente possa fornecer os dados adequados sobre a variabilidade e o poder da análise que determina o número de animais a serem incluídos em um estudo bem desenhado. Uma revisão sistemática da literatura, ou mesmo uma única publicação, pode ser uma fonte mais adequada de informações sobre a variabilidade.

- ***Questões logísticas que podem ser reveladas por um estudo-piloto***

Um estudo-piloto pode identificar problemas logísticos. Como parte da estratégia de pesquisa os seguintes fatores podem ser resolvidos antes da pesquisa principal:

- verifique se as instruções dadas aos pesquisadores (por exemplo, procedimentos de randomização) são compreensíveis;
- verifique se os pesquisadores e técnicos estão suficientemente qualificados para a execução dos procedimentos;
- verifique o funcionamento dos equipamentos;
- verifique se o animal a ser incluído pode executar uma tarefa (física ou cognitiva);
- verifique a confiabilidade e validade dos resultados;
- detecte se alguma tarefa é muito difícil ou muito fácil, pois isso poderá enviesar ou distorcer resultados;

- avalie se o nível de intervenção é apropriado (por exemplo, a dose de uma droga);
- identifique os efeitos adversos (dor, sofrimento, angústia ou dano duradouro) causados pelo procedimento, bem como a eficácia das ações para mitigá-los (por exemplo, taxa de dose de analgesia e cronograma);
- defina antes os pontos finais humanitários.
- ***O que fazer com os dados / informações***

As informações obtidas sobre as questões logísticas devem ser incorporadas ao desenho da pesquisa principal. Como o objetivo de um estudo-piloto é avaliar a viabilidade de um estudo, é muito raro apresentar mais que um resumo dos dados estatísticos. Na verdade, os dados podem ser irrelevantes se problemas com os métodos forem descobertos.

Se um estudo-piloto não leva a modificações de métodos ou procedimentos, os resultados dele podem ser incorporados na pesquisa principal. A estratégia de amostragem utilizada para selecionar os animais e a possibilidade de mudanças ao longo do tempo devem ser cuidadosamente consideradas antes de incorporar dados do estudo-piloto. Mesmo que os dados do estudo-piloto não sejam utilizados desse modo e, mesmo que o desenho final seja muito diferente do piloto, é útil incluir informação sobre o estudo-piloto em quaisquer publicações ou relatórios provenientes da pesquisa principal, uma vez que pode contribuir para o desenho em estudos futuros.

Pode ser necessário levar a cabo um segundo estudo-piloto para avaliar a pesquisa principal ou, em alguns casos, o estudo principal pode ter que ser abandonado.

3.4.2 Testes toxicológicos

A toxicologia, segundo consenso entre as sociedades mundiais, é o estudo dos efeitos adversos de agentes químicos, físicos ou biológicos sobre organismos vivos e sobre o ecossistema, incluindo a prevenção e ou minimização desses efeitos.

Testes toxicológicos podem identificar potenciais efeitos adversos à saúde ou demonstrar a segurança de novas substâncias químicas e novos produtos, fornecendo assim a base para a salvaguarda da saúde de animais não humanos, humanos e do ambiente; esses testes são importantes para a análise de risco. Testes ecotoxicológicos podem ser exigidos pela legislação para caracterizar perigos e para avaliação de risco ambiental tanto pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) quanto pelos ministérios responsáveis pelo registro de novas moléculas para variados fins.

Autoridades reguladoras nacionais e internacionais necessitam equilibrar as preocupações entre o bem-estar animal e a necessidade de obter informações toxicológicas. A toxicologia é um campo cada vez mais harmonizado internacionalmente e considera uma vasta gama de organizações preocupadas com o desenvolvimento e validação de testes alternativos.

Para que os estudos de segurança e risco de novos produtos para o meio ambiente, animais não humanos e para os humanos sejam considerados por agências regulatórias, é necessário que guias nacionais e os internacionalmente aceitos sejam seguidos, bem como suas recomendações. Com relação às atividades de ensino ou de pesquisa,

recomenda-se que esses mesmos guias sejam seguidos sempre que possível, pois consideram os aspectos éticos, a redução do número de animais e o refinamento das técnicas.

METODOLOGIAS ADOTADAS PARA AVALIAÇÃO DO RISCO TOXICOLÓGICO

Vários protocolos internacionalmente aceitos estão disponíveis para uso em estudos toxicológicos baseados no conceito dos métodos alternativos (http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam - acessado em 14/08/2014) e alguns exemplos estão listados a seguir:

- **toxicidade aguda** – Estudo da toxicidade produzida por uma substância teste quando administrada uma ou mais vezes em um período que não exceda 24 horas;
- **toxicidade subaguda** – Estudo da toxicidade produzida por uma substância teste quando administrada diariamente durante período não superior a um mês; os protocolos internacionais usualmente abrangem período que pode variar entre 14 ou 28 dias;
- **toxicidade subcrônica** – Estudo da toxicidade em que a substância teste é administrada diariamente por, pelo menos, 90 dias;
- **toxicidade crônica** – Estudo da toxicidade em que a substância teste é administrada diariamente por pelo menos seis meses, com exigências variáveis para diferentes espécies e para as diferentes necessidades investigativas;
- **irritação** – Avaliação de risco irritativo induzido por substâncias, nos olhos, pele e mucosas;
- **carcinogenicidade** – Avaliação do potencial de uma substância para causar o aparecimento de neoplasias malignas. Esses estudos são de longa duração, prolongando-se por quase toda a vida do animal (roedores) e, diante dessa situação, recomenda-se que sejam desenvolvidos somente em instalações animais com condições sanitárias e estruturais capazes de manter a vida desses animais por longos períodos, sem interferências, a não ser aquelas previstas no protocolo aprovado pela Ceua da instituição. Existem substâncias carcinogênicas genotóxicas e outras não genotóxicas;
- **genotoxicidade** – Estudos que avaliam a habilidade de uma substância para induzir alterações no material genético (DNA, RNA, nucleotídeos, cromossomas). De acordo com o tipo de dano causado ao material genético, as substâncias são classificadas como: mutagênicas, clastogênicas ou aneugênicas;
- **reprodução** – Estudos que visam a determinação do potencial de uma substância para causar desenvolvimento anormal no período pré-natal, incluindo-se os estudos de uma ou duas gerações sequenciais. Sempre que possível deve-se optar pelos protocolos de uma geração com extensão de observações, no intuito de diminuir o número de animais incluídos nos estudos. A teratologia é uma das partes dos estudos da reprodução, que visa a determinação do potencial de uma substância para causar desenvolvimento pré-natal anormal, produzindo anomalias congênitas;
- **estudos ecotoxicológicos** – Avaliam o risco e a segurança de substâncias para o ecossistema.

PLANEJAMENTO DE PROTOCOLOS COM TESTES TOXICOLÓGICOS

Durante o planejamento de protocolos com testes toxicológicos é essencial observar as exigências regulatórias especificadas pelas autoridades nacionais e pelas internacionais e que estão descritas nos documentos regulatórios. Estas incluem os tipos de teste, espécies-alvo, via de administração e parâmetros estatísticos de forma a se obter o máximo de informações com o mínimo de envolvimento animal e resultados aplicáveis e seguros.

O racional para estudos que visam a determinação do risco e da segurança de novas moléculas inclui o seguinte: estudos de genotoxicidade, estudo da toxicidade aguda (em substituição ao cálculo da DL50, banido pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico em 2001), estudos de toxicidade em doses repetidas (duas espécies, uma roedora e uma não roedora), estudos de toxicidade para a reprodução e para novos fármacos, adicionalmente, estudos de segurança farmacológica específicos. Os protocolos para conhecimento do potencial irritativo ou corrosivo para olhos, pele e mucosas devem ter sua aplicabilidade avaliada caso a caso, uma vez que se o dano é presumido, tornam-se desnecessários para substâncias ou formulações nas quais propriedades químicas ou físicas sugerem que essa forma de toxicidade é provável, por exemplo, pH acima de 11,5 ou abaixo de 2.

Ainda no sentido de minimizar e racionalizar o uso de animais para estudos de toxicologia, o planejamento deve incluir a busca de informações relacionadas à molécula (pKa, pH, estrutura química, caracterização, etc.) que poderá determinar por meio de cálculos, por exemplo, a indicação de vias de administração ou de exposição, eliminando a possibilidade de procedimentos desnecessários.

3.4.3 Graus de Invasividade

A finalidade dos graus de invasividade é alertar os pesquisadores, as Ceuas e a todos os envolvidos com os cuidados dos animais sobre o risco de dor ou distresse a que os animais serão submetidos durante a execução dos protocolos.

Os graus de invasividade orientam os pesquisadores, médicos veterinários, técnicos e membros das Ceuas a darem atenção especial aos protocolos que poderão causar dor ou distresse aos animais.

Essa classificação é contida na DBCA (RN nº 12 do Concea) e se baseia em uma aproximação preventiva segundo o nível potencial de dor e distresse que os animais possam sentir.

Graus de Invasividade:

G1 = Experimentos que causam pouco ou nenhum desconforto ou estresse (*ex.: observação e exame físico; administração oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, ou intramuscular de substâncias que não causem reações adversas perceptíveis; coleta de sangue; eutanásia por métodos aprovados após anestesia ou sedação; privação alimentar ou hídrica por períodos equivalentes à privação na natureza*).

G2 = Experimentos que causam estresse, desconforto ou dor, de leve intensidade (*ex.: procedimentos cirúrgicos menores, como biópsias, sob anestesia; períodos breves de contenção e imobilidade em animais conscientes; privação alimentar ou hídrica breve, em períodos maiores do que a abstinência na natureza; exposição a níveis não letais de compostos químicos que não causem reações adversas graves*).

G3 = Experimentos que causam estresse, desconforto ou dor de intensidade intermediária (*ex.: procedimentos cirúrgicos invasivos conduzidos em animais anestesiados; imobilidade física por várias horas; indução de estresse por separação materna ou exposição a agressor; exposição a estímulos aversivos inescapáveis; exposição a choques localizados de intensidade leve; exposição a níveis de radiação e compostos químicos que provoquem prejuízo duradouro da função sensorial e motora; administração de agentes químicos por vias como a intracardíaca e intracerebral*).

G4 = Experimentos que causam dor de alta intensidade (*ex.: métodos não aprovados de eutanásia que provoquem dor; Indução de trauma ou queimaduras a animais não sedados; administração de agentes químicos paralisantes em animais não sedados, protocolos onde a morte é o ponto-final, quando os animais sofrerem dor ou distresse que não podem ser aliviados*).

Atenção especial deverá ser dada à criação de animais geneticamente modificados que sofrem dor ou distresse como consequência da alteração genética. Devemos, nesse caso, classificar corretamente o grau de invasividade para poder atender às necessidades de cuidados especiais desses animais.

3.5 Desenvolvimento de estratégias para avaliar, minimizar e monitorar dor ou distresse

Para cada projeto de pesquisa, o desenvolvimento de uma estratégia para avaliar, minimizar e monitorar a dor e o distresse requer decisões a respeito de:

- sinais clínicos ou observações a serem utilizadas para avaliar o bem-estar de um animal ou sua condição clínica durante o curso do projeto;
- sinais clínicos ou a combinação de sinais clínicos que indicarão que uma intervenção (incluindo eutanásia) é necessária;
- ações a serem tomadas se um problema for detectado;
- frequência de monitoramento;
- pessoal que conduzirá o monitoramento e seu treinamento;
- sistema para registro das observações.

Todos os aspectos de uso e manejo dos animais, incluindo a manipulação e alojamento, que possam impactar negativamente na qualidade de vida dos animais, bem como a estratégia para que esse impacto seja minimizado, devem estar descritos na proposta enviada à Ceua, que deverá avaliá-los cuidadosamente.

A complexidade da resposta de um animal a estressores torna difícil guiar-se por apenas uma simples medida como indicador de dor ou distresse. Além disso, devido ao fato de os animais não poderem comunicar suas experiências diretamente aos humanos, sua dor e distresse somente podem ser avaliados por observação de seu comportamento e fisiologia. O desafio é medir ou avaliar esses sinais e determinar quando uma resposta ao estresse se desenvolve a ponto de resultar em um efeito nocivo sobre o seu bem-estar e levá-lo ao distresse.

Para minimizar a dor e distresse, estratégias práticas deverão ser desenvolvidas possibilitando prever, monitorar e avaliar esses estados.

Elementos importantes de tais estratégias incluem:

- relevância de critérios para cada espécie de animal utilizada em um projeto de pesquisa;
- relevância de critérios para os tipos específicos de projetos de pesquisa realizados;
- documentação dos critérios a serem utilizados para o monitoramento do bem-estar dos animais;
- documentação dos critérios que indicam quando uma intervenção (incluindo eutanásia) ocorrerá;
- uma abordagem flexível capaz de lidar com as mudanças inevitáveis e eventos inesperados durante o curso de um projeto;
- boa comunicação, cooperação e respeito entre todas as partes, para garantir que os problemas sejam detectados e gerenciados rápida e efetivamente;
- uma vez identificadas todas as fontes potenciais de dor e distresse associadas a um projeto específico, os responsáveis pelo projeto devem determinar os sinais que indicarão se o bem-estar de um animal foi comprometido; os preditores mais significativos de uma piora na condição do animal; e o momento provável do início das alterações previstas.

Baseado nessas avaliações, uma estratégia de monitoramento deve ser desenvolvida para o estudo, incluindo descrição sobre os sinais relevantes, frequência de monitoramento, momento de intervenção e pontos-finais humanitários.

3.5.1 Avaliação do impacto de efeitos adversos sobre o bem-estar

Para que os efeitos adversos sobre o animal possam ser previstos e avaliados, é imprescindível que o observador esteja familiarizado com as características normais e anormais de cada uma das espécies utilizadas em seu estudo bem como seu comportamento.

A definição de “normal” para uma espécie animal pode variar de acordo com o alojamento ou condições do ambiente, a presença ou ausência de humanos e outros estímulos. Tal definição também pode variar entre linhagens ou raças dentro da mesma espécie, e mesmo entre indivíduos dentro de uma linhagem ou raça.

Durante o período de aclimação, os pesquisadores e tratadores de animais devem se familiarizar com a variação “normal” de comportamento de um animal específico ou grupo de animais. Avaliações por meio de marcadores fisiológicos, bioquímicos e neuroendocrinológicos também podem ser feitos durante esse período para estabelecer valores de referência.

3.5.2 Definição de sinais apropriados ou critérios de monitoramento

Os sinais ou observações clínicas a serem utilizados para avaliar a condição de um animal devem ser definidos. Eles geralmente incluem sinais de doença ou anormalidade e sinais específicos associados ao procedimento realizado.

Para que sinais clínicos apropriados possam ser selecionados, é imprescindível que os pesquisadores conheçam as características normais da espécie e linhagem que utilizará. Durante o período de aclimação, os pesquisadores devem se familiarizar com o comportamento normal de um animal específico ou grupo de animais na situação da pesquisa. Níveis normais de padrões fisiológicos como frequência respiratória, frequência cardíaca, temperatura do corpo e marcadores bioquímicos ou hormonais podem também ser estabelecidos durante esse período.

A frequência de observações deve ser tal que áreas de preocupação e problemas potenciais possam ser detectados em um estágio inicial e, portanto, a dor e perturbação do animal possam ser aliviadas o mais precocemente possível, antes que se tornem severas demais. Se um animal estiver em um período potencialmente crítico, a frequência de observação deve aumentar. Por exemplo, em algumas infecções experimentais, observações de hora em hora podem ser necessárias para identificar o ponto no qual um desfecho selecionado foi atingido e a dor ou perturbação do animal deve ser interrompida.

3.5.3 Sinais gerais de alteração do comportamento normal

Os sinais de alteração no comportamento normal do animal devem ser identificados. Conforme destacado acima, indícios de dor e distresse variam não somente com a espécie, mas também entre linhagens ou raças dentro da mesma espécie, ou até entre indivíduos dentro de uma mesma linhagem ou raça. Sinais mais comuns para uma boa triagem podem ser:

- mudanças na aparência física (ex.: ferimentos, postura, textura do pelo, pelo sujo de urina ou fezes);
- mudanças no peso corporal e outras relacionadas ao consumo de alimento e água;
- mudanças de padrões fisiológicos (ex.: frequência de respiração, frequência cardíaca, temperatura corporal);
- mudanças no comportamento normal (ex.: inatividade, automutilação, comportamento compulsivo, movimentos repetitivos ou estereotipados);
- mudanças nas respostas a estímulos (ex.: agressividade, excitabilidade).

Indicadores comportamentais de dor aguda podem incluir vocalização, aparência anormal, alteração na postura e no modo de andar e também isolamento.

É importante saber que, devido a muitos animais não exibirem imediatamente sinais de dor ou distresse, diversos critérios utilizados para seu monitoramento são indicadores de efeitos adversos mais significativos, e não apenas dor ou distresse suaves ou moderados. Além disso, em muitas espécies-presa como o rato ou camundongo, sinais de dor ou distresse podem ser temporários e intercalados com comportamento normal.

3.5.4 Sinais específicos de alteração do comportamento normal

Sinais de alteração no comportamento normal relativos a um procedimento específico necessitam ser identificados em cada caso. Tanto as consequências desejadas de um determinado protocolo quanto quaisquer complicações potenciais indesejadas necessitam ser consideradas e identificadas. Em ambas as situações, sinais específicos que sugiram o início e progresso desses efeitos adversos devem ser identificados. Por exemplo: em um modelo animal de falência renal crônica, marcadores bioquímicos de função renal seriam utilizados para reconhecer o início e avanço da doença, com marcadores clínicos de polidipsia, poliúria e perda de peso. Após

cirurgia abdominal, peritonite é uma complicação possível, cujos sinais incluem febre ou vocalização como reação à palpação abdominal.

Quando os riscos de complicações de um procedimento não são conhecidos ou os sinais e duração dos efeitos em uma determinada espécie não são bem definidos, um estudo-piloto deve ser conduzido. Os dados identificarão os sinais dos efeitos pretendidos e o risco de complicações, além de ajudar no desenvolvimento de estratégias de refinamento do procedimento. Outras fontes de informação nessas situações são resultados já publicados com protocolos semelhantes, e a experiência de outros pesquisadores, veterinários e técnicos. Nesses casos, o uso do conhecimento e da experiência humana para dor e desconforto também pode ser útil na avaliação desses elementos nos animais. Em outras palavras, deve-se perguntar o que o homem sentiria se fosse submetido ao mesmo procedimento (ou quando ele vivencia uma condição clínica igual). Essa estratégia auxilia na compreensão da importância de critérios de monitoramento.

3.5.5 Pontos-finais humanitários (*endpoints*)

Protocolos de pesquisa com pontos-finais cientificamente justificáveis podem levar a alterações significativas no bem-estar animal apesar da adoção de práticas de prevenção de dor e distresse e estratégias de monitoramento adequadas. Portanto, todo protocolo de pesquisa deve considerar a possibilidade de adoção de pontos-finais humanitários. O encerramento de um estudo ocorre quando os objetivos científicos foram alcançados. Já o ponto-final humanitário é o momento no qual o encerramento é antecipado para que a dor, desconforto ou o distresse do animal sejam evitados, aliviados ou finalizados.

Ponto-final humanitário é o momento no qual a dor, desconforto ou distresse de um animal utilizado em atividade de ensino ou pesquisa é evitado, terminado, minimizado ou reduzido por ações como: i) adoção de tratamento para aliviar a dor, o desconforto ou o distresse; ii) interrupção de um procedimento doloroso; iii) exclusão do animal do estudo; ou iv) morte humanitária do animal.

Um ponto-final humanitário deve permitir o alcance dos objetivos científicos do protocolo de pesquisa e ao mesmo tempo minimizar o sofrimento animal. Todo projeto de pesquisa deve conter as descrições de pontos-finais apropriados para a espécie animal e procedimentos em uso.

Em protocolos que envolvem morte como desfecho provável, a escolha de um ponto-final humanitário adequado é ainda mais importante para abreviar o sofrimento de animais que progredirão inexoravelmente para a morte. O uso de pontos-finais humanitários contribui para o refinamento provendo uma alternativa aos pontos-finais no caso de dor ou distresse grave nos animais.

O pesquisador que tem conhecimento preciso, tanto dos objetivos do estudo como do modelo proposto, deve identificar, explicar e incluir no protocolo de estudo um ponto-final que seja consistente tanto do ponto de vista científico quanto humanitário. Quando estudos novos forem propostos é interessante a realização de estudo-piloto para avaliar a dor e o distresse que podem ocorrer durante o estudo.

Os pontos-finais devem ser objetivos e baseados em evidências a fim de:

- limitar sofrimentos que não tenham sido previstos;
- evitar a antecipação da morte desnecessária de animais cujo bem-estar está menos comprometido do que se crê ou antes que o objetivo científico tenha se completado;

- informar sobre o índice de severidade do procedimento;
- avaliar melhoramentos potenciais.

Ao reconhecer o ponto-final humanitário, as seguintes ações devem ser tomadas:

- o animal deixa de ser um sujeito experimental;
- ajustar o protocolo para reduzir ou remover a causa do efeito adverso e com isso permitir que o animal se recupere;
- administrar tratamentos sintomáticos ou de suporte;
- morte humanitária do animal.

Deve-se destacar que não pode haver demora entre reconhecer e agir; o bem-estar animal não é protegido por sistemas nos quais as decisões e as ações exijam longos comunicados ou burocracia demorada.

3.5.6 Procedimentos em casos de presença de sinais de comprometimento do bem-estar

Em quaisquer circunstâncias onde a experiência de dor ou desconforto for eticamente justificada como parte do estudo, sendo esses elementos reais ou potenciais, eles deverão ser minimizados ou aliviados.

A intervenção será necessária para aliviar e monitorar complicações, sejam elas previstas ou não. Quando previstas, um plano para lidar eficazmente com tal evento deve ser desenvolvido antes do início do estudo. Ao longo do curso do estudo, a frequência e tipo de complicações devem ser monitorados e estar sujeitos a uma revisão contínua e a uma investigação detalhada, visando minimizar complicações indesejadas.

Em muitos casos, pode ser possível aliviar a dor ou desconforto sem comprometer os resultados científicos. Estratégias específicas deverão ser adotadas em cada projeto, e podem incluir um aumento na frequência de monitoramento relacionado ao início ou alteração de sintomas, provisão de terapia de apoio como fluidos, uso estratégico de analgésicos ou condições de alojamento específicas.

Ações a serem tomadas quando um sinal específico ou combinação de sinais é observado em um animal devem ser definidas. A depender da gravidade do sinal, tais ações ou intervenções poderão incluir:

- promover o conforto do animal fornecendo tratamentos de apoio (ex.: calor, higiene, fluidos, nutrição e necessidades sociais);
- aumentar a frequência de acompanhamento/observação;
- consultar um médico veterinário com experiência apropriada;
- administrar um tratamento específico (ex.: um agente analgésico);
- submeter o animal à morte humanitária.

Os pesquisadores precisam agir prontamente para aliviar a dor ou sofrimento, o que pode determinar a continuação ou interrupção do projeto.

3.5.7 Treinamento

Todas as pessoas responsáveis por fazer as observações dos animais devem ser competentes na avaliação da fisiologia, do comportamento e da condição geral, utilizando como referência o padrão normal dessas variáveis, bem como conhecer as alterações específicas esperadas. A instituição, o grupo de pesquisa e a Ceua institucional, que autorizou o estudo, são responsáveis por garantir que o pessoal envolvido com o monitoramento dos animais seja capacitado. O treinamento deve ser fornecido conforme necessário e deve englobar não apenas técnicas, mas também as responsabilidades dos pesquisadores em monitorar os animais. A preparação das equipes deve incorporar a avaliação do local de trabalho com treinamento extra e continuado, conforme necessário.

3.5.8 Abordagem em equipe

Estratégias de monitoramento devem ser realizadas com a colaboração de todos os envolvidos na supervisão dos animais utilizados no projeto de pesquisa e de todas as pessoas com experiência relevante com a espécie a ser utilizada e os procedimentos que serão realizados. Essa abordagem em equipe deve, quando possível, incluir os pesquisadores, estudantes, veterinários e técnicos. A experiência de participar da criação de estratégias de monitoramento pode ser muito útil no treinamento e formação dos alunos.

3.5.9 Documentação da Estratégia de monitoramento

A documentação precisa da estratégia de monitoramento garante que todas as pessoas envolvidas com o cuidado dos animais estejam cientes dos fundamentos que determinam a presença e severidade da dor e da perturbação. Isso facilita:

- a avaliação de um animal à medida que sua condição clínica muda;
- a determinação se o momento de intervenção foi observado;
- a revisão da eficácia da estratégia de monitoramento enquanto o projeto prossegue.

3.5.10 Checklist de monitoramento

Um *checklist* de monitoramento deve incluir os seguintes elementos:

- sinais gerais de anormalidade para a espécie, linhagem ou indivíduo;
- sinais específicos de problemas que podem surgir do procedimento realizado;
- documentação de pontos nos quais algum tipo de intervenção é necessária;
- documentação de desfechos nos quais a morte humanitária é necessária;
- fornecimento de detalhes de qualquer tratamento dado, para que sua eficácia seja avaliada.

Outros fatores que podem ser incluídos são detalhes de qualquer necessidade de cuidados especiais e identificação de qualquer amostra a ser colhida de um animal caso a morte se faça necessária quando os responsáveis pela coleta não estão presentes.

As descrições dos critérios de monitoramento devem ser formuladas de forma que um sinal “negativo” seja utilizado para indicar “sem problemas” e um sinal “positivo” seja utilizado para indicar que pode haver um problema real ou potencial segundo observado pelo comportamento ou com a clínica. Por exemplo, o termo “isolamento” deve ser empregado no lugar de “interação social”, e “respiração difícil” no lugar de “padrão respiratório”.

A inclusão de um campo nenhuma anormalidade detectada (NAD) no *checklist* deve ser considerada. Esse campo poderia ser utilizado por uma pessoa experiente com pouca dificuldade de avaliar se um animal ou grupo de animais não estão bem. Se um animal não estiver bem, o *checklist* detalhado deve então ser utilizado para fazer um julgamento sobre as ações a serem tomadas. O pesquisador principal do projeto deve garantir que não haja uso indevido do campo NAD por pessoas inexperientes.

3.5.11 Especificidade de um *checklist* de monitoramento

Idealmente, um *checklist* de monitoramento deve ser elaborado especificamente para cada espécie e para cada procedimento. Critérios de monitoramento diferirão de acordo com o tipo de protocolo de pesquisa, bem como entre espécies e indivíduos. Para alguns projetos, vários *checklists* de monitoramento diferentes podem ser necessários para cobrir diferentes fases do trabalho. Um *checklist* de monitoramento deve ser relevante ao procedimento. Por exemplo, um *checklist* genérico para camundongos pode ser utilizado como ponto inicial, mas não deve ser necessariamente usado para todos os projetos que utilizam camundongos.

Checklists simples podem ser desenvolvidos para uso durante períodos do projeto em que o bem-estar dos animais seja uma preocupação menor. Por exemplo, durante o período de aclimatação ou quando um animal já está recuperado de um determinado procedimento. Um *checklist* simples pode incorporar um campo NAD, enquanto o *checklist* de monitoramento mais detalhado seria utilizado se alguma anormalidade fosse detectada.

3.5.12 Envolvendo a Comissão de Ética no Uso de Animais (Ceua)

A estratégia de monitoramento deve fazer parte da proposta enviada à Ceua. A Ceua pode interferir na revisão dos critérios de monitoramento e pontos de intervenção mediante consulta ao proponente. Dessa forma, todos os critérios para monitoramento e ações subsequentes são acordados e documentados antes do início do projeto. A Ceua deve também envidar esforços para que todos os pesquisadores possuam a experiência ou treinamento apropriados para implementar a estratégia de monitoramento de forma efetiva.

3.6 Treinamento de pessoal

Um importante fator de contribuição para obtenção de bons resultados no cuidado e utilização de animais é a qualidade da capacitação e o comprometimento dos membros da equipe com o trabalho desenvolvido. As pessoas devem ser capacitadas para oferecer cuidado minucioso na manutenção de animais. Devem estar cientes de que a qualidade de suas ações interfere no bem-estar dos animais ou nos resultados de atividades de ensino ou pesquisa.

Pesquisadores, professores ou usuários de animais devem ter treinamento e experiência nos procedimentos que realizam. O conhecimento dos preceitos éticos da utilização de animais também deve ser cobrado de todos os membros da equipe. O treinamento, programas educacionais, capacitação técnica e seminários para todo o pessoal envolvido no uso de animais em atividades de ensino ou pesquisa são de responsabilidade da instituição.

4. OBTENÇÃO DE APROVAÇÃO PARA NOVOS PROTOCOLOS DE PESQUISA

Este capítulo define o propósito e as responsabilidades das Comissões de Ética para uso de animais (Ceuas), e o que deve ser considerado ao submeter um protocolo de pesquisa a uma Ceua.

4.1 Comissões de Ética no uso de animais

- É responsabilidade da Ceua, no âmbito de suas atribuições, cumprir e fazer cumprir o disposto na Lei 11.794/08 e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais;
- Todos os estudos que utilizam animais vertebrados não humanos devem ser aprovados e monitorados pela Ceua da instituição que manterá os animais durante a condução do projeto de pesquisa ou procedimento de ensino, sendo esta credenciada no Concea. A Ceua da instituição deve garantir que o uso de animais esteja em conformidade com a Lei 11.794/08 e os seus dispositivos infralegais e sempre que se fizer necessário justificar a aplicação dos conceitos 3Rs (“*Reduction, Refinement and Replacement*”) redução, refinamento e substituição. Quando uma atividade for conduzida a campo, ou seja, fora das instalações institucionais, a responsabilidade de aprovar e acompanhar o projeto será da Ceua da instituição a qual o pesquisador principal pertence, sendo que esta instituição deverá estar credenciada no Concea. Quando aplicável, a Ceua responsável pela aprovação e acompanhamento do projeto será a do patrocinador do estudo que também deverá estar credenciado no Concea.

4.2 Submetendo uma proposta à Ceua

Antes de submeter uma proposta à Ceua, os pesquisadores devem considerar as questões a seguir:

4.2.1 Antes de escrever seu projeto o pesquisador deve perguntar-se:

- O uso de animais é necessário?
- Existem alternativas ao uso dos animais? Se existem, citar quais e por que não vai empregá-las.
- O estudo foi planejado para produzir resultados válidos?
- É necessário um estudo-piloto?
- As espécies ou animais foram selecionados de forma apropriada?

- Há instalações, equipamentos e condições do ambiente adequadas e disponíveis?
- Todo o pessoal envolvido está adequadamente treinado? Tem algum conhecimento sobre a biologia e o comportamento da espécie que vai usar?
- Procurou utilizar o menor número possível de animais?
- Há estratégias para minimizar e monitorar a dor e o distresse?

4.2.2 Se for usar animais, os seguintes dados deverão constar na proposta de estudo:

- Espécie e linhagem dos animais/*inbred* ou *outbred*/idade ou peso/sexo;
- Fonte de obtenção dos mesmos;
- Período de adaptação;
- Alojamento durante a execução da pesquisa: tipo de gaiola, tipo de cama, número de animais por gaiola, ambiente (temperatura, umidade, etc.);
- Se tomar providências para melhorar o ambiente dos animais, especificar quais;
- Alimentação: tipo e composição, esquema de alimentação e de água.

4.2.3 Quando do procedimento: método

A descrição dos procedimentos dependerá do propósito da pesquisa. Contudo, algumas informações serão sempre necessárias:

- número de animais, espécie, sexo e idade;
- proveniência dos animais e qualquer tratamento prévio;
- esquema dos procedimentos, tais como hora em que serão realizados, intervalos de tomada de amostras e descrição genérica dos equipamentos utilizados. Em procedimentos dolorosos, indicar quais medidas serão adotadas para evitar ou reduzir a dor ou o sofrimento;
- grau de severidade;
- no caso de morte humanitária o método que será utilizado deverá estar descrito claramente, independente dele ser aplicado durante ou ao final do estudo. Também deverá ser indicado como serão descartadas as carcaças ou cadáveres.

Estudos adicionais ou alterações na proposta; eventos adversos ou imprevistos e a suspensão da pesquisa deverão ser informados à Ceua para análise e decisão conforme a legislação vigente.

A solicitação à Ceua deverá conter informações suficientes para que a Comissão possa avaliar a proposta com segurança.

Em resumo, o projeto deve incluir, no mínimo:

- o título do projeto;
- justificativa do projeto e para o uso de animais no projeto;
- objetivos;
- plano de trabalho e cronograma estimado;
- os nomes, funções e capacitação de todo o pessoal;
- a proveniência dos animais e as licenças exigidas, uma vez que a autorização da Ceua não exclui a necessidade de outras autorizações legais cabíveis de instituições como Instituto Brasileiro de Meio Ambiente – Ibama, Fundação Nacional do Índio – Funai, Comissão Nacional de Energia Nuclear – Cnen, Conselho de Gestão do Patrimônio Genético – Cgen, Coordenação-Geral da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio e outras, no caso em que a natureza do projeto as exigir;
- detalhes de alojamento;
- detalhes do protocolo que será desenvolvido;
- os benefícios potenciais do projeto;
- uma visão geral do projeto;
- como os princípios de Redução, Substituição e Refinamento serão aplicados;
- como os animais serão monitorados;
- considerações como riscos potenciais a outros animais não humanos ou humanos;
- declaração de que o projeto segue a legislação e princípios éticos.

O Quadro 1 pode ser utilizado para orientar os pesquisadores sobre questões que deverão ser consideradas ao planejar e conduzir protocolos de pesquisa. O Quadro objetiva manter o bem-estar e reduzir ao mínimo a dor ou distresse dos animais durante o desenvolvimento dos projetos de pesquisa.

QUADRO 1 – ORIENTAÇÃO PARA ADESÃO AOS PRINCÍPIOS ÉTICOS NO USO DE ANIMAIS E CUIDADOS COM O BEM-ESTAR ANIMAL EM PROTOCOLOS DE PESQUISA

PLANEJAMENTO DO ESTUDO
Avalie se há alternativas ao uso de animais
Preveja a extensão da dor e do distresse e encontre formas de evitá-los ou de minimizá-los
Avalie a dor e o distresse antecipados individualmente <i>versus</i> causar menos dor em um número maior de animais
Planeje o protocolo de pesquisa para durar o menor tempo possível

PLANEJAMENTO DO ESTUDO

Conheça a espécie a ser utilizada, o comportamento normal dela e seus sinais de dor ou distresse

Considere se as técnicas propostas são as melhores possíveis

CONDUÇÃO DO ESTUDO

Monitore os animais para verificar alterações no comportamento e sinais de dor e de distresse durante toda a realização do estudo

Forneça tratamento paliativo para a dor dos animais, ex. cuidados pré e pós-operatórios, leitos confortáveis, temperatura e umidade ambientes nas faixas de conforto para a espécie, barulho mínimo, etc., incluindo anestesia ou analgesia

Submeta à morte humanitária, sem demora, qualquer animal que pareça estar sofrendo dor ou distresse imprevistos e que não possam ser prontamente aliviados

Avalie complicações imprevistas e determine se os critérios para intervenção e ponto-final humanitário são adequados

TÉCNICAS DE REVISÃO E ESTRATÉGIA DE PROMOÇÃO

Continue a revisar as técnicas, procedimentos e métodos para refiná-los sempre que possível

Revise os Procedimentos Operacionais Padrão (POP) periodicamente

Continue a revisar procedimentos voltados ao cuidado e à administração em instalações que contenham animais confinados

Continue a revisar os procedimentos voltados para as boas práticas

RELATANDO À CEUA

Faça relatórios à Ceua conforme necessário

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTMAN, D. G. (1991). Practical Statistics for Medical Research. Chapman & Hall.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – Concea. Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA), (2013). Disponível em: <http://www.cobea.org.br/arquivo/download?ID_ARQUIVO=20>

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Portaria Nº 491, de 3 de julho de 2012. Disponível em: <ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpsessp/bibliote/informe_eletronico/2012/iels.jul.12/lels126/U_PT-MCTI-GM-491_030712.pdf>

COCHRAN, W. G.; COX GM (1992). Experimental Designs (2nd Edition). John Wiley & Sons.

Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:en:PDF>>

Directive 86/609/EEC of the European Parliament and of the Council. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/fs/aw/aw_legislation/scientific/86-609-eec_en.pdf>

ESKES, C.; SÁ-ROCHA, V. de. M.; NUNES, J; PRESGRAVE, O.; DE CARVALHO, D.; MASSON, P.; RIVERA, E.; COECKE, S.; KREYSA, J.; HARTUNG, T. (2009) Proposal for a Brazilian centre on alternative test methods. ALTEX. 26(4):303-6.

FESTING, M. F. *et al.* (2002). The design of animal experiments: reducing the use of animals in research through better experimental design, London UK, Royal Society of Medicine Press.

LANCASTER, G. A.; DODD, S.; WILLIAMSON, P. R. (2004). Design and analysis of pilot studies: recommendations for good practice. Journal of Evaluation in Clinical Practice 10(2): 307-312 doi: 10.1111/j..2002.384.doc.x.

PRESGRAVE, O. A. (2008) The need for the establishment of a Brazilian Centre for the Validation of Alternative Methods (BraCVAM). Altern Lab Anim. 36(6):705-8.

Resolução Normativa 17, de 3 de julho de 2014 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. L. (1959). The Principles of Humane Experimental Technique. Methuen, London.

RUXTON, G. D.; COLEGRAVE, N. (2006). Experimental Design for the Life Sciences (2nd edition). Oxford University Press.

**ROEDORES E
LAGOMORFOS
MANTIDOS EM
INSTALAÇÕES DE
INSTITUIÇÕES DE
ENSINO OU
PESQUISA CIENTÍFICA**

Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica

Roedores e Lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica

ESTRUTURA FÍSICA E AMBIENTE DE BIOTÉRIOS

Coordenador: *Luisa Maria Gomes de Macedo Braga - Consultora em Ciência de Animais de Laboratório (autônoma)*

Autores: *Joel Majerowicz - Fundação Oswaldo Cruz*
Luiz Augusto Correa Passos - Universidade Estadual de Campinas
Rovilson Gilioli - Universidade Estadual de Campinas

PROCEDIMENTOS

Coordenador: *Vânia Gomes Moura Mattaraia - Instituto Butantan*

Autores: *Ana Maria Guaraldo - Universidade Estadual de Campinas (in memoriam)*
Bruno Lourenço Díaz - Universidade Federal do Rio de Janeiro
Gui Mi Ko - Universidade Federal de São Paulo
Ingrid Dragan Taricano - Universidade Nove de Julho
Marcel Frajblat - Universidade Federal do Rio de Janeiro
Marco Antônio Stephano - Universidade de São Paulo
Nanci do Nascimento - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Rovilson Gilioli - Universidade Estadual de Campinas
Silvia Maria Gomes Massironi - Universidade de São Paulo
Valderez Bastos Valero Lapchik - Universidade Federal de São Paulo

I. INTRODUÇÃO

As instalações, as condições de alojamento e o ambiente em que se encontram os animais são elementos essenciais para limitar as variações fisiológicas que podem alterar a sua saúde, seu bem estar, bem como para não interferir nas pesquisas, no desenvolvimento tecnológico e no ensino, além de propiciar a segurança das pessoas envolvidas.

Dependendo da abrangência das atividades e dos objetivos institucionais, da espécie animal e do número de animais que serão alojados, o projeto do biotério e suas necessidades particulares devem ser claramente analisados. É benéfico pensar em um projeto flexível, de fácil adaptação e, se possível, com vistas a expansões futuras.

II. INSTALAÇÕES

As instalações requerem áreas separadas para funções específicas, salas e equipamentos especializados e ambientes controlados.

Apesar de diferentes necessidades e muitas soluções alternativas de concepção, há orientações específicas que devem ser consideradas no projeto.

Um projeto de biotério funcional e eficiente deverá, no momento de sua concepção, considerar também a natureza dos procedimentos que serão realizados.

As instalações básicas de um biotério compreendem:

- Área administrativa;
- Área de recepção de animais / quarentena;
- Área de depósitos para: insumos, materiais limpos, equipamentos, rejeitos entre outros;
- Área de higienização;
- Salas de animais;
- Vestiários;
- Sala de procedimentos;
- Eutanásia;
- Áreas de serviços;

Para biotérios experimentais, em função da complexidade dos ensaios neles realizados, áreas adicionais poderão ser necessárias, tais como:

- Cirurgia e cuidado intensivo (UTI),
- Preparação de dietas especiais,
- Irradiação e coleta de imagens;
- Tratamento clínico e laboratório de análises entre outros; Sala de isolamento nos casos de uso de material biológico, químico ou físico que apresentem riscos;
- Barreiras adicionais nos casos de animais geneticamente modificados ou que necessitem um isolamento especial.
- Área para estocagem de cama e ração especiais,
- Área específica para suprimentos biológicos e farmacêuticos;
- Área para estocagem de produto biológico contaminado;

2.1 LOCALIZAÇÃO

A área destinada à construção de um biotério é extremamente importante. Em razão dos aspectos técnicos, as instalações deverão, sempre que possível, estar localizadas em áreas com reduzido trânsito de veículos e pessoas.

A escolha do local deverá levar em consideração o fácil acesso, favorecendo a entrega de materiais, insumos e equipamentos, bem como a remoção dos resíduos gerados no biotério.

Preferencialmente, o biotério deverá ser edificado distante de fontes poluentes, de vibrações e de laboratórios que manipulem agentes patogênicos.

2.2 AMBIENTES FÍSICOS

O layout das instalações físicas, das barreiras sanitárias e de contenção a serem adotadas em um biotério deverão minimizar a ocorrência de infecções e promover o bem estar animal, além de favorecer a operacionalização da unidade. Diferentes espaços são necessários, conforme descrito abaixo:

2.2.1 ÁREAS DE APOIO:

2.2.1.1.1 Administrativo

Destina-se à gestão técnica-administrativa do biotério e compreende a sala de coordenação, secretaria, sala de convívio para os funcionários, sanitários, arquivos, almoxarifado de material de expediente, lavanderia e vestiários, e, sempre que possível, local para reuniões, aulas e treinamento das equipes.

É recomendável que todas as pessoas que acessem ou saiam das instalações o façam por uma área de recepção. O fluxo de pessoal deverá se feito, sempre que possível, por local distinto daquele previsto para materiais, insumos, equipamentos e descartes.

2.2.1.2 Áreas de Recepção de animais e Quarentena

Devem ter localizações estratégicas que possibilitem que os animais recém chegados não necessitem passar por outras áreas.

A quarentena é o espaço físico para isolamento inicial dos animais e deverá ter condições ambientais apropriadas de alojamento, onde estes possam permanecer antes de serem transferidos para as salas de criação e manutenção. Suas dimensões devem contemplar a variedade de espécies animais e as atividades de manejo inerentes a cada uma delas. Animais recém-adquiridos necessitam de adaptação ao novo ambiente, recuperação do estresse causado pelo transporte e avaliação do estado de saúde. O manejo da sala de quarentena deve ser feito de forma a evitar a mistura de espécies, linhagens e diferentes procedências.

No caso dos biotérios experimentais sem local para quarentena, recomenda-se o conhecimento prévio do estado sanitário dos animais, uma vez que, em certas situações, eles serão introduzidos diretamente nas salas.

2.2.1.3 Sala de procedimentos

Nos casos dos biotérios de experimentação, essa sala deve ser localizada próxima das salas dos animais para evitar o deslocamento destes por longas distâncias. Uma única sala pode ser utilizada para vários fins, desde que ela seja higienizada entre os procedimentos.

2.2.1.4 Ambientes especiais

Em alguns casos há necessidade de laboratórios especializados, tais como: cirúrgicos, de cuidado intensivo, de preparação de dietas especiais, de irradiação e de coleta de imagens, de tratamento clínico, sala de isolamento, etc. Sala para cirurgia experimental é frequentemente requerida, quando prevista, deverá ser incorporada no projeto construtivo, de forma a atender aos conceitos gerais de operacionalização do biotério.

2.2.1.5 Salas de Descanso e Copa

Quando existentes, devem possuir mobiliário adequado e equipamentos necessários para armazenar e aquecer alimentos - evitando-se, todavia, a preparação dos alimentos nesta sala -, de forma a permitir o conforto dos funcionários. Se possível, luz natural e visores para o exterior devem estar presentes. Pode ser usada como sala de convívio e entretenimento.

2.2.2 ÁREAS DE SERVIÇO

2.2.2.1 Área de Higienização

Esta é a área destinada à lavagem e desinfecção ou esterilização de materiais, insumos, equipamentos e suprimentos e, portanto, seu projeto deverá incorporar tanques de lavagem e autoclaves, podendo também, de acordo com as necessidades, ser previstas a instalação de tanques de imersão, caixas de passagem e equipamentos para a lavagem de gaiolas e bebedouros. A ventilação deste ambiente deve ser exclusiva, suficiente para minimizar acúmulo de odores e excesso de calor e vapor. A exaustão deverá ser projetada de tal forma que o ar não seja reintroduzido em outras áreas do biotério. Esta área deve ser projetada de modo a minimizar distresse aos animais, ao pessoal e às áreas vizinhas, pois os equipamentos e as rotinas podem causar ruídos, calor e umidade excessiva.

Portanto, é imprescindível que este espaço esteja separado, isolado e o mais distante possível das salas de animais. Em biotério de experimentação, que envolvam risco biológico, a descontaminação de materiais, resíduos e equipamentos, deverão atender à legislação nacional incluindo a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), no caso animais geneticamente modificados.

2.2.2.2 Vestiários

O layout dos vestiários e o seu mobiliário deverão facilitar as boas práticas de higienização. É importante considerar, de acordo com tipo de vestiário, a disposição dos armários, o apoio para a troca de calçados, os chuveiros, duchas de ar e o local para armazenamento de produtos de higiene pessoal. Deverão ser previstos vestiários masculino e feminino. A privacidade para trocas de roupa deverá ser contemplada no projeto arquitetônico, bem como um local para o descarte das roupas e toalhas usadas durante o dia.

2.2.2.3 Corredores

O planejamento e dimensionamento dos corredores devem ser concebidos de forma a facilitar a movimentação de pessoal, materiais e equipamentos. Estes devem ser largos o suficiente, fáceis de limpar e desinfetar, pois necessitam deste manejo com bastante frequência devido ao tráfego intenso que possuem. Dimensões entre 1,90m a 2,20m de largura geralmente atendem à maioria das situações. Paredes e quinas de paredes devem ser protegidas com dispositivos em material que apresente elevada durabilidade e resistência a impactos e a processos de higienização.

2.2.2.4 Lavanderia

Não é recomendado que o vestuário utilizado nas rotinas e áreas de um biotério seja lavado pelo próprio funcionário em sua residência. Neste sentido, o uso de uma lavanderia própria possibilitará a higienização necessária, embora possa haver a opção de terceirização deste serviço.

2.2.2.5 Sanitários

Os banheiros produzem aerossóis cada vez que é dada a descarga do vaso sanitário. Associado a isso, existe a tendência de posicionar o exaustor de ar no forro e isso poderá permitir, inadvertidamente, que ocorra uma dispersão das partículas fecais no ar, o que poderá contaminar as pessoas e as roupas limpas. Portanto, devem estar estrategicamente posicionados fora das áreas controladas e de criação.

2.2.2.6 Salas de Animais

É importante no desenvolvimento do projeto construtivo considerar não somente as necessidades momentâneas, mas também demandas futuras. Na grande maioria dos biotérios, o número de animais varia de acordo com os projetos em andamento. A versatilidade das salas de animais facilitam o reagrupamento e organização, de modo a acomodar diferentes tipos e número de gaiolas, estantes, racks e equipamentos auxiliares, necessários para o alojamento de diferentes espécies animais. Além disso, salas versáteis permitem atender a uma grande variedade de projetos ao longo do ano. As salas de animais devem ser separadas por espécie. Em experimentação, sempre que possível, deve ser utilizadas para uma única linha de pesquisa. Isso permite um bom controle do ambiente e reduz a incidência de doenças. A dimensão da sala de animais deve ser definida de acordo com a espécie a ser alojada e o número de gaiolas, estantes, racks e outros equipamentos e acessórios necessários à criação ou experimentação animal. Salas de animais devem ser projetadas de modo a facilitar a limpeza e desinfecção e não devem conter pias e ralos. Caso haja a necessidade de ralos, estes devem ser sifonados

2.2.2.7 Área para Eutanásia

Esse ambiente deverá estar separado e localizado em área que não cause distúrbio aos animais alojados no biotério. O ambiente deverá possuir equipamentos e materiais necessários ao método de eutanásia definido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA). A eutanásia poderá ser realizada na sala de necropsia ou na sala de procedimentos. As instalações desse ambiente devem facilitar a limpeza e a desinfecção.

2.2.3 DEPÓSITOS

Deve se reservar um espaço adequado para o depósito de equipamentos, suprimentos, cama e lixo, com atenção especial para o espaço de armazenamento de alimentos, que deve ser limpo, seco, e com controle de insetos e de outras pragas.

2.2.3.1 Depósito para estocagem de Insumos: Ração e Forragem

O espaço destinado a estes insumos deverá ter um fácil acesso para carga e descarga, mas, ao mesmo tempo, deve evitar que pessoas sem autorização tenham acesso a áreas restritas do biotério. Os alimentos para os animais devem ser armazenados em ambientes fechados, ventilados, com baixa umidade, de fácil higienização e desinfecção, para prevenir contaminações e preservar as propriedades nutricionais. Alimentos e forragem não devem ser armazenados diretamente no piso. O uso de estrados, estantes ou outros dispositivos, para esse fim, são recomendados e devem ser dispostos, de modo a não terem contato com paredes, o que facilita a inspeção e higienização do ambiente. Para resguardar a sanidade do ambiente, recomenda-se a criação de mecanismos que evitem a introdução direta de embalagens externas ao biotério.

2.2.3.2 Depósito de Resíduos

Deve estar isolado das demais áreas do biotério e conter local para:

Alojar as embalagens, contendo a cama usada e resto de ração acumulados entre os períodos de coleta.

Câmara fria ou freezer para acondicionamento de carcaças de animais que deverão ser descartadas segundo a legislação vigente.

O acesso para o exterior deverá ser facilitado, evitando-se o trânsito no biotério, de pessoas estranhas ao quadro de funcionários da Unidade. Um sistema de drenagem com ralo sifonado deve ser considerado neste ambiente, de forma a favorecer com eficiência a higienização e desinfecção.

2.2.3.3 Depósito para Materiais Limpos

Este ambiente deve armazenar insumos após higienização e desinfecção ou esterilização. Sua localização deve ser em local controlado, dentro da área limpa do biotério, próximo às salas dos animais.

Suas dimensões são determinadas em função do quantitativo de insumos, materiais, equipamentos e das demandas das espécies animais alojadas na unidade.

2.2.4 BARRERAS SANITÁRIAS E DE CONTENÇÃO

Barreiras no contexto de biotérios consistem na combinação de sistemas físicos e procedimentos operacionais que juntos minimizam a transmissão de enfermidades, tanto do homem para o animal, como dos animais para o homem. As barreiras podem ser divididas em duas categorias: bioexclusão e biocontenção. Bioexclusão é voltada na prevenção da entrada de enfermidades e infestações, provenientes do exterior, para os animais alojados no biotério. Essas barreiras são estabelecidas para proteger o padrão sanitário dos animais. Biocontenção é voltada para prevenir o escape de agentes contaminantes dos animais alojados nos biotérios para o exterior. As barreiras de biocontenção são utilizadas em área de quarentena ou isolamento de animais com padrão sanitário desconhecido e principalmente nos biotérios de experimentação que trabalhem em experimentos nos quais os animais são intencionalmente infectados com agentes patogênicos.

De acordo com o grau de risco envolvido, as exigências e complexidades serão diferentes e deverão ser avaliadas em conformidade com a legislação vigente.

2.2.5 DETALHES CONSTRUTIVOS

A escolha correta dos materiais a serem usados na construção de um biotério é de fundamental importância para propiciar as condições adequadas para um funcionamento eficiente e facilitar a higienização dos ambientes.

2.2.5.1 Paredes

As paredes devem ser lisas, não absorventes e resistentes à umidade e ao impacto. Não devem desenvolver rachaduras ou fissuras com facilidade. As juntas entre as paredes, pisos e tetos devem ser arredondadas. Junções que formem ângulos agudos devem ser evitadas, pois dificultam a limpeza. O mesmo deve ser observado entre as junções com as portas e, quando apresentarem frestas, estas deverão ser vedadas para evitar a penetração e

acúmulo de sujidades. Os materiais empregados nas superfícies e paredes devem ser impermeáveis e permitir a limpeza e desinfecção com detergentes e desinfetantes e resistir à água sob pressão. Recomenda-se que a instalação de dutos (de ar ou energia, entre outros) ou de quadros de distribuição elétrica não seja executada nas áreas controladas do biotério. Quando isso não for possível, estes deverão ser selados, com junções vedadas e regulares para facilitar a limpeza. As paredes do corredor são particularmente propensas a danos devido ao movimento de carrinhos e outros equipamentos e, portanto, poderá ser necessária alguma forma de proteção. Por esta razão, o uso de elementos de proteção, como grades ou guardas de canto, poderá ser considerado. Existem diferentes modelos de guardas de proteção que poderão ser empregados (plásticos, aço inox ou alumínio), desde que sejam sólidos ou selados de forma a favorecer a higienização e evitar a presença de patógenos.

2.2.5.2 Tetos

Tal como acontece com os pisos e paredes, os tetos devem ser resistentes a frequentes lavagens e desinfecções, embora o teto esteja menos sujeito ao desgaste.

Tetos de concreto são os mais indicados por serem lisos e aceitarem pinturas. Nos casos em que forem utilizados tetos falsos, os mesmos deverão ser fabricados em material impermeável, ter uma superfície lavável, ser lisos e livres de rachaduras e as placas deverão ser fixadas e as juntas vedadas.

Em casos onde dutos e canos precisam ser instalados no espaço entre o forro e o teto, como em salas de procedimentos, o acesso no momento da manutenção e ou reparo, será realizado por inspeções estrategicamente localizadas. Quando houver a necessidade de passá-los por uma sala de animais, recomenda-se que os acessos estejam localizados nos corredores contíguos a elas, ou seja, fora das salas dos animais.

2.2.5.3 Pisos:

O contrapiso das instalações deve ser de concreto. O piso considerado ideal é resistente aos produtos empregados nas rotinas de limpeza e desinfecção, bem como ao emprego de máquinas de lavar com jatos pressurizados. Deve ter material não absorvente e resistir ao impacto. O material empregado deve oferecer facilidade de reparo, ao mesmo tempo em que deve suportar o peso e movimento dos equipamentos do biotério, de maneira que não abram fissuras, trincas ou rachaduras e também não fiquem corroídos. As juntas de dilatação devem, sempre que possível, estar localizadas na base das paredes. A qualidade do acabamento é crítico para a higiene, a limpeza e a durabilidade.

Dependendo da área ou da sua finalidade, o piso poderá ser monolítico ou ter o mínimo possível de juntas. É importante destacar que a aplicação correta dos materiais utilizados na construção do piso é fundamental para assegurar a sua qualidade e durabilidade.

2.2.5.4 Janelas:

Embora a luz natural seja benéfica para os seres humanos e animais, não se recomenda o uso de janelas com acesso direto para as salas de animais de laboratório. Quando necessárias, as janelas deverão ser instaladas em corredores externos que não sejam contíguos às salas de animais, salas de técnicos, entre outros ambientes, desde que permaneçam fechadas e atendidas as questões de segurança. Janelas internas entre salas ou entre salas e corredores, muitas vezes, oferecem um maior conforto por favorecer uma maior visão e, conseqüentemente, por reduzir a sensação de claustrofobia. Também poderão ser instaladas nas salas cirúrgicas para maximizar a

comunicação visual e deverão ser de material inquebrável, com uma armação metálica alinhada ou embutida nas paredes. Entretanto, não devem ser projetadas em salas de criação, uma vez que a luz que passa por elas pode interferir diretamente nas características das colônias, pois nem todas as espécies aceitam bem o espectro da luz solar, sendo que o aquecimento poderá elevar os custos do sistema de refrigeração, entre outras razões.

2.2.5.5 Portas:

As portas das instalações para animais devem ser resistentes, impemeáveis e duráveis. As portas devem ser confeccionadas de modo a não terem frestas e, quando necessário, ser vedadas para evitar o acúmulo de sujidades e o abrigo de insetos. Sempre que possível, os batentes deverão ser da largura das paredes, embutidos nela e não sobrepostos. Este modelo evita a presença de bordas e o acúmulo de particulados, como poeiras. As portas devem ter dimensões que permitam a livre passagem de materiais e equipamentos. Recomenda-se uma abertura nominal de 1,00m, quando se tratar de portas simples e, no caso de portas duplas, estas deverão atender às necessidades das instalações. Como medida de proteção, quando possível, a sua metade inferior poderá ser revestida com material resistente a impactos. Algumas portas podem necessitar de uma proteção adicional contra carrinhos de transporte. Nos casos em que a distância do chão for superior a 3,0mm, um dispositivo que vede o vão deverá ser instalado. Por questões de segurança, é aconselhada a instalação de visores nas portas para possibilitar uma visualização do ambiente interior. Para as salas de animais, sugere-se visores com dimensões de 15X20cm, sendo que estes deverão permitir um fechamento sempre que houver incidência de luz ou trânsito intenso de pessoal. Estes visores deverão ser vedados e permitir a limpeza e desinfecção. Em certas situações, como em áreas especiais, poderão ser empregados visores maiores que ajudam a tornar o espaço menos claustrofóbico. O sentido de abertura das portas deverá oferecer segurança e favorecer o trânsito de material e pessoal. Geralmente, as portas devem abrir para dentro da sala. No entanto, nos casos em que o tráfego no corredor é limitado ou as portas são abertas com pouca frequência, a opção de sentido de abertura para o corredor irá permitir uma utilização mais eficiente do espaço interno de uma sala ou de uma antessala. Portas muito próximas, tais como, em antecâmaras, poderão abrir na mesma direção ou para fora, a partir da antecâmara, nos casos em que somente uma porta é aberta de cada vez. Neste caso, para uma maior segurança, poderá ser feita a instalação de um sistema de intertravamento das portas, garantindo uma única abertura por vez. No caso de portas com fechamento automático, deve-se lembrar que a eficiência será maior quando o fechamento acontecer no mesmo sentido do fluxo de ar. Entretanto, isto não deverá ser considerado para salas de biocontenção, onde existe uma diferença de pressão entre as áreas. Neste caso, as portas deverão abrir e fechar independentemente do fluxo de ar. A maior eficiência e segurança no momento de utilização de uma porta é que deve definir o seu sentido de abertura o qual, por sua vez, poderá exigir alguns acessórios, tais como dispositivos de travamento automático, molas, ou luzes de aviso.

2.2.5.6 Fornecimento de Energia elétrica e Iluminação

A rede elétrica deverá ser dimensionada de modo a permitir um número apropriado de lâmpadas e tomadas, sendo estas adequadas aos diferentes tipos de equipamentos que serão instalados. O cálculo de dimensionamento de carga deverá contemplar uma margem de segurança e uma provável expansão do biotério e número de equipamentos.

Para o caso de falha no fornecimento normal de energia, deverá ser prevista a instalação de um grupo gerador dimensionado para manter em funcionamento os sistemas críticos do biotério, tais como: insuflamento e exaustão de ar, equipamentos de alojamento de animais de laboratório, luzes de emergência, freezers e, em situações especiais, outros equipamentos estratégicos para a unidade. As luminárias, os interruptores, as tomadas e

outros elementos integrantes das salas dos animais deverão ser vedados para impedir o acúmulo de sujidades, microorganismos e abrigo de insetos. Lâmpadas fluorescentes de baixo consumo são comumente empregadas. Também deverá ser previsto um sistema de fotoperíodo regulável, de forma a oferecer um ciclo de luz uniforme. O sistema instalado poderá apresentar um duplo nível de iluminação, de forma que a intensidade seja maior, nos momentos de trabalho dos técnicos, e reduzida, nos outros horários, favorecendo as espécies mais sensíveis à luz de intensidade elevada.

As lâmpadas ou luminárias devem possuir proteção para as rotinas de limpeza e desinfecção. Os interruptores e tomadas deverão ser aterradas e vedadas nas áreas com muita exposição à água, como nas salas de lavagem e outros ambientes com elevada umidade.

2.2.6 AMBIENTE DE BIOTÉRIOS

O controle das variáveis ambientais dentro dos biotérios é fundamental tanto para a produção e manutenção dos animais de laboratório, quanto para a equipe de técnicos que nele trabalha e para a validade das pesquisas. O ambiente deve assegurar um padrão sanitário nas colônias, ao mesmo tempo em que promova o bem estar dos animais.

Os agentes físicos, químicos e biológicos podem influenciar no comportamento e fisiologia dos animais e modificar os resultados de uma pesquisa. Os resultados experimentais são, a princípio, válidos somente para as condições nas quais eles foram obtidos e uma comparação apenas poderá ser realizada, se toda a informação relativa às condições experimentais for disponibilizada.

Segundo o *Guide for care and use of Laboratory Animals*, 8ªed, para todos os animais terrestres, existem o Microambiente e Macroambiente: “O microambiente de um animal terrestre é o espaço físico imediatamente próximo a ele, que é o recinto primário, como a gaiola, cercado ou estábulo. Ele contém todos os recursos com os quais os animais mantêm contato direto e também delimita o ambiente próximo aos animais. O microambiente é caracterizado por muitos fatores, entre eles, iluminação, ruído, vibração, temperatura, umidade, composição gasosa e de partículas do ar. O ambiente físico do recinto secundário, tal como uma sala, um celeiro, ou uma área externa, constitui o macroambiente”.

2.2.6.1 Ruídos

O ruído pode ser controlado em um biotério, a partir de um projeto arquitetônico bem elaborado, uma construção adequada, seleção criteriosa dos materiais construtivos e dos equipamentos, associada com boas práticas gerenciais. Os efeitos do ruído nos animais de laboratório estão relacionados com a sua intensidade, frequência, intermitência e duração e também dependem das características do animal, tais como: espécie, linhagem e história pregressa de exposição ao ruído durante a fase de desenvolvimento coclear. As atividades diárias dos biotérios produzem muitos sons acrescidos ao ruído de fundo provocado pelo sistema de condicionamento de ar. Ruídos excessivos e inapropriados podem ser irritantes e, algumas vezes, danosos para a saúde animal e humana, portanto, devem ser controlados. Fontes de ruídos provenientes das rotinas de apoio, tais como: da área de higienização de materiais, devem estar o mais distante possível das áreas de criação, bem como das salas de manutenção de animais em experimentação. A localização dos equipamentos de ventilação, das sirenes de alarme, da campainha para o público, dentre outros dispositivos geradores de ruídos, devem ser estrategicamente posicionados, de forma a minimizar a chegada dos sons até os animais. De alta significância são os ruídos ultrassônicos, imperceptíveis aos humanos e audíveis para diversas espécies animais. Muitas

fontes de ruído em um biotério emitem ultrassom, portanto, deverão ser adotadas medidas para identificar e corrigir ou isolar essas fontes de forma a proteger os animais. Humanos, ratos e camundongos podem tolerar até 85dB. No entanto, cobaias são mais sensíveis aos ruídos e 60dB é o máximo que podem tolerar, quando estes são constantes. Embora um ruído de fundo de no máximo de 85 db seja aceitável, foram relatadas alterações importantes em ratos expostos a um ruído intermitente de 83 db. A exposição a padrões uniformes pode levar a uma perda auditiva mais rápida, enquanto que a exposição a padrões irregulares está mais propensa a causar transtornos, devido a uma ativação repetida do sistema neuroendócrino.

2.2.6.2 Vibrações:

As fontes de vibração podem ser várias, dentro ou fora das salas de animais e devem ser consideradas nos projetos de engenharia. A vibração externa pode surgir de um equipamento mecânico e ser transmitida pelas paredes e pisos. Um exemplo é uma aproximação das instalações com trilhos de metro ou trem ou em vias de intenso tráfego de automóveis e caminhões. Nestes casos, deve ser dada uma atenção especial ao tipo de estrutura do edifício. As vibrações internas podem ser provenientes de equipamentos e sistemas de ventilação e, sempre que identificada a sua fonte, providências devem ser tomadas no sentido de amortecê-las com sistemas específicos. As vibrações excessivas podem induzir alterações de comportamento, padrão imunológico, bioquímico e reprodutivo em animais de laboratório.

2.2.6.3 Iluminação

A luz pode afetar a fisiologia e o comportamento de várias espécies de animais de laboratório, sendo que as três características mais importantes são o espectro, a intensidade e fotoperíodo. A iluminação deve ser uniforme, sem brilho e proporcionar boa visibilidade. A intensidade da luz pode influenciar a agressividade e a incidência de canibalismo em roedores. Alterações graduais entre os períodos de claro e escuro podem ser necessárias como um período para a adaptação do comportamento diurno e crepuscular. Recomenda-se um nível de iluminação de cerca de 325 lux, distante 1m do piso. Esta intensidade é adequada para o cuidado com os animais e não causam sinais clínicos de retinopatia fototóxica em ratos albinos que foram empregados como referência para o estudo. Camundongos e ratos preferem gaiolas construídas com materiais que os protejam da luz, sendo que os albinos preferem áreas com intensidade menor que 25 lux.

Os animais jovens preferem uma menor intensidade luminosa quando comparados com os adultos.

Temporizadores programáveis devem ser utilizados como forma de se controlar os ciclos de luz (período de claro e escuro) nas salas de animais. Mesmo em ambientes controlados, os efeitos da sazonalidade podem ser percebidos na reprodução das colônias.

De uma forma geral, a iluminação deverá ser distribuída para toda a sala, possibilitando a inspeção das gaiolas e as rotinas com os animais, ao mesmo tempo em que assegure o bem estar animal.

2.2.6.4 Temperatura e Umidade

A temperatura das salas dos animais deverá ser cuidadosamente controlada e monitorada continuamente. Devem ser evitadas flutuações diárias para que não haja maior demanda nos processos metabólicos e comportamentais dos animais. As temperaturas de bulbo seco no macroambiente recomendadas são: 20-26°C para camundongo, rato, hamster, cobaia e 16-22°C para coelhos. A temperatura deve ser mantida numa faixa de variabilidade máxima de 4°C.

A maioria dos animais tolera bem a faixa entre 40 e 60% de umidade relativa do ar, começando a ter problemas quando esta chega a 30% ou quando é superior a 70%. A umidade relativa no microambiente pode ser de maior importância em animais alojados num recinto primário, no qual as condições ambientais diferem significativamente das encontradas no macroambiente (por exemplo, gaiola com filtro superior - top filter).

Segundo a 8ª edição do *Guide for care and use of Laboratory Animals*, a temperatura ambiente e a umidade relativa do ar podem ser afetadas pelo manejo e projeto do Biotério e podem variar consideravelmente entre os recintos primário (microambiente) e secundário (macroambiente), bem como no interior dos próprios recintos primários. Os fatores que contribuem para a variação de temperatura e umidade dos recintos incluem o projeto da instalação; tipo do material utilizado em sua produção; objetos de enriquecimento ambiental, tais como: abrigos e material de ninho, uso de filtros nas gaiolas (top filters), número, idade, tipo e tamanho dos animais em cada recinto; ventilação forçada dos recintos e do tipo e frequência de troca da cama. O recinto primário deve prover os recursos adequados para termoregulação dos animais (material de ninho e abrigos) para evitar o estresse térmico pelo frio, principalmente quando são utilizadas gaiolas com ventilação forçada.

Em determinadas situações, a temperatura ambiental deverá ser mais elevada, como no alojamento dos animais em recuperação pós-operatória, animais recém-nascidos, roedores com fenótipo sem pelo. A magnitude deste aumento de temperatura depende dos detalhes do alojamento, pois às vezes apenas o ajuste da temperatura no microambiente é suficiente e preferível, ao invés de aumentar a temperatura do macroambiente.

2.2.6.5 Ventilação, Exaustão e Qualidade do Ar

A principal função da ventilação e exaustão do ar é proporcionar um aporte adequado de oxigênio e remover a carga térmica produzida pelos animais, pessoal, luzes e equipamentos; diluir e exaurir contaminantes gasosos e particulados, incluindo alérgenos e agentes patogênicos presentes no ar; controlar o teor de umidade e temperatura do ar, e, se necessário, gerar um gradiente de pressão de ar (fluxo unidirecional de ar) entre os espaços adjacentes. É importante ressaltar que a ventilação na sala de animais (macroambiente) é necessária para assegurar uma ventilação adequada no recinto primário (microambiente), que é o ar ao qual o animal está diretamente exposto. O tipo de recinto primário pode influenciar consideravelmente a diferença de ventilação entre o macro e o microambientes - por exemplo, as diferenças entre os dois ambientes podem ser menores quando os animais são alojados em gaiolas abertas do que quando forem utilizadas gaiolas fechadas (microisoladores) sem ventilação forçada.

O padrão de distribuição, o volume e as propriedades físicas do ar fornecido para uma sala influenciam a ventilação no recinto primário dos animais e são determinantes para o microambiente. O tipo e a localização dos difusores de insuflação e exaustão do ar no recinto secundário, em relação ao número, distribuição, localização e tipo de recintos primários, podem alterar a maneira como ocorre a ventilação nos microambientes e, portanto, devem ser considerados. O uso de modelagem computacional para avaliar esses fatores em relação à carga térmica, os padrões de difusão do ar, e o movimento de partículas pode ser útil para melhor dimensionamento da ventilação no micro e no macroambiente.

A exposição direta dos animais a uma massa de ar em alta velocidade deve ser evitada, pois a velocidade do ar que os animais estão expostos altera a taxa de remoção do calor e umidade do animal. Por exemplo, o ar a 20 °C, numa velocidade de 18,3 m/min, tem um efeito de resfriamento corporal no animal de cerca de 7° C. As correntes de ar diretamente nos animais podem ser particularmente prejudiciais para neonatos homeotérmicos (pois não tem pelos e tem os mecanismos de controle da termorregulação pouco desenvolvidos) e para os mutantes sem pelo.

O fornecimento de 15 a 25 trocas de ar por hora nas salas de animais é uma recomendação aceitável para manter a qualidade do ar no macroambiente em volume constante e pode também assegurar a qualidade do ar no microambiente. Embora esta recomendação seja eficaz em diferentes tipos de instalações, ela não considera as possíveis cargas térmicas, as espécies, o tamanho e o número de animais alojados, o tipo de recinto primário e a cama; a frequência de troca da gaiola, as dimensões da sala, ou a eficiência da distribuição do ar no macroambiente e entre o macro e o microambiente. Em algumas situações, o emprego de uma maior taxa de renovação do ar pode ventilar excessivamente um macroambiente que possua poucos animais, desperdiçando energia, ou ventilar insuficientemente um microambiente que contém muitos animais, permitindo o acúmulo de calor, umidade e poluentes.

As trocas de ar nas salas dos animais devem ser feitas com 100% de renovação, não devendo haver trocas com o ar da própria sala. O uso de ar reciclado para ventilar salas de animais propicia um economia considerável de energia, mas pode oferecer riscos. Muitos patógenos dos animais podem ser transportados pelo ar ou por meio de fômites, como a poeira, de maneira que o ar reciclado captado por um sistema de condicionamento de ar (HVAC), que abastece várias salas, oferece o perigo de contaminação cruzada, devendo, portanto, ser evitado. Nos casos em que o ar de exaustão é reciclado, este deve ser filtrado, no mínimo, com filtros de eficiência ASRHAE entre 85 a 95%, para remoção dos particulados presentes no ar, antes de ser reutilizado. Dependendo da origem, da composição e da proporção de ar utilizado na reciclagem (p. ex. se contiver amônia e outros gases liberados a partir dos excrementos dos animais), também é indicada a filtração de substâncias voláteis presentes no ar. Em áreas que necessitam filtração do ar para garantir a segurança do pessoal e dos animais (como em áreas com risco biológico) deve ser avaliada a integridade, a carga e a eficiência do sistema de filtração.

Os modernos equipamentos de aquecimento, ventilação ou condicionamento de ar (HVAC) (por exemplo, sistema de volume de ar variável - Sistema VAV) possibilitam ajustar as taxas de ventilação de acordo com a carga térmica e outras variáveis. Estes sistemas apresentam vantagens consideráveis em relação à flexibilidade e conservação de energia, mas devem sempre fornecer uma quantidade mínima de renovação de ar, como recomendado para os laboratórios em geral.

As gaiolas individualmente ventiladas (IVCs) e outros tipos de recintos primários similares, que são ventilados diretamente com o ar filtrado captado na sala ou que são ventilados de forma independente da sala, podem efetivamente atender às necessidades de ventilação dos animais, sem a necessidade de considerar a ventilação no macroambiente. Contudo, deve-se tomar cuidado com a alta velocidade do ar, conforme já mencionado anteriormente. De qualquer forma, o macroambiente deve ser suficientemente ventilado para permitir a remoção da carga térmica, partículas, odores e resíduos de gases liberados pelo recinto primário.

Os IVCs ou racks ventiladas estão gradativamente substituindo sistemas de ventilação convencionais, que se baseiam na dissipação natural dos gases. As racks ventiladas estão sendo utilizadas com mais frequência em biotérios para proteger os animais de contaminações, supri-los com uma melhor qualidade de ar, melhorar o microambiente onde estão os animais e reduzir a exposição humana aos alérgenos.

Com relação aos aspectos arquitetônicos, as racks ventiladas podem ter um impacto significativo sobre a concepção e uso do sistema de ventilação e climatização de biotérios, uma vez que existem várias maneiras nas quais estes equipamentos podem ser instalados e cada uma delas tem diferentes implicações no projeto do sistema HVAC.

As racks de pressão positiva são usadas para proteger animais mantidos no interior dos mini-isoladores (exclusão). Neste modelo, o ar da sala é aspirado, passa por uma filtragem e é conduzido até o mini-isolador, onde, após se misturar aos poluentes, é retirado da caixa. A rack de pressão negativa é usada para proteger o ambiente de fora da gaiola (macroambiente) de contaminantes e de potenciais alérgenos (inclusão). O ar retirado das gaiolas ventiladas deve ser descarregado diretamente no sistema de exaustão da sala para redução da carga térmica e para evitar a contaminação do macroambiente com amônia.

As gaiolas de isolamento com filtros e sem ventilação forçada (como as com top filters), utilizadas em alguns alojamentos para roedores, restringem a ventilação. Para compensar, pode ser necessário ajustar diversas práticas de manejo, como: higiene e frequência de troca da gaiola, a escolha da cama, colocação das gaiolas em um recinto secundário mais ventilado, diminuir a densidade populacional nas gaiolas, diminuir a umidade relativa do macroambiente, para melhorar o microambiente e a dissipação de calor. Seu uso está sendo desestimulado exatamente pela dificuldade de controle do microambiente, em função da saturação rápida com produção de amônia e umidades excessivas.

2.2.6.5.1 O emprego de racks ventilados em salas de animais e biotérios de experimentação.

A introdução de sistemas de ventilação individual (IVCS) permite o alojamento de um maior número de roedores (particularmente camundongos), quando comparado com sistemas tradicionais. Para tirar o máximo proveito da biossegurança oferecida por estes sistemas, é necessário que se manipule os animais em cabines de biossegurança ou em estações de troca móveis que tenham sido fabricadas especificamente para a finalidade de troca de gaiolas.

O desenho das salas de animais, particularmente onde as unidades IVCS estão envolvidas, é, portanto, uma parte vital do processo de planejamento e desenho e deve prever o espaço para a movimentação dos equipamentos utilizados nas rotinas de cuidado com os animais e os vários grupos que trabalharão nela.

2.2.7 ALOJAMENTO

Estudos recentes avaliaram as necessidades de espaço em relação aos efeitos do alojamento, tamanho do grupo, densidade populacional e às condições de alojamento para diversas espécies e linhagens de roedores. De modo geral, vários efeitos foram relatados sobre o comportamento (como agressividade) e sobre os resultados experimentais. No entanto, é difícil comparar esses estudos, devido às diferenças no delineamento experimental e nas variáveis observadas em cada trabalho. Entre as variáveis que podem alterar a resposta dos animais mantidos em gaiolas de tamanhos ou densidades populacionais diferentes incluem a espécie, o fenótipo, a linhagem (e seu comportamento social), a idade, o sexo, a qualidade do espaço (por exemplo, disponibilidade de uso do espaço vertical), e as estruturas colocadas na gaiola, entre outros. Esses problemas são complexos e devem ser cuidadosamente considerados por ocasião do alojamento de roedores.

Abaixo, apresentamos as tabelas 1 e 2 modificadas do Guide for Care and use of Laboratory Animal, 8ª Edition, para alocação do espaço mínimo recomendado para roedores e lagomorfos.

Tabela 1: Recomendações de espaço mínimo para roedores alojados em grupos*

Espécie		Peso (g)	Área/animal (cm ²)	Altura (cm)A	Observações
Camundongos	Em gruposB	<10	38,7	12,7	Animais maiores podem necessitar de maior espaço para adequado desenvolvimento.
		10 a 15	51,6	12,7	
		15 a 25	77,4	12,7	
		>25	>96,7	12,7	
	Fêmea com filhotes		800 (espaço para o grupo)	17,8	Avaliar o modo de reprodução, pois pode haver variações no número de adultos e filhotes, tamanho e idade dos animais.C
HamsterC		<60	64.5	15,2	Animais maiores podem necessitar de maior espaço para adequado desenvolvimento.
		60 a 80	83.8	15,2	
		80 a 100	103.2	15,2	
		>100	≥122.5	15,2	
cobaioC		<350	387.0	17,8	Animais maiores podem necessitar de maior espaço para adequado desenvolvimento.
		350	≥651.5	17,8	

A Distância do assoalho ao topo da gaiola.

B Deve-se considerar as características de crescimento, tamanho do grupo e sexo dos animais; prever se haverá ganho de peso rápido, sendo preferível proporcionar um espaço maior na expectativa futura de tamanho do animal, bem como considerar que roedores jovens são muito ativos e mostram aumento da brincadeira.

C Considerar possíveis eliminações seletivas de filhotes ou separação de ninhadas do grupo para permitir melhoramento, bem como segurança e bem estar ao grupo. O espaço deve ser suficiente para que as mães e suas respectivas ninhadas consigam se desenvolver até o desmame, sem qualquer efeito prejudicial para ambos.

Tabela 2: Recomendações de espaço mínimo para coelhos alojados em pares ou grupos*

Espécie		Peso (g)	Área/animal (cm ²)	Altura (cm)A	Observações
Coelho		<2	0.14	40.5	Animais maiores podem necessitar de maior espaço para adequado desenvolvimento.
		2 a 4	0.28	40.5	
		4 a 5,4	0.37	40.5	
		>5.4B	≥0.46	40.5	

A Distância do assoalho ao topo da gaiola.

B Animais maiores podem necessitar maior espaço para adequado desenvolvimento.

Procedimentos

I - Introdução

É essencial conhecer a biologia da espécie, raça, linhagem com a qual se trabalha, uma vez que as necessidades básicas (físicas, emocionais ou comportamentais) a serem satisfeitas não são as mesmas para todos os animais. Conceito aplicável aos animais geneticamente modificados, os quais podem apresentar necessidades especiais decorrentes da modificação genética.

Neste capítulo, trataremos das seguintes espécies: camundongo, cobaia, coelho, hamster e rato.

Os roedores possuem organização social complexa. Cada animal tem seu papel e a simples retirada ou adição de um animal em uma gaiola pode ter consequências consideráveis, que afetará o bem-estar de todo o grupo. Uma característica importante e que deve ser respeitada é de serem gregários. O isolamento, portanto, causa sofrimento e diminuição nos níveis de bem-estar. Quando o isolamento for necessário (por exemplo, em casos de agressividade, doenças ou protocolos de pesquisas), deve ser cientificamente justificado. Medidas mitigatórias do impacto do isolamento sobre o bem-estar devem ser adotadas, como permear-se o contato visual, auditivo e olfatório entre animais congêneres, reduzindo o estresse da separação.

1.1 Faz-se necessária a definição de alguns ambientes que serão citados ao longo do capítulo.

1.1.1 Instalações de manutenção: ambientes ou locais que ofereçam condições necessárias para a manutenção do bem-estar animal, desde a sua saída da instalação de produção até o momento da destinação prevista.

1.1.2 Instalações de produção: ambientes ou locais que ofereçam condições necessárias à manutenção do bem-estar animal, compatíveis com as atividades a serem desenvolvidas na reprodução e criação de espécies animais para fins de ensino ou de pesquisa científica.

1.1.3 Instalações de utilização: ambientes ou locais que ofereçam condições adequadas para a realização dos protocolos requeridos nos projetos e que contemplem os cuidados necessários para a manutenção do bem-estar animal até a finalização das atividades de ensino ou da pesquisa científica.

1.2 Espécies

1.2.1 Camundongo

O camundongo de laboratório é um mamífero da família Muridae, subfamília Murinae, da ordem Rodentia e gênero *Mus*. O seu nome científico é *Mus musculus*, o qual detém múltiplas linhas, incluindo três principais subespécies, com distribuição geográfica distinta.

Em geral, os camundongos são dóceis, de fácil manuseio, ciclo de vida curto, fecundidade alta (potencial de reprodutibilidade), curta gestação e tamanho pequeno.

Essas características tornam os camundongos modelos de eleição para estudo de genética, teratologia e gerontologia. Nos estudos de genética, estima-se uma similaridade dos genomas do camundongo e do homem de 70% a 90% (Ko et al, 2008).

1.2.2 Rato

O rato de laboratório, ou rato Norway, é a forma domesticada da espécie *Rattus norvegicus*. Embora o gênero *Rattus* possua cerca de 300 espécies, a outra espécie mais conhecida é *Rattus rattus*, ou rato preto. O gênero pertence à ordem Rodentia e à família Muridae. Os ratos são curiosos, inteligentes e exibem comportamento com amplo repertório de ação. Eles tendem a ser dóceis, mostrando agressividade somente na defesa de seus filhotes. O seu comportamento comum inclui a posição em pé, usada para explorar o ambiente; enfrentamento, uma forma de recreação entre ratos jovens; e limpeza da pelagem. Os ratos são neofóbicos. Entretanto, interagem com objetos novos colocados em seu ambiente. Os ratos têm hábito noturno e geralmente têm três períodos de atividade: no início, no meio e ao final da noite. Eles se alimentam durante esses períodos de atividade, fazendo três a cinco refeições. O êxito do rato Norway em todo mundo deve-se, em parte, ao fato da espécie ser onívora e ter uma notável capacidade para balancear os nutrientes ingeridos, dentro da diversidade de condições alimentares (Lapchik et al, 2008).

1.2.3 Cobaia

A cobaia (*Cavia porcellus*) é um roedor da família Caviidae, conhecido também como porquinho da Índia. A espécie mais utilizada em pesquisas é a *C. porcellus*. As cobaias são animais sociáveis, tímidos, dóceis e raramente mordem ou arranham. Os adultos, frequentemente, mordem as orelhas dos jovens e os machos podem brigar violentamente, durante disputas por uma fêmea em estro, até que se estabeleça a hierarquia do grupo. Assustam-se facilmente, defecam e urinam nos comedouros e derramam sua alimentação pelo piso da gaiola. Vocalizam demonstrando prazer antes de situações gratificantes (alimentação) e ficam juntas ou em cima umas das outras durante o manejo da colônia pelo técnico. As cobaias podem ser alojadas para reprodução em pares ou haréns e os recém-nascidos apresentam-se com os olhos abertos, pavilhão auricular descolado da cabeça e caminham logo após o parto. O desmame ocorre em 2-3 semanas, mas geralmente o jovem alimenta-se com sólidos e água dentro de poucos dias após o nascimento. Em alguns países, é um animal utilizado também na alimentação humana (Bueno et al, 2008).

1.2.4 Hamster

O hamster sírio ou dourado (*Mesocricetus auratus*) é o mais utilizado com fins didáticos e científicos, pertencentes à família Cricetidae (ainda que alguns taxonomistas as coloquem entre os Muridae). Diferentemente de outros roedores usados em laboratórios, não há muitas informações sobre a biologia do hamster em vida livre. Apresentam hábitos noturnos, são curiosos e constroem tocas elaboradas com várias entradas. A fêmea, quando adulta, apresenta um porte superior ao do macho diferentemente da maioria dos roedores, em que o macho é maior que as fêmeas. Os machos não demonstram agressividade com as fêmeas, apenas com outros machos. Em cativeiro, é possível o agrupamento de indivíduos do mesmo sexo. Entretanto, para que se tenha sucesso nesse tipo de alojamento, é necessário que se formem os grupos no momento do desmame.

O hamster sírio é uma espécie sazonal, em vida livre, hibernam durante os períodos de dias curtos, com baixa luminosidade, baixas temperaturas (inferiores a 5°C) e disponibilidade escassa de recursos alimentares e de material para construção de ninho (Mori et al, 2008).

1.2.5 Coelhos

Coelhos e lebres pertencem a uma ordem distinta, a dos lagomorfos (ordem Lagomorpha). Portanto, não são roedores. O ancestral do coelho doméstico (*Oryctolagus cuniculus*) é o coelho selvagem, um mamífero da ordem Lagomorpha com uma grande capacidade de adaptação a diferentes regiões climáticas. A domesticação do coelho é, de fato, recente e não produziu ainda mudanças substanciais no comportamento quando comparado ao coelho selvagem. Apesar da grande variedade entre as raças atuais, as características comportamentais pouco mudaram, mesmo com a domesticação, ou seja, nenhum padrão comportamental foi perdido ou criado. Vários tipos de comportamento mantêm-se: o comportamento de manutenção (recursos essenciais para a sobrevivência e expressão do repertório de comportamentos normais, alimentação, água, proteção), o comportamento materno e o comportamento social. A duração, frequência e intensidade com que os animais os expressam dependem da raça, das condições ambientais e, conseqüentemente, do nível de estresse a que são submetidos. Os coelhos são animais sociáveis que, em vida livre, vivem grande parte do tempo em grupo e em contato próximo uns com os outros. As lutas não são frequentes porque a hierarquia é claramente definida, quando existe um ambiente que simule uma aproximação ao ambiente natural (Moura & Mattaraia, 2008).

II - Procedimentos para área de produção e manutenção de roedores e lagomorfos

As tarefas diárias em uma instalação de ensino ou pesquisa científica destinada à produção e manutenção das cinco espécies tratadas neste capítulo (camundongo, cobaia, coelho, hamster e rato) são bastante complexas, variam de acordo com a estrutura física, disponibilidade de equipamentos, necessidade fisiológica, comportamental e psicológica dos animais, padrão sanitário e genético dos animais e finalidade da produção. Uma forma eficiente e segura para que se alcance a realização das tarefas reunindo todos esses interesses, com sucesso e de maneira contínua, é a implantação dos Procedimentos Operacionais Padrão (POPs), documento que descreve passo a passo as etapas cronológicas sucessivas para a realização do desenvolvimento de uma atividade, garantindo, assim, a padronização de tarefas. Na área de produção ou manutenção de animais, deve haver um POP para cada atividade, desde as consideradas mais simples, como a limpeza das gaiolas, até o sistema de acasalamento específico para linhagens transgênicas. Quando da elaboração de um POP, deve-se envolver a colaboração de todos os funcionários que desempenham a atividade, inclusive responsável técnico, possibilitando assim, que os mesmos possam também estar preparados para diagnóstico e tratamentos/modificações rápidas das não conformidades detectadas, evitando perdas nos padrões de qualidades alcançados nas atividades em geral.

Todos os equipamentos devem ser regularmente validados e estar com as suas especificações, instruções de uso e de limpeza fixadas próximo do equipamento, em local de fácil visibilidade.

A estrutura física das instalações de produção ou manutenção de animais é idealizada com o objetivo de atender à especificidade do modelo biológico que produz ou mantém. Entretanto, há áreas básicas que estão presentes em todas as instalações. Essas áreas estão detalhadamente explicitadas no Capítulo “Estrutura Física e Ambientes para Roedores e Lagomorfos”.

Neste Capítulo, vamos descrever as atividades executadas no interior das áreas destinadas direta ou indiretamente à produção ou manutenção de camundongos, cobaias, coelhos, hamster e rato.

2.1 Recinto primário e secundário

Nas instalações destinadas à produção e manutenção de roedores e lagomorfos, utilizados para ensino ou pesquisa científica, há duas grandes áreas comumente tratadas como área de produção de animais ou área limpa e área de higienização, tradicionalmente chamada de área suja (nome considerado impróprio, uma vez que se refere a uma área restrita que guarda uma inter-relação com o que acontece na área de produção). Essa divisão fundamental entre as áreas ocorre devido às barreiras sanitárias que protegem a área limpa. Primordialmente, falamos das autoclaves de barreira (dupla porta) e de sistema de filtração de ar.

Na área de produção, temos as salas de animais, as quais são denominadas como macroambiente ou recintos secundários. As salas de animais devem ter ambiente controlado e suas variáveis registradas diariamente. O ambiente mais próximo ao animal é denominado de recinto primário, nesse caso, a gaiola, também denominado de microambiente. Recentemente, o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA estabeleceu parâmetros de temperatura, umidade, luminosidade, ruído, vibração e espaço mínimo para produção ou manutenção de roedores e lagomorfos, no Capítulo “Estrutura Física e Ambientes para Roedores e Lagomorfos”.

As espécies tratadas neste Capítulo são todas sociáveis, isto é, vivem em grupos. O ambiente destinado a elas deve permitir alojamento em pares ou grupos, sendo desaconselhado o alojamento individual, o qual necessita de justificativa robusta e aprovação da CEUA institucional para que aconteça.

O ambiente primário, a gaiola, deve suprir as necessidades básicas dos animais e permitir que o animal desenvolva seu repertório comportamental pertinente à sua fase de desenvolvimento. A gaiola precisa ser segura para evitar fuga dos animais, mas, também, com material impermeável, atóxico e não apresentar pontos de risco no seu interior, como ângulos, arestas, saliências, ranhuras ou bordas que possam ferir ou machucar os animais, bem como evitar o acúmulo de sujeiras. Um detalhe que requer muita atenção no ambiente primário dos animais é o assoalho das gaiolas, que deve permitir a movimentação natural dos animais, evitar derrapagens e lesões nas patas. Assoalhos gradeados devem ser substituídos, principalmente no caso de reprodutores, devido ao peso de animais maiores e seu tempo de permanência nas gaiolas. Esse tipo de piso quase sempre causa lesões nos membros posteriores de coelhos.

O ambiente primário deve estimular positivamente o animal, com desafios que previnam a ansiedade, frustração e o estresse crônico, mantendo bons níveis de bem-estar e, conseqüentemente, não comprometer os índices de seu desempenho (vide item sobre enriquecimento ambiental).

São diversas as atividades realizadas em uma instalação de produção ou manutenção das espécies de animais de laboratório tratadas neste Capítulo, elas podem ocorrer diariamente, semanalmente e mensalmente, dependendo da especificidade de cada atividade. A frequência com que são realizadas mantém uma relação de dependência com características de espaço, infraestrutura e administração de cada instituição, bem como do protocolo de pesquisa.

2.2 Procedimentos para área de produção e manutenção de roedores e lagomorfos.

2.2.1 Alimentação e Hidratação

2.2.1.1 Alimento

O estado nutricional do animal pode influenciar o seu crescimento, reprodução, longevidade, seu nível de bem-

estar, dentre outros processos fisiológicos. Todas as cinco espécies (camundongo, cobaia, coelho, hamster e rato) devem receber uma dieta palatável, que forneça as necessidades nutricionais e comportamentais adequadas à espécie, exceto quando o estudo exija outro tipo de conduta e o projeto tenha sido avaliado e aprovado pela CEUA. Os requerimentos nutricionais para roedores e lagomorfos citados neste Capítulo estão definidos nas publicações do National Research Council Committee on Animal Nutrition.

O alimento mais usual no Brasil, para os roedores e lagomorfos mantidos em ambientes, com finalidade de ensino ou pesquisa científica, são as rações comerciais produzidas a partir de alimentos naturais, ou seja, dieta de fórmula aberta, elaborada a partir de produtos agrícolas e derivados. Neste tipo de ração, pode haver uma variação na composição dos nutrientes, devido à variabilidade das plantas, época de colheita, condições do tempo, procedimento de colheita, procedimentos de estocagem, métodos de fabricação e moagem, que influenciam a composição de nutrientes dos ingredientes usados nesses tipos de dieta e conseqüentemente levando à produção de dois lotes da mesma dieta não idênticos. Essa variação nas concentrações dos nutrientes da dieta pode tornar-se uma variável não controlada capaz de afetar resultados. Outra questão refere-se ao grau de contaminação dos ingredientes naturais que ocorre naturalmente pela sua exposição a vários contaminantes ou causados pelo homem. A presença de resíduos de pesticida em baixas concentrações, que não cause problemas na saúde do animal, pode afetar os resultados da pesquisa. Por exemplo, uma concentração de chumbo de 0,5-1,0 ppm é inerente em dietas de ingredientes naturais de roedores e geralmente não é prejudicial à saúde animal, mas poderia influenciar substancialmente os resultados de estudos toxicológicos projetados para avaliarem compostos a serem testados que contenham chumbo.

Dietas certificadas são aquelas que foram previamente testadas para constatação de contaminantes e produzidas de acordo com as exigências de Boas Práticas de Laboratório (BPL).

Dietas purificadas são formuladas com ingredientes que foram refinados de maneira que cada ingrediente contém um único nutriente ou classe de nutriente. As concentrações de nutrientes nesse tipo de dieta são menos variáveis e mais controladas que nas dietas de ingredientes naturais.

Dietas quimicamente definidas são formuladas com os elementos quimicamente puros extraídos de ingredientes disponíveis, tais como aminoácidos, açúcar específico, triglicérides quimicamente definidas, ácidos graxos essenciais, sais inorgânicos e vitaminas puras. Uso desse tipo de alimentação fornece o grau mais alto de controle das concentrações de nutrientes da dieta. Entretanto, nem sempre são prontamente consumidas pelos roedores de laboratório e apresentam elevado custo para uso geral. As concentrações de nutrientes em dietas quimicamente definidas são teoricamente fixadas na hora da fabricação. Entretanto, a biodisponibilidade dos nutrientes pode ser alterada pela oxidação ou interação de nutrientes durante estocagem da dieta.

Os camundongos, ratos e hamsters apresentam crescimento contínuo dos incisivos. As cobaias e lagomorfos apresentam crescimento contínuo de todos os dentes (incisivos, pré-molares e molares), sendo, portanto, necessário o oferecimento de alimentos com grau de dureza que estimule e provoque o desgaste dos dentes.

Entretanto, quando se trabalhar com animais mutantes ou modificados (AnGM), deve-se considerar a composição e o tipo de apresentação dos alimentos adequado ao comprometimento do animal. Há mutantes que apresentam ausência ou malformação dentária. Nestes casos, um alimento pulverizado ou gelatina nutritiva permitirá corrigir este inconveniente.

Mutantes portadores de distúrbios neurológicos ou musculares graves podem morrer devido à sua incapacidade

de obter o alimento do comedouro ou a água da mamadeira. Recomenda-se deixá-los a sós com uma mãe nutriz, além de colocar à disposição dos mesmos uma gelatina nutritiva ou um alimento pastoso com alto teor energético durante as primeiras semanas de vida.

Em condições normais, alimentos não devem ser dispostos sobre a forração da gaiola onde podem ser contaminados ou desperdiçados. Exceções são feitas à oferta de alimentos para animais que, por qualquer motivo, não consigam acessar o local destinado para a ração na gaiola de manutenção.

Os animais apresentam particularidades nas suas exigências nutricionais. As cobaias, por exemplo, são incapazes de sintetizar a vitamina C (ácido ascórbico) em quantidade suficiente para satisfazer as suas necessidades diárias. Insuficiente ingestão de vitamina C pode levar à debilidade, aumento da susceptibilidade às doenças e, eventualmente, para o escorbuto. Portanto, para essa espécie, a vitamina C deve ser disponibilizada na ração, na forma de forragem ou suplementada na água de beber.

A dominância entre roedores é bem relatada. Portanto, quando animais são mantidos em grupos, deve-se tomar cuidado para garantir que os subordinados tenham acesso suficiente à comida e água. Quando necessário, deve-se manter mais de um ponto de acesso para o alimento e água, com distribuição dos comedouros e bebedouros nas gaiolas, a fim de permitir o acesso de todos do grupo e reduzir a possibilidade de competições e agressões. Quaisquer alterações significativas na ingestão de alimentos devem ser investigadas. O escore corporal dos animais é um bom indicador, fácil para coletar e para interpretar, devendo fazer parte dos POPs para avaliação do bem-estar dos animais. Animais com baixo escore corporal sinalizam algo de anormal e que deva ser investigado e rapidamente corrigido, podendo se relacionar com a alimentação, doenças, estresse, etc.

Os comedouros devem permitir acesso fácil ao alimento, minimizar sua contaminação com a urina e fezes, garantindo a qualidade nutricional e sua boa condição.

Recomenda-se irradiar ou autoclavar alimentos utilizados em áreas controladas do ponto de vista sanitário. A autoclavação diminui a concentração de algumas vitaminas e antioxidantes. Portanto, as dietas autoclaváveis devem conter maiores concentrações de ingredientes susceptíveis ao calor para compensar as perdas induzidas pela esterilização em autoclaves.

Outros itens de alimento, além da ração, podem ser oferecidos aos animais como grãos, vegetais e forragens. Entretanto, só devem ser oferecidos após rigorosa higienização, pois podem representar a entrada de algum tipo de contaminação, bem como interferir em algum procedimento utilizado nas atividades de ensino ou pesquisa científica.

2.2.1.2 Estocagem dos alimentos

A ração deve ser armazenada em recintos, cobertos, ambientes limpos, secos, arejados, sem odores e protegidos do sol e do calor, de modo a minimizar a deterioração e contaminação.

Dietas para animais devem ser utilizadas dentro do prazo de validade estabelecido pelo fabricante e armazenadas em instalações com as características já descritas. Dietas irradiadas, desde que mantidas nestas mesmas condições, apresentam um prazo de validade maior, mas sempre deve ser seguida a orientação do fabricante.

Os sacos de ração devem ser mantidos sobre estrados, de preferência de plástico, afastados da parede e

armazenados de maneira a facilitar a utilização dos mais antigos primeiro. O local destinado para armazenar a ração não deve alojar outros insumos. Condição precária de armazenamento pode resultar em contaminação ou mesmo perda de nutrientes, que pode não ser facilmente detectada.

Outros cuidados devem ser tomados em relação à aquisição do alimento para os animais. Os responsáveis pela compra de ração devem ter conhecimento que não é benéfico submeter os animais a variações bruscas de alimento. Na hora de selecionar um fornecedor de ração, devem ser considerados os procedimentos de fabricação do produto, seu transporte, bem como o controle de qualidade que garanta o padrão final do alimento a ser adquirido.

2.2.1.3 Água

Água potável, fresca e limpa deve ser oferecida à vontade, exceto quando a proposta em estudo não permita. O monitoramento da qualidade da água é um importante aspecto do programa de pesquisa, uma vez que a contaminação e composição química da água podem afetar os resultados dos estudos com animais.

Métodos disponíveis para remover tanto agentes microbianos quanto contaminação química da água inclui: autoclavação, acidificação, cloração, osmose reversa, ultrafiltração, filtração e luz ultravioleta. Contudo, alguns destes métodos podem alterar a função imunológica e a taxa de crescimento do modelo biológico utilizado.

O padrão mínimo para água dos animais deve ser água potável, ou seja, água que não ofereça riscos à saúde e que atenda ao padrão de potabilidade (Portaria Nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011/MS) deve estar disponível com livre acesso para todos os animais, exceto quando a proposta do estudo exija condição diferenciada. Entretanto, deve ter sido avaliado e aprovado pela CEUA da instituição.

Deve haver registro de fornecimento de água fresca aos animais, como também de higienização dos bebedouros e bicos de acordo com os POPs institucionais.

Os bebedouros devem permitir a observação da limpeza e nível da água; suportar a esterilização e ter um formato de boca larga para permitir uma boa higienização. Os bebedouros devem ser sempre substituídos por limpos e com água fresca e não completados. O fornecimento de água aos animais quase sempre acompanha a mesma frequência de troca das gaiolas. Não se recomenda completar a água das mamadeiras, pois esta prática exige um controle muito rígido para que não se cometa contaminação cruzada.

Bebedouros automáticos são equipamentos econômicos, mas, se não forem adequadamente projetados, são difíceis de ser desinfetados e podem promover contaminação cruzada.

2.2.2 Modificação da ingestão de alimento e água

Conforme já relatado, os animais devem ter acesso irrestrito e fácil a uma dieta nutricionalmente balanceada e água de qualidade. Em alguns protocolos de pesquisa, o valor nutricional da ração é modificado qualitativa ou quantitativamente; ou o período de acesso ao alimento ou à água é alterado.

Compete a CEUA institucional avaliar cada um destes protocolos e, mediante consistente justificativa científica, considerar pertinente, ou não, uma vez que estas condutas podem causar efeitos adversos à saúde e ao bem-estar dos animais.

2.2.2.1 Restrição alimentar

Animais se alimentam em busca de suas necessidades de energia e nutrientes e podem gastar boa parte do seu tempo comendo, caso não haja outros estímulos (enriquecedores ambientais) no seu ambiente. Porém, quando não há restrição de acesso, algumas espécies ou indivíduos podem comer além de suas necessidades fisiológicas. O acesso irrestrito ao alimento permite um desenvolvimento corporal normal, mas pode diminuir a longevidade, aumentar a incidência de doenças degenerativas e neoplasia e, por vezes, aumentar o risco de obesidade.

O controle da disponibilidade de alimento para o animal pode ser simulada, tendo em conta a disponibilidade variável de alimento que ocorre na natureza. Como mencionado anteriormente, a redução da ingesta pode aumentar o tempo de vida e reduzir a incidência de obesidade e algumas doenças nos animais. Por outro lado, a restrição calórica pode também estressar e reduzir a taxa de crescimento em animais jovens e perda de peso corporal nos adultos. Estes problemas poderão ser mais acentuados se o alimento for de baixa qualidade nutricional ou desbalanceado. A restrição alimentar, em conjunto com outros fatores estressantes, pode estar associada às ulcerações gástricas em ratos e à morte em camundongos, sendo, portanto, motivo de sofrimento e baixos níveis de bem-estar. É importante lembrar que, ao calcular a quantidade de alimento que será disponibilizada durante a restrição alimentar, deve-se considerar que em torno de 40% da quantidade de consumo diário, hídrico e alimentar, dos roedores é desperdiçada e não ingerida por eles.

Períodos de privação total de alimentos (jejum) podem prejudicar a saúde e o bem-estar dos animais. A duração do jejum precisa ser justificada em um contexto científico específico da espécie, condição fisiológica e de saúde dos animais envolvidos. Para o uso científico ou didático, portanto, qualquer período de privação de alimento proposto para o animal deve ser avaliado cuidadosamente, quando submetido à apreciação da CEUA.

2.2.2.2 Restrição de líquidos

A ingestão de líquidos é influenciada pela sede, tipo de dieta, disponibilidade de líquido entre outros. A restrição de líquidos pode aumentar o risco de desidratação e ingestão reduzida de alimentos. Uma redução aguda de ingestão hídrica pode resultar em rápida perda de mais de 15% de peso corpóreo, sede, secura das membranas da mucosa, produção reduzida de urina, redução de consumo alimentar, perda da elasticidade da pele, letargia, choque e colapso cardiovascular. A desidratação é uma complicação comum que pode não ser reconhecida facilmente em seu estágio inicial sem um monitoramento cuidadoso e funcionários capacitados.

Alguns estudos restringem a ingestão de líquidos antes da anestesia ou transporte. Da mesma forma mencionada para privação de alimento, a privação hídrica precisa ser determinada dentro de um contexto científico específico, de acordo com a espécie, o estado fisiológico e de saúde do animal envolvido, o que não se justificaria para o uso do procedimento no ensino. Para o uso científico ou didático, o procedimento deve ser avaliado cuidadosamente pela CEUA.

Estratégias de controle de dor e distresse devem ser utilizadas quando a disponibilidade de ração ou a água forem alteradas em animais. Estas estratégias incluem o controle da desidratação, diminuição de crescimento e perda de peso. Se estas observações não fizerem parte da proposta do estudo, medidas de controle e prevenção devem ser adotadas.

2.2.2.3 Modificação de comportamento alimentar ou hídrico

Alimento ou líquido pode ser usado como recompensa, mesmo para animais bem alimentados. Muitas vezes, entretanto, os animais precisam estar com fome ou sede para trabalhar ou realizar uma tarefa para receber alimento ou água como recompensa. Em todos os casos onde o pesquisador possa causar impacto sobre a ingestão de água e alimento, uma justificativa científica, circunstanciada, deve ser fornecida à CEUA, para submeter o protocolo à aprovação. O procedimento não se aplicaria ao uso no ensino, apenas ao uso científico.

2.2.3 Manejo

O manejo dos animais em instalações destinadas à produção de roedores e lagomorfos deve ser descrito em procedimentos claros e acessíveis a todos os funcionários que lidam com a produção. São várias as atividades ligadas diretamente à produção e manejo, apesar de serem comuns a todas as espécies (camundongo, cobaia, coelho, hamster e rato), são realizadas em intervalos diferenciados, obedecendo ao ciclo biológico e comportamento específico de cada espécie. Fundamentalmente, em uma produção, temos as principais atividades: acasalamento, desmame, sexagem, reposição de reprodutores e a troca das gaiolas. É imprescindível que todas as atividades de produção estejam estabelecidas em POPs, descritas de forma clara e com suas frequências definidas. Também é desejável o registro das atividades.

Conhecer profundamente as espécies que se está manejando é fundamental para um bom manejo e manutenção de bons níveis de bem-estar animal. Os funcionários devem conhecer o comportamento e biologia dos animais para minimizar as situações de estresse e promover situações que gerem estímulos prazerosos. O manejo etológico é o que leva em consideração o comportamento dos animais, sua biologia e o controle de elementos estressores, para desempenhar as atividades ou manejo necessário com os animais, e deve ser aplicado em todas as formas de manipulação e manejo.

O quadro a seguir apresenta a idade mais usual para acasalamento e desmame de camundongo, cobaia, coelho, hamster e rato.

Idade ou Peso					
Atividade	Camundongo*	Cobaia**	Coelho***	Hamster****	Rato*****
Acasalamento	55 a 60 dias 25 a 30g	45 a 55 dias 400 a 480g	150 a 180 dias 3.5 a 4 kg	50 a 60 dias 85 a 150g	90 dias 250 a 400g
Desmame	21 dias 10 a 12g	14 dias 180 a 200g	30 a 45 dias 800 a 1000g	21 dias 35 a 40g	21 dias 45 a 50g

*Camundongo Swiss; **Cobaia Inglesa; *** Coelho New Zealand White; **** Hamster Sírio; *****Rato Wistar, todos heterogênicos.

O padrão genético do animal pode alterar os parâmetros apresentados para peso e idade de acasalamento e desmame. Animais isogênicos (inbred), mutantes ou modificados, podem necessitar de condições diferenciadas de manejo. No manejo mais usual de isogênicos, já ao desmame, formam-se os casais entre irmão, com o objetivo de facilitar o manejo e minimizar espaço e quantidade de gaiolas. Entretanto, há instituições que definem o manejo de desmame de isogênicos da mesma forma dos heterogênicos (outbred) e posteriormente juntando-os para o acasalamento. Esta prática exige mais cuidados com os dados das fichas para evitar possíveis perdas de dados.

Animais que apresentem distúrbios que acarretem limitações de aleitamento devem contar com a ajuda de outra nutriz, como ferramenta de manejo, que garanta a sobrevivência da ninhada.

No desmame também ocorrem algumas particularidades, dependendo da espécie, ou mesmo da característica da linhagem.

Adotou-se dizer que o desmame ocorre aos 21 dias de idade, para ratos e camundongos, em sistemas intensivos. Esta afirmação se torna obrigatória quando a fêmea que aleita vai parir uma nova ninhada e a ninhada anterior permanece na gaiola. Não deve ser aceito duas ninhadas da mesma fêmea na mesma gaiola.

Isso não se aplica para todas as espécies. No caso de cobaias, o desmame ocorre quase sempre pelo parâmetro do peso, essa espécie nasce com uma maturidade diferente das demais (camundongo, rato, coelho e hamster), ou seja, nasce com pelos, olhos abertos, andam e apresentam dentes aptos a roer imediatamente ao parto. Portanto, 21 dias de idade, torna-se um período muito longo.

No momento do desmame, os animais heterogênicos ou animais isogênicos, que serão destinados diretamente aos usuários, devem ser separados por sexo (sexagem), alojados em gaiolas distintas (machos e fêmeas), identificadas e acomodadas nas salas ou estantes de estoque de animais, onde são mantidos, aguardando sua utilização. Existem algumas particularidades, como quando os animais são destinados aos usuários antes do desmame, como nos casos de fornecimento de recém-nascidos para alimentação de outros animais ou para inoculação de amostras biológicas provenientes de animais silvestres com suspeita de serem portadores e/ou transmissores de vírus. Nesse caso, os animais lactentes são acompanhados de suas mães.

Cuidado especial deve ser dado ao fornecimento de animal que não consegue se alimentar sozinho, ou seja, na condição de lactente. Quando do fornecimento de animais lactentes desacompanhados de suas mães, o usuário deve estar preparado para receber os lactentes e imediatamente proceder a utilização dos mesmos.

Acasalamento é uma atividade frequentemente realizada nas instalações destinadas à produção de animais, sua realização requer um conhecimento prévio do padrão genético do animal a ser acasalado, da necessidade de reposição de reprodutores e da demanda de animais fornecido aos usuários.

O acasalamento de colônias de animais outbred deve seguir esquemas que evitem o cruzamento de indivíduos aparentados, como o esquema rotacional de Poiley ou Han rotacional. Essas colônias devem ser grandes o suficiente (mais de 100 casais ou unidades reprodutivas poligâmicas) para assegurar por muitos anos a heterozigose genética dos animais. Colônias pequenas devem utilizar métodos específicos de acasalamentos que garantam menos de 1% de consanguinidade. Mesmo nas grandes colônias essa preocupação deve existir com o passar de muitos anos.

O acasalamento de animais isogênicos acontece entre irmãos. Quando suas progênes F1 forem usadas, é importante monitorar periodicamente a autenticidade genética.

Acasalamentos de animais geneticamente modificados (AnGM), requerem condições especiais de manejo de suas populações. Estratégias de reprodução cuidadosamente desenhada e assessoramento genotípico devem ocorrer sempre, com o objetivo de minimizar a possibilidade de animais com genótipos indesejáveis. O trabalho com AnGM requer autorização da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio).

Os acasalamentos podem ser monogâmico, 1 macho para 1 fêmea (1:1), poligâmico 1 macho para duas fêmeas(1:2), ou mais, sempre respeitando-se as recomendações de espaço. No caso de produção de cobaias, é muito usual o sistema de harém 1 macho para até 5 fêmeas, o que não é considerado errado, desde que o espaço dedicado a esse arranjo esteja dentro do estabelecido no Capítulo “Estrutura Física e Ambientes para Roedores e Lagomorfos”.

Para cobaia, utiliza-se: o método Poiley, sistema poligâmico, harém intensivo (1 macho para 5 fêmeas), respeitando-se o espaço recomendado para a espécie.

Para coelhos, aplica-se o método Poiley, sistema poligâmico temporário. Nessa espécie, o pareamento dos animais só ocorre para a cópula, quando a fêmea deve ser levada à gaiola do macho e após a cópula, removida para a sua gaiola. A proporção de machos para fêmeas deve ser mantida em torno de 1 macho para 5 fêmeas, porém, os animais são mantidos separados.

Hamsters são acasalados quase sempre em sistemas monogâmicos intensivos, devido ao comportamento mais agressivo dessas fêmeas a poligamia não apresenta bons resultados no caso de animais outbred. Há relatos de sucesso usando poligamia com hamster inbred, mas mesmo nas linhagens com fêmeas menos agressivas, faz-se necessário a separação do macho quando da certificação da preñez e sua volta no momento do desmame dos filhotes.

2.2.3.1 Identificação

Os registros dos animais devem constar nas etiquetas, (cartões, fichas) fixados na gaiola. Entretanto, outro tipo de registro, como livros ou planilhas computadorizadas, sempre atualizadas, que resumam a disponibilidade de animais na instalação de produção, é requerido. O segundo registro é importante devido à constante manipulação das gaiolas e fragilidade das etiquetas, que pode acarretar na perda das informações. Nas fichas das gaiolas dos reprodutores, devem constar dados como: espécie, linhagem, data de nascimento, dados dos pais, sexo, data do acasalamento, data dos partos, números de nascidos, números de mortos, data de desmame e quantidade de filhotes desmamados. Animais em salas de estoque (manutenção) também necessitam de fichas com os dados de data de desmame, sala de origem, sexo e quantidade de animais por gaiola. Quando do recebimento dos animais pelos usuários, mais dados podem ser acrescentados à ficha dos animais, como: data de recebimento, nome do pesquisador responsável pelo animal, número do protocolo que requisitou, entre outros.

Além das fichas nas gaiolas, pode-se ter vários outros tipos de informações individuais dos animais, que são importantes para a gestão da instalação de produção, tais como: identificação do genótipo, para acompanhar cruzamentos, dados sobre a saúde animal, registros médicos e dados de pesquisa.

Existem vários métodos disponíveis para a identificação de roedores, incluindo furos na orelha, brincos, tatuagens,

marcação com tinta, microchips subcutâneos. Todos os métodos têm vantagens e desvantagens, a escolha do método depende do nível de exigência da proposta de estudo, da viabilidade financeira e do animal a ser identificado e da aprovação da CEUA institucional. Entretanto, métodos como furo na orelha e tatuagem devem ser realizados em animais com até três semanas de idade, sem anestesia e, posterior a isto, apenas com o animal anestesiado. Quando o procedimento de genotipagem estiver estabelecido, o tecido resultante da perfuração da orelha deve ser usado para esse fim. Para marcação com tinta, deve ser usado tinta atóxica e sem cheiro.

2.2.4 Troca

Assim denomina-se a atividade de transferência dos animais de uma gaiola onde estavam (gaiola suja) para nova gaiola (gaiola limpa). Esta tarefa não deve ser um ato mecânico e, sim, um momento para aplicação do manejo etológico e de observação do animal, uma vez que é na troca que se percebe alterações no estado de saúde do animal (Olsson et al., 2003).

A frequência da troca é uma consequência da estrutura física da instalação onde estão mantidos os animais, do material oferecido para cama, número de animais na gaiola e estado fisiológico desses animais. Em gaiolas abertas com uma boa renovação de ar (10 a 20 trocas de ar por hora), em sistemas de acasalamentos poligâmicos, pode ser realizado duas trocas por semana; nos microisoladores, com animais em acasalamentos monogâmicos e bom material de cama, a frequência pode chegar de 10 a 14 dias sem troca. Tudo depende da capacidade do sistema de trocas de ar de cada equipamento, mas o objetivo é um só: diminuir o teor de amônia dentro das gaiolas dos animais e a manutenção do bem-estar. Animais diabéticos ou com outras alterações fisiológicas específicas podem requerer frequência de trocas especiais.

Chamamos de cama ou forração o material usado para forrar o interior das gaiolas. Este insumo é de extrema importância, devido à sua proximidade com os animais. No Brasil, o produto mais usado para forração é a maravalha (produto resultante da raspa de madeira), mas existe um subproduto do sabugo de milho, que reduz o acúmulo de amônia no interior das gaiolas. Como regra geral, a forração deve ser macia, absorvente, atóxica e inodora. Recomenda-se a esterilização da forração, seja por autoclavação, seja por irradiação.

O critério para estabelecer a quantidade de forração colocada em cada gaiola deve ser que essa seja suficiente para absorver os excrementos eliminados pelos animais no período entre as trocas, com o cuidado de não interferir na movimentação dos animais na gaiola, mas permitir que desenvolvam tipos específicos de comportamento, como esconder-se e confeccionar ninho.

O fornecimento de verde (capim, feno, hortaliça, etc.) é bem visto, como item de enriquecimento alimentar ou como fonte de alimento, sendo mais usual em áreas de produção de coelhos e cobaias. Esse tipo de fornecimento requer um difícil processo de desinfecção que deve ser descrito em POP.

Programas de enriquecimento ambiental devem ser bem elaborados, considerando a biologia do animal, o espaço físico disponível na gaiola e permitir uma higienização, seja química ou por autoclavação. Seu fornecimento pode acompanhar a troca das gaiolas.

2.2.5 Área de higienização

Na área de higienização, também chamada área de lavagem, “pulsa o coração da instalação de produção”, pela característica de seus procedimentos, é a área mais sujeita a pressões, e, se tudo ocorre nas condições previstas, grande parte dos problemas está resolvido.

As gaiolas e os bebedouros trocados na área de produção são enviados para essa área, onde devem seguir uma sequência de processos até o seu retorno à área dos animais. Portanto, é imprescindível que esse espaço esteja separado, isolado e o mais distante possível das salas de animais.

Um programa de higienização deve ser estabelecido com o objetivo de reduzir ou eliminar as formas vegetativas de bactérias patogênicas e oportunistas, bem como outros organismos que possam ser controlados antes da esterilização. A lavagem é mais efetiva quando realizada com água aquecida com temperatura entre 75 a 85o C, acompanhada de produtos químicos, que atendam essa finalidade.

Na lavagem manual deve ser atribuída atenção especial às etapas de molho e enxague, etapas que podem interferir diretamente no bem-estar animal. A etapa de molho requer uma diluição e um tempo de ação do produto adequados, que devem seguir a orientação do fabricante. A etapa de enxágue deve ser bem realizada para evitar a presença de resíduos do produto químico utilizado.

O ideal é a lavagem em máquinas que têm auto dosador, ou seja, regula a quantidade de sanitizante de acordo com a quantidade de água utilizada. Após o processo de lavagem e desinfecção, os recintos primários (gaiolas) devem ser esterilizados, de preferência, em autoclaves e esses devem ser certificados para garantir segurança.

Após a lavagem dos utensílios, eles devem ficar sobre estrados plásticos para que escorram o excesso de água e, posteriormente, devem ser levados às autoclaves para serem esterilizados. Para remoção de alguma sujeira depositada nos bicos, usa-se o ultrassom, ou método mecânico que seja efetivo. Tanto os bicos quanto as rolhas devem ser lavados e esterilizados por autolavagem, antes de retornarem aos animais.

Independentemente do processo de higienização ser automático ou manual, é imprescindível que sua eficácia seja testada. Quando automatizado, deve ocorrer a validação do processo de higienização e a certificação do equipamento, de acordo com instruções do fabricante ou da Garantia da Qualidade envolvida no processo. Quando manual, deve ser realizado monitoramento por meio de cultura microbiológica ou ainda por meio de sistemas de detecção de material orgânico.

Limpeza e desinfecção do ambiente secundário (salas e espaços de apoio) devem seguir um planejamento de limpeza para todas as áreas da instalação, ou seja, um procedimento onde se descreve como será realizada a limpeza, seu fluxo, frequência, tipos de produtos que serão usados, entre outros detalhes inerentes à particularidade da atividade exercida.

A frequência de limpeza, como já mencionado no item troca, também será uma consequência da estrutura física, sistema de ar, material oferecido para cama, número de animais na gaiola, estado fisiológico desses animais e imposições do projeto científico.

Todas estas atividades devem constar nos Manuais de procedimento, POPs, descrevendo o passo a passo e serem registradas em seus respectivos protocolos, concluindo, desta forma, o ciclo de atividades necessárias à produção de animais de laboratório e permitindo a rastreabilidade de todo processo.

2.2.6 Segurança do Operador

Os operadores que realizam as múltiplas atividades descritas neste Capítulo devem usar Equipamento de Proteção Individual (EPI) adequado ao desempenho da atividade, bem como, quando necessário, o ambiente

deve contemplar Equipamentos de Proteção Coletiva (EPC). O responsável pela unidade, de acordo com o PPRA (Programa de Prevenção de Riscos Ambientais - NR 9/MT ou outra que a substitua), deve requerer ao diretor institucional os EPIs e EPCs adequados a cada atividade. Esses equipamentos de proteção devem constar no respectivo POP de cada atividade ou no manual de procedimento. Salientamos que todos os operadores devem estar com carteira de imunização atualizada, conforme determinado pelo PCMSO (Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional (NR 7/MT ou outra que a substitua) e PPRA.

2.2.7 Descarte de Materiais

Os resíduos são classificados em função dos riscos potenciais ao meio ambiente e à saúde, como também da sua natureza e origem (ABNT NBR 10.004/2004 ou outra que a venha substituir). Os resíduos ainda são classificados em função de suas características específicas, cujo manejo demanda cuidados e métodos especiais de coleta, transporte e destinação final. Nesse grupo, estão compreendidos os Resíduos de Serviço e Saúde (RSS), os quais são resultantes de atividades exercidas nas atividades relacionadas com o atendimento à saúde humana ou animal, assim como estabelecimentos de ensino e pesquisa na área de saúde, entre outros (RDC 306 ANVISA, 2004 ou outra que a venha substituir). Portanto, todo estabelecimento que gera RSS deve elaborar um Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde - PGRSS, baseado nas características dos resíduos gerados e na classificação constante do Apêndice I (RDC 306 ANVISA, 2004 ou outra que a venha substituir), obedecendo diretrizes de manejo dos RSS. O PGRSS a ser elaborado deve ser compatível com as normas locais relativas à coleta, transporte e disposição final dos resíduos gerados nos serviços de saúde, estabelecidas pelos órgãos locais responsáveis por estas etapas (RDC 306 ANVISA, 2004 ou outra que a venha substituir).

2.2.8 Cuidados de Fins de Semana e feriados

Deve haver uma programação definida para cuidados dos animais nos fins de semana e feriados, com escala dos funcionários, uma vez que os animais devem receber o tratamento devido diariamente. Planos de contingência e de emergência compatível com o nível de atividade da unidade são imprescindíveis. Devem ser previstas situações, como falta de energia elétrica, falta de água fundamentalmente para bebedouros automáticos e situações não previstas, como atentados e invasões. Telefones de contatos dos médicos veterinários, dos responsáveis pela unidade devem constar nas instalações, como também no departamento de segurança da instituição.

III - PROCEDIMENTOS DE COLETA DE FLUÍDOS CORPORAIS, SECREÇÕES E EXCREÇÕES.

Neste tópico, apresentamos as principais atividades realizadas nos projetos de pesquisas as quais devem acontecer em ambiente diferente das áreas de produção de animais, como consta no Capítulo “Estrutura Física e Ambientes para Roedores e Lagomorfos”.

Amostras biológicas (fluidos corporais, secreções e excreções) são coletadas do animal para análise de alterações bioquímicas, metabólicas, toxicológicas, imunológicas e fisiológicas. A coleta de sangue é uma ferramenta científica valiosa que permite o monitoramento, de uma forma dinâmica, de diversos eventos biológicos. Seja qual for a amostra a ser coletada, deve-se levar em conta o manejo etológico para o uso da imobilização adequada, para diminuir o tempo de contenção, de coleta e de estresse. O ideal é que a amostra seja colhida de forma asséptica e todo cuidado deve ser tomado para evitar a contaminação cruzada de amostras.

3.1 Procedimentos de coleta:

3.1.1 Urina

A análise da urina permite o monitoramento da presença, ausência e concentração de drogas e outras substâncias excretadas. Essa análise pode ser quantitativa ou qualitativa. A análise quantitativa de urina permite o monitoramento de pH urinário, proteína, glicose, bilirrubina, hemoglobina, cetona, urobilinogênio, creatinina e a concentração de drogas excretadas, metabólitos e outras substâncias. A análise qualitativa de urina é geralmente usada para monitorar função renal, doença renal, avaliação de anormalidades nutricionais e/ou endócrinas e a excreção de drogas e/ou metabólitos.

A urina pode ser coletada de diversas formas: micção do animal consciente; via catéter urinário, mediante anestesia geral, cistocentese, com o uso de gaiola metabólica, entre outras.

3.1.2 Secreção nasal

Secreções nasais e amostras da conjuntiva são geralmente coletadas para análise de agentes bacterianos ou outros agentes infecciosos. As amostras devem ser colhidas com um swab estéril umedecido, mantidas sob refrigeração e analisadas prontamente. Dependendo da espécie, anestesia leve pode ser necessária, ao colher secreções nasais, para minimizar o desconforto do animal e para obter amostra não contaminada.

3.1.3 Secreção ocular

Amostras conjuntivais devem ser colhidas com um algodão estéril, gaze ou cotonete de dracôn, umedecido. O cotonete deve ser sempre manuseado de forma estéril, mantido em meio de cultura, refrigerado e enviado para o laboratório sem demora.

3.1.4 Material bucal

Amostras de saliva podem ser utilizadas em estudos do sistema imune secretor e do sistema digestivo, para medir cortisol de forma relativamente não invasiva e para detectar sinais de doença infecciosa. Raspagens da mucosa oral são utilizadas como uma fonte de DNA e em estudos virológicos. Dependendo da espécie, a coleta de saliva mista da cavidade oral pode ser simples e não invasiva. Anestesia leve pode ser necessária em alguns casos, por exemplo, quando o animal não consiga ser contido adequadamente.

3.1.5 Leite

Amostras de leite são colhidas após a limpeza e secagem da(s) teta(s), evitando-se o uso de antissépticos. As primeiras gotas de leite devem ser descartadas antes que a amostra seja coletada.

3.1.6 Fezes

Exames de fezes podem ser qualitativos ou quantitativos. Pequenos volumes são necessários para estudos qualitativos e são coletados do piso da gaiola ou diretamente do reto no animal imobilizado. Estudos quantitativos requerem que todas as fezes sejam coletadas ao longo de um período de tempo determinado (normalmente 24 horas). Uma gaiola metabólica é o método usual.

3.1.7 Secreção do trato genital

Amostras de secreções vaginais devem ser retiradas com uma gaze de algodão, um cotonete de algodão ou lavado vaginal, de modo estéril, e aplicado suavemente na região vaginal, para minimizar desconforto ao animal. Amostras para identificação da fase do ciclo estral são examinadas sob o microscópio imediatamente. Atenção especial deve ser dada ao tamanho da fêmea, o cotonete utilizado para coleta deve ter uma relação proporcional à dimensão do canal vaginal da fêmea que será usada.

3.1.8 Sêmen

Os métodos de coleta de sêmen incluem monta natural e coleta na fêmea, eletroejaculação sob anestesia e coleta após eutanásia. Os métodos são espécie-específicos e causam estresse em muitas espécies.

3.1.9 Sangue

Sangue é coletado de um animal para análise e monitoramento cuidadoso de padrões bioquímicos, metabólicos, toxicológicos, imunológicos e fisiológicos. Orientações para a coleta segura de sangue devem considerar o fato de que todas as espécies têm a mesma relação entre volume de sanguíneo e peso corporal. Animais jovens, idosos, estressados, portadores de doença cardíaca ou respiratória ou mesmo submetidos a manipulações exigem cuidadoso monitoramento, pois são mais sensíveis à perda de sangue. A técnica de contenção do animal e o procedimento de coleta podem alterar alguns padrões bioquímicos do sangue devido ao estresse. É importante habituar o animal ao executor do procedimento e ao procedimento antes de sua realização. Isto pode reduzir o estresse envolvido e gerar resultados mais precisos. O treinamento do executor é fundamental para o sucesso do procedimento e faz parte do refinamento proposto pelo Princípio dos 3R's.

O volume de sangue circulante pode geralmente ser estimado em média como 55-70 mL/Kg do peso corpóreo em animais saudáveis ou 6-8% do peso corpóreo. Animais velhos e obesos podem ter uma redução de 15% no volume de sangue circulante.

O volume máximo recomendado para coleta de sangue é de 10% do volume de sangue circulante em animais saudáveis e bem nutridos, observando um período mínimo de recuperação de 3-4 semanas. A remoção de volumes maiores de sangue é perigosa para a saúde do animal. A remoção de 15% a 20% do volume do sangue induz redução do débito cardíaco e da pressão sanguínea. A remoção de 30-40% pode induzir choque hipovolêmico e morte. Para coletas repetidas, pode ser removido o volume máximo de 1% do sangue circulante do animal, a cada 24 horas.

3.2 Considerações gerais para minimizar os efeitos adversos da coleta de fluidos corporais, secreções e excreções para orientar a seleção dos métodos:

Quando amostras forem retiradas de um animal consciente e o procedimento de amostragem for repetido regularmente durante uma pesquisa, o animal deve primeiramente ser aclimatado ao instrumento de imobilização (ex.: por meio de execuções simuladas).

Uma equipe treinada adequadamente, utilizando métodos que gerem o mínimo de dor, deve realizar a coleta de amostras biológicas.

Quanto mais rápido o procedimento for realizado no animal consciente, melhor será a qualidade das amostras, porque as alterações fisiológicas induzidas por estresse são minimizadas.

A utilização de sistema de recompensa ao coletar amostras de um animal consciente deve ser considerada. Quando o procedimento de amostragem for repetido regularmente durante uma pesquisa, o sistema de recompensa pode favorecer uma associação positiva.

O treinamento do executor é fundamental para o sucesso de todos os procedimentos e faz parte do refinamento proposto pelo Princípio dos 3R's.

Importante a aplicação do manejo etológico para todos os procedimentos de manuseio dos animais.

É importante manter a assepsia ao longo da coleta e os produtos utilizados para a assepsia devem ser subsequentemente removidos para evitar a contaminação da amostra. Aplicação tópica de cremes anestésicos, quando apropriada, aliviará significativamente qualquer desconforto associado à punção venosa.

Os pesquisadores devem, antes de imobilizar o animal, preparar todos os equipamentos e materiais necessários para diminuir ao máximo o tempo de contenção.

3.3 Considerações importantes para a coleta de sangue:

O executor da coleta deve ter capacitação adequada para realizar a atividade naquele animal;

Não se deve puncionar um sítio que apresente inflamação ou hematoma;

Sempre que possível, deve-se usar técnicas de canulação para coleta de amostras múltiplas.

Locais de coleta de sangue e recomendações para roedores e coelho estão descritos na **Tabela 1A**.

Tabela 1A: Recomendações de locais de coleta de sangue para roedores e coelho.

Via	Veia auricular	Amputação da cauda**	Veia caudal	Sinus retro orbital*	Veia jugular	Punção cardíaca*	Veia facial	Veia safena
Cobaia	-	-	-	-	+	terminal	-	++
Hamster	-	-	-	+	+	terminal	-	++
Camundongo	-	+++	++	+	-	terminal	+++	+++
Coelho	+++	-	-	-	+	terminal	-	+
Rato	-	-	+++	-	+	terminal	++	++

- não recomendado; + via possível; ++ via aceitável; +++ via de preferência; * somente sob anestesia; ** Somente sob anestesia.

O método, volume e frequência da coleta devem também levar em consideração fatores associados ao bem-estar do animal. As principais consequências da coleta de sangue que podem afetar o bem-estar do animal são: perda excessiva de sangue, trombose, hematomas e inflamação do vaso.

Os efeitos da perda crônica de sangue são mais discretos que aqueles oriundos da perda de sangue aguda. Esses sinais incluem palidez das mucosas, atividade reduzida, aumento na frequência respiratória e presença de extremidades frias. A perda da massa muscular e diminuição do peso corporal também são observados nos casos de perdas crônicas.

Pequenos volumes removidos frequentemente podem causar anemia. Sempre quando possível, é recomendada a reposição de fluidos após coletas de sangue. O recomendado é a reposição de duas vezes o volume retirado por fluidos isotônicos, preferencialmente solução Ringer Lactato.

O aquecimento suave da cauda de camundongos e ratos (recomenda-se envolver a cauda com algodão embebido em água aquecida ou mergulhada em recipiente com água na temperatura adequada), reduzirá o tempo de retirada do sangue e conseqüentemente o estresse associado. Entretanto, uma imobilização inadequada prolongará o tempo de retirada de amostras, aumentará os riscos para o animal e reduzirá a qualidade das mesmas.

Quando coletas múltiplas são necessárias, deve-se alternar o local da coleta.

IV- VIAS DE ADMINISTRAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS

Descrever todas as vias de administração está além do escopo deste documento. Portanto, a ênfase é dada na descrição dos procedimentos mais usuais e aos seus refinamentos.

O procedimento de administração de substâncias pode causar impacto no bem-estar do animal e na validade dos resultados. A experiência, o treinamento, a habilidade da pessoa que administra a aclimatação e o treinamento são aspectos de refinamento que devem ser considerados durante o planejamento de um projeto científico ou didático.

A via escolhida na administração de substâncias testes estabelecerá limites no volume a ser administrado e influenciará na sua biodisponibilidade. As exigências do estudo e o risco potencial aos animais serão fatores-chave na seleção da via.

Treinamento é um pré-requisito fundamental para realização de procedimentos de administração de substâncias. O pessoal que realiza esses procedimentos deve ser experiente e capacitado.

As vias de administração mais utilizadas são descritas a seguir.

4.1. Principais vias de administração de substâncias

4.1.1 Via oral (VO)

Respeitadas as propriedades físicas e químicas, as substâncias podem ser administradas pela água de beber, no alimento ou através da administração orogástrica (gavagem), na qual a substância é introduzida pela boca e depositada diretamente no estômago.

A gavagem permite a administração da dosagem exata. Uma sonda flexível de polietileno, ou uma cânula rígida de aço inoxidável com extremidade arredondada, é cuidadosamente introduzida na boca do animal, passando pelo esôfago e chegando ao estômago, onde o material é dispensado.

A gavagem é o método mais preciso dentre os procedimentos por administração oral. Porém, poderá representar um risco para o bem-estar do animal, por ser mais invasivo. Neste método, o volume da substância que pode ser administrado com segurança, bem como as dimensões do aparato de gavagem, depende do tamanho do animal. Como referência, o volume máximo dado por gavagem é 10 mL/kg de peso corpóreo.

A administração pela água de beber ou no alimento deve ser feita com acompanhamento da ingestão desses. É possível que a substância a ser administrada modifique as propriedades organolépticas, levando à alteração no padrão de consumo de água ou ração e impactar negativamente o bem-estar animal e/ou o resultado.

4.1.2 Via intravenosa (IV)

É a via em que há a introdução da medicação diretamente na corrente sanguínea e que permite a mais rápida ação do fármaco administrado. Nas espécies em que as veias podem ser acessadas através da pele (percutaneamente), deve ser utilizado um anestésico local, como um creme, aplicado na pele no local proposto. De acordo com as características das substâncias, elas podem ser administradas rápida ou lentamente. Nas administrações de substâncias e seus veículos por via parenteral, devem ser considerados os seguintes fatores: o volume usado, a estabilidade da formulação, pH, viscosidade, osmolaridade, capacidade de tamponamento, esterilidade e biocompatibilidade da formulação. Devem ser usados tamanhos e calibres de agulhas compatíveis com a espécie animal, considerando-se o calibre do vaso sanguíneo e a velocidade da injeção.

4.1.3 Via intraperitoneal (IP)

A via intraperitoneal é comumente usada em ratos e camundongos, mas pode ser utilizada em outras espécies. Não é necessária anestesia e a injeção é feita no quadrante abdominal inferior do lado direito do animal. Embora injeções IP pareçam seguras, há risco em puncionar o trato intestinal por dificuldade de contenção do animal. Não são indicadas para múltiplas doses e materiais irritantes podem causar peritonite.

4.1.4 Via subcutânea (SC)

A via subcutânea é comumente usada em todas as espécies. As soluções devem ter pH fisiológico e ser isotônicas. As injeções são feitas normalmente no dorso, na nuca ou flanco. O animal não necessita ser anestesiado. A absorção dessa via é lenta, especialmente para soluções oleosas. Nas administrações de doses múltiplas, recomenda-se a alternância do local de administração.

4.1.5 Via Intramuscular (IM)

O sítio mais utilizado nesta via é o músculo bíceps femoral da coxa. Entretanto, a escolha deve considerar a possibilidade de dano às terminações nervosas. A absorção desta via é lenta. Para estudos com múltiplas doses, recomenda-se fazer uma rotação dos sítios. A administração intramuscular pode ser dolorosa porque as fibras estão obrigatoriamente sob a tensão do material injetado.

Outras vias de administração também podem ser acessadas, tais como intra-auricular, transdérmica, intradérmica, intratecal e intraocular. Quando necessária administração contínua de substâncias, pode ser feita utilizando-se implante subcutâneo, minibomba osmótica ou cateter venoso de permanência.

Tabela 1B – Métodos e vias comuns de administração de substâncias nos roedores e lagomorfos (sítio de administração, máximo de volume aceito e tamanho da agulha)

Tabela 1B: – Métodos e vias comuns de administração de substâncias nos roedores e lagomorfos (sítio de administração, máximo de volume aceito e tamanho da agulha)

Espécies	Subcutâneo	Intramuscular	Intraperitoneal	Intravenoso
Camundongo	Dorso-cervical, 2-3 mL, Agulha com calibre < 20 G	Músculo quadríceps/coxa, 0,05 mL, Agulha com calibre < 23 G	Quadrante abdominal inferior direito-2-3 mL, Agulha com calibre < 21 G	Veia lateral da cauda, 0,2 mL, Agulha com calibre < 25 G
Rato	Dorso-cervical 5-10 mL, Agulha com calibre < 20 G	Quadríceps/coxa 0,3 mL, Agulha com calibre < 21 G	Quadrante abdominal inferior direito -5-10 mL, Agulha com calibre < 21 G	Veia lateral da cauda, sublingual, peniana, jugular (incisão), femoral (incisão).0,5 mL, Agulha com calibre < 23 G
Hamster	Dorso-cervical, 3-4 mL, Agulha com calibre < 20 G	Músculo quadríceps/coxa, 0,1 mL, Agulha com calibre < 23 G	Quadrante abdominal inferior direito - 3-4 mL, Agulha com calibre < 21 G	Veia femoral ou jugular (incisão), 0,3 mL, <25 G
Cobaio	Dorso-cervical, 5-10mL, Agulha com calibre < 20 G	Músculo quadríceps/coxa, 0,3 mL, Agulha com calibre < 21 G	Quadrante abdominal inferior direito - 10-15mL, Agulha com calibre < 21 G	Veia da orelha, Veia safena, Veia peniana dorsal, 0,5 mL, Agulha com calibre < 23 G
Coelho	Dorso-cervical, 30-50 mL, Agulha com calibre < 20 G	Músculo quadríceps/coxa, Músculo lombar, 0,5-1.0 mL, Agulha com calibre < 20 G	Quadrante abdominal inferior direito -50-100 mL, Agulha com calibre < 20 G	Veia marginal da orelha, 1-5 mL, Agulha com calibre < 21 G

Fonte: Adaptado de CCAC (1993)

4.2 Cuidados a serem considerados para administração de substâncias em animais:

A substância e seu solvente líquido devem ser apropriados para a via de administração, a espécie e a finalidade científica. Soluções para injeções devem ter pH próximo de 7,0 para reduzir o risco de dano ao tecido. A ordem de tolerância para uma substância com um pH na faixa entre 4,5 e 8 é: oral>IV>IM>SC. A substância deve ser solúvel em solventes biocompatíveis padronizados. Atenção deve ser dada aos tamanhos e calibres de agulhas que devem ser compatíveis com a espécie animal.

A aclimação ao novo ambiente e treinamento para o procedimento de administração pode minimizar o distresse no animal. Esse procedimento deve ser adotado especialmente quando animais que não estão acostumados ao manuseio devem receber substâncias em mais de uma ocasião. Quando possível, recompensas (reforço positivo) devem ser utilizadas ao treinar os animais para cooperarem com o procedimento. Após receberem a dose, os animais devem ser monitorados para verificar efeitos adversos, dor e distresse.

Contaminação e infecção podem resultar da administração de substâncias indevidamente manipuladas: uso de agulhas e seringas não estéreis, transferência de infecção entre animais por uso comum de equipamentos ou introdução de micro-organismos ao perfurar a pele. A necessidade de preparação da pele deve ser avaliada para cada caso específico. A antissepsia da pele pode envolver o corte do pelo e uso de uma solução antisséptica. Em casos de inoculação de agentes infecciosos, proceder à antissepsia antes e após a inoculação.

Na administração por injeção, identificado o sítio de aplicação, a agulha deve ser inserida firmemente na posição correta e na profundidade exigida.

A lista de sinais de dor e distresse, específica da espécie, deve ser consultada no checklist de monitoramento previamente elaborado. Na tabela 2, encontram-se os procedimentos para minimizar a dor e o distresse ao administrar substâncias.

Tabela 2: Procedimento para minimizar a dor e o distresse ao administrar substâncias

Administração de uma substância nova
<ul style="list-style-type: none"> • Investigue vários métodos alternativos de administração, de forma a identificar a via mais adequada. • Investigue as propriedades físico-químicas da substância, tais como solubilidade, estabilidade, pH, grau de irritação e toxicidade. • Realize uma avaliação de riscos para a preparação e uso da substância: identifique riscos à qualidade de vida do animal e incorpore estratégias de refinamento para minimizar efeitos adversos. • Considere a avaliação in vitro de substâncias pouco estudadas, antes do estudo in vivo. • Realize um estudo piloto para a escolha do modelo animal, escolha da técnica, dose, via e frequência de administração corretos, bem como outros aspectos relativos às propriedades biológicas, como metabolismo e via de excreção da substância.
Volume da substância e a frequência de administração
<ul style="list-style-type: none"> • Investigue o uso de um solvente/veículo que seja fisiologicamente compatível e adequado para a via de administração. • Prepare uma estratégia de monitoramento adequada para o período após a administração. • Certifique-se de que a frequência de monitoramento seja adequado para detectar tanto os efeitos esperados quanto os inesperados e que haja um plano para controlar a dor e o distresse do animal.
Via de administração
<ul style="list-style-type: none"> • Use uma via adequada para administrar a substância, de modo a minimizar o impacto no animal. • Para substâncias que necessitam administração frequente, dê preferência à via oral, associando-as ao alimento ou água. • Para substâncias que necessitam administração IV frequente, considere o uso de um cateter venoso de permanência. • Para substâncias que necessitam administração SC ou IP frequente, considere o uso de uma minibomba osmótica ou um implante.
Animal
<ul style="list-style-type: none"> • Identifique a espécie, linhagem, sexo, idade, peso corporal e estado de saúde. • Aclimate o animal ao local e ao pessoal. • Treine o animal para o procedimento de manuseio e imobilização antes de iniciar estudos com administração de substâncias.

Técnica

- Realize uma avaliação de riscos para o uso da técnica e qualquer imobilização relacionada.
- Identifique riscos à qualidade de vida do animal e incorpore estratégias de refinamento para minimizar efeitos adversos.
- Identifique e trate deficiências no treinamento e no uso dos equipamentos necessários para realizar a técnica.
- Monitore o animal para os efeitos conhecidos ou inesperados, incluindo o impacto na qualidade de vida do animal.

Pessoal

- Identifique o pessoal experiente e capacitado e o pessoal com deficiências no treinamento.
- Elimine as deficiências no conhecimento e capacitação com treinamento e supervisão.
- Identifique o pessoal com responsabilidade para o monitoramento animal mesmo após o expediente, nos fins de semana e feriados.

*IP = intraperitoneal; IV = intravenosa; SC = subcutânea

V - Estudos fetais e embrionários

Estudos fetais e embrionários são amplamente utilizados para conhecer a fisiologia embrionária, fetal e neonatal, bem como para validar técnicas de correção de anormalidades fetais em humanos. O conhecimento adquirido da pesquisa fetal e embrionária é utilizado para melhorar a sobrevivência, saúde e bem-estar de animais recém-nascidos, bem como para a melhor compreensão da biologia do desenvolvimento. Para estudos com embriões, é necessária sua coleta de uma mãe gestante ou pelo desenvolvimento de embriões, utilizando técnicas de fertilização in vitro.

O acesso ao feto pode ser feito diretamente via uma incisão abdominal na mãe devidamente anestesiada, com a exposição de parte ou de todo o feto por meio de incisões na parede uterina. O acesso também pode ser realizado indiretamente, utilizando-se técnicas de monitoramento como ultrassom ou procedimentos radiológicos, e por técnicas laparoscópicas, estas últimas também necessitando de anestesia.

Os estudos podem envolver coleta de amostras do feto, dos anexos fetais ou do útero, além da colocação de cateteres ou instrumentos no feto ou placenta. Todos esses procedimentos exigem anestesia materna, caso não seja in vitro.

Independentemente das circunstâncias, esse tipo de procedimento requer apresentação de justificativa robusta pelo pesquisador responsável e criteriosa análise pela CEUA da instituição, pois o bem-estar do feto e da mãe deve ser considerado quando animais em gestação forem submetidos à cirurgia ou a outras intervenções.

Laparotomia com cirurgia uterina causa dor significativa na mãe e pode expor o feto a um estímulo potencialmente nocivo que deve ser levado em consideração no planejamento do procedimento.

5.1 Técnicas laparoscópicas - Dor ou distresse maternal

Deve-se assumir que tais procedimentos causarão dor em animais. Qualquer animal que passe por uma laparoscopia deve receber medicação analgésica apropriada para obter uma boa imobilização durante o procedimento e evitar a dor.

5.2 Dor e perturbação fetal

Deve se avaliar o estágio de desenvolvimento do animal e o seu nível de consciência. Intervenção cirúrgica no feto poderá causar estímulos potencialmente nocivos a ele.

Primeiramente, o sistema neural necessário para consciência deve estar formado e ativo; os estímulos devem ser capazes de provocar a transmissão de impulsos pelos nervos, desde os receptores sensoriais até o cérebro do animal, e suas estruturas cerebrais devem estar operacionalmente preparadas para converter esses impulsos em sensações percebidas. Segundo, o animal precisa estar consciente para perceber sensações, já que a inconsciência anula a percepção. Terceiro, para o animal consciente sofrer e para que o seu bem-estar seja comprometido, a natureza, intensidade e/ou duração das sensações devem resultar em experiências significativamente nocivas ou aversivas.

Há evidência de efeitos a longo prazo das respostas fisiológicas a estímulos dolorosos aplicados em fetos. Essas evidências indicam a necessidade do fornecimento de alívio adequado da dor ao feto. A não ser que aparelhos implantados possam ser utilizados para medir diretamente o bem-estar do feto, qualquer sinal de dor na mãe deve ser considerado como um sinal importante de dor e desconforto potencial para o feto. O feto é mais suscetível à hipotermia durante a cirurgia e há a necessidade de preveni-la.

VI - Controle da dor: anestesia, analgesia e sedativos.

Este item descreve os fármacos anestésicos, analgésicos e sedativos e respectivas técnicas recomendadas para as principais espécies (rato, camundongo, cobaia, coelho e hamster) de fins científicos.

É de fundamental importância uma equipe qualificada para reconhecer os sinais de dor. O veterinário é responsável pelos planejamentos anestésicos e pela instrução na monitoração da profundidade anestésica na espécie alvo.

A dor resulta em alterações fisiológicas, bioquímicas e comportamentais significativas e indesejáveis ao animal e aos estudos científicos. Aliviar a dor de forma eficaz acelera o retorno à homeostasia após os procedimentos cirúrgicos. Em muitos casos, outras estratégias, além da farmacológica, devem ser incluídas no controle da dor, além dos cuidados pós-anestésicos específicos.

O uso de agentes anestésicos, analgésicos e sedativos deve ser adequado à espécie, apropriado para o propósito do estudo e consistente com a prática veterinária atual. Os procedimentos cirúrgicos devem ser realizados mediante anestesia local ou geral apropriada. O controle eficaz da dor é obrigatório quando um animal se recupera da cirurgia. Deve-se atentar para a preparação pré-anestésica do animal, a monitoração da profundidade anestésica, os cuidados pós-anestésicos e o alívio da dor e estresse. Para selecionar um protocolo de tratamento da dor, deve-se levar em conta que a dor e o estresse não são avaliados facilmente em animais. Desta forma, os pesquisadores devem pressupor que os animais sentem dor de forma similar aos humanos.

6.1 Seleção do protocolo de anestesia

O agente anestésico, analgésico ou sedativo selecionado deve ser seguro para o animal e para quem administra e interferir o mínimo possível no protocolo de pesquisa, conforme protocolo indicado e supervisionado por médico veterinário e previamente aprovado pela CEUA. Devem ser considerados os seguintes fatores antes da seleção do protocolo analgésico e anestésico:

- a) interações fisiológicas e influência nos resultados dos fármacos utilizados, lembrando que apenas em situações extremas, plenamente justificadas, com embasamento científico, os opioides ou AINES não sejam utilizados;
- b) espécie, linhagem, raça, idade e estado fisiológico do animal (ex.: prenhez, estado de saúde);
- c) grau de invasividade e duração da dor ou estresse, se for o caso;
- d) plano ou profundidade necessários da anestesia;
- e) se o estudo é terminal ou não;
- f) duração da anestesia;
- g) aspecto humanitário da técnica (ex.: facilidade de indução e recuperação da anestesia, efeitos adversos dos fármacos nos animais);
- h) métodos de administração e dosagens;
- i) experiência dos pesquisadores com a técnica (incluindo um veterinário com experiência apropriada);
- j) disponibilidade de técnicas de monitoração anestésica (incluindo número adequado de pessoal treinado);
- k) monitoração necessária durante o período de recuperação;
- l) segurança dos pesquisadores; e
- m) equipamentos disponíveis.

Os Grupos farmacológicos de sedativos (não analgésicos), sedativos e analgésicos, anestésicos dissociativos estão relacionados na **Tabela 3** e os anestésicos injetáveis e de inalação gerais **Tabelas 4 e 5**.

Tabela 3: Fármacos analgésicos e sedativos mais usados em animais roedores e lagomorfos, com suas respectivas doses, vias e periodicidade de tratamento

FÁRMACOS mg/kg VIA	Cobaia	Hamster	Camundongo	Rato	Coelho
Acepromazina			1-2 IM; 2-5 IP	1-2 IM	1-5 IM
Acetoaminofeno			300 VO	100-300 VO/ 4hs; 6 mg/ml na água	
Alfadolona/Alfaxolona	40 IM			9-12 IP	9-12 IM
Aminopirina	130 VO	130 VO	150 IP; 300 VO	200 SC; 650 mg/animal	50 VO
Antipirina			197 IP	220-600 SC	100 VO, IM, IP, SC; 500 VO
Aspirina	270 IP SID; 86 VO 4h	240 IP SID	120 VO 4h; 300-300 SC SID; 25 IP	100 VO 4h; 400 SC, VO	20-400 SC, VO SID; 100 VO 4h
Buprenorfina	0,05 SC 6-12 h	0,5 SC 12 h	0,05-2 SC 3-12 h	0,006 mg/ml na água; 0,01-0,05 IV, SC 8-12 h; 0,1-0,24 VO; 0,5 SC TID; 5-10 VO (gavagem)	0,01-0,1 IM, IV, SC 6-12 h
Butorfanol			1-2 SC 1-4hs	1-2 SC 1-4hs	0,1-0,5 IM, IV, SC 4h

Butorfanol/ Acepromazina					1/1 IM
Carprofeno	2,5 SC SID		5 SC SID	5 SC BID ou SID	1,5 VO BID; 4 SC SID
Cetoprofeno				5 SC SID	1-3 IM
Clorpromazina	0,5 IM, SC	0,5 IM	5-10 SC; 3-50 IM; 3-5 IV	3-5 IV; 3-35 IM; 3-35 IM	1-25 IM
Codeína				25-90 SC 4h	
Diazepam	2,5-5 IM, IP	5 IP	5 IP	2 IV; 2,5-4 IM, IP	2 IV; 4-10 IM, IP
Diazepam/Xilazina					1/3 IV (indução anestésica)
Diclofenaco	2 VO SID		8 VO SID	10 VO SID	
Fentanil					25 µg adesivo por 72 h

Vias: IM – intramuscular; IV – intravenosa, SC – subcutânea e VO - oral

Observações: Esta lista não é completa e as doses são apenas um guia geral. Há uma grande variação entre linhagens e animais. Recomendam-se consultas adicionais sobre sedação e analgesia da espécie alvo. Estes fármacos e doses não garantem sedação ou analgesia eficaz. É necessário adequar os fármacos e posologia de acordo com o grau de invasibilidade do procedimento e o animal e para tal é fundamental a qualificação em reconhecer os sinais de dor na espécie. Outros fármacos não listados podem ser administrados desde que apresentem eficácia em outras espécies e as doses sejam ajustadas.

Fontes: Flecknell (1996), Kohn et al (1997), Hawk et al (2005)

Tabela 4: Fármacos e associações de fármacos injetáveis mais usados para contenção química e anestesia de animais roedores e lagomorfos, com suas respectivas doses e vias

FÁRMACOS (VIA) mg/kg	Cobaia	Hamster	Camundongo	Rato	Coelho	Observações
Alfadolona/Alfaxolona	10-20 IV; 40 IP	150 IP	5-20 IV; 90 IP	5-10 IV	6-9 IV*	Alta mortalidade
AlfACLORALOSE	70 IP		114 IP	55-65 IP	80-100 IV	Apenas quando ao final da anestesia se realiza eutanásia
Etomidato			5-10 IV; 30 IP			Apenas para contenção; para cirurgia sempre deve ser associado a outros analgésicos (ex. alfa-2 agonista e opioide)
Fentanil/Etomidato			0,08/18 IP			
Fentanil/Medetomidina				0,3/0,3 IP	0,008/0,33 IV	
Quetamina	44-200 IM*	100-300 IP	50 IV; 44-200 IM; 100-200 IP	44-100 IM; 75 IP	50 IM	* recomenda-se atropina; usar isoladamente apenas para contenção; para cirurgia sempre deve ser associada a outros analgésicos (ex. alfa-2 agonista e opioide)
Quetamina/ Acepromazina	125/5 IM, IP, SC	150/5 IM	100/2,5-5 IM, IP	30-75/2,5-3 IM, IP	50-75/1-5 IM, SC	Apenas para contenção; para cirurgia sempre deve ser associada a outros analgésicos (ex. alfa-2 agonista e opioide)

Quetamina/Azaperone			75/100 IM	50/87		Apenas para contenção; complementar com ¼ a ½ da dose; para cirurgia sempre deve ser associada a outros analgésicos (ex. alfa-2 agonista e opioide)
Quetamina/Detomidina				60/10 IM machos; 40/5 IM fêmeas		Apenas para contenção; para cirurgia sempre deve ser associada a outro analgésico (ex. opioide)
Quetamina/Diazepam	100-5 IM, IP	70/2 IP	200 IM/5 IP; 100/5 IP	40-80/5-10 IP	20-40/1-5 IM; 10/2 IV	Apenas para contenção; para cirurgia sempre deve ser associada a outros analgésicos (ex. alfa-2 agonista e opioide)
Quetamina/Medetomidina	40/0,5 IP	100/0,25 IP	50/1 IP machos; 75/1 IP fêmeas	60-75/0,25-0,5 IP	5 IV/0,35 IM + O2; 25/0,5 IM	Apenas para contenção; para cirurgia sempre deve ser associada a outro analgésico (ex. opioide)
Quetamina/Midazolam			100/5 IP	75/5 IP	30/0,2 IM	Apenas para contenção; para cirurgia sempre deve ser associada a outros analgésicos (ex. alfa-2 agonista e opioide)
Quetamina/Xilazina	25-40 IM e 5 SC, IP ou IM	200/10 IP ou 50-150/10 SC ou IM	200 IM e 10 IP* 90-100/10 IM 50/50 IM 80-100/10 IP; 100-150/50-100 IP	40-80/5-10 IP 37/7 IM + 1,25/min e 0,03-0,04/min IV – 12 h 30-90/10-15 IM	20-50/3-10 IM ou SC 10/3 IV ou intranasal	Nas doses mais altas pode ser alcançada a anestesia cirúrgica porém a mortalidade é muito alta; para cirurgia sempre deve ser associada a outro analgésico (ex. opioide)
Quetamina/Midazolam/Xilazina					30/0,2/3 IM	Apenas para contenção; para cirurgia sempre deve ser associada a outro analgésico (ex. opioide)
Quetamina/Xilazina/Acepromazina					35/5/0,75	Apenas para contenção; para cirurgia sempre deve ser associada a outro analgésico (ex. opioide)
Quetamina/Xilazina/Butorfanol					35/5/0,1 IM	
Pentobarbital/clorpromazina			40-60 IP e 25-50 IM			
Pentobarbital/Xilazina	45 IP*/7 IM,					Suplementar com 3-6,5 de pentobarbital IP ou IV quando necessário
Pentobarbital	28-37 IP	90 IP	40-85 IP 40-70 IV Neonatos 5 IP	30-50 IP	28-45 IV ou IP	
Propofol			20-30 IV	10 IV	7,5-15 IV 1,5 + 0,2-0,6/min	Usado normalmente apenas para indução anestésica, pela curta duração

Vias: IM – intramuscular. IV – intravenosa e SC – subcutânea

Observações: Esta lista não é completa e as doses são apenas um guia geral. Há uma grande variação entre linhagens e animais. Recomendam-se consultas adicionais sobre anestesia da espécie alvo, técnicas e fármacos. Estes fármacos, doses e técnicas não garantem anestesia eficaz. É necessário adequar os fármacos e posologia de acordo com o grau de invasividade do procedimento e o animal e para tal é fundamental a qualificação em reconhecer os planos anestésicos e a monitoração da profundidade anestésica na espécie. Outros fármacos não listados podem ser administrados desde que apresentem eficácia em outras espécies e as doses sejam ajustadas.

Fontes: Flecknell (1996), Kohn et al (1997), Hawk et al (2005).

Tabela 5: Anestésicos inalatórios mais usados e suas respectivas concentrações para indução e manutenção da anestesia de animais roedores e lagomorfos.

	Indução (%)	Manutenção (%)
Isoflurano	4	1-2,5
Sevoflurano	5-8	2,5-4
Halotano	4	1-2

Observações: Esta lista não é completa e as concentrações são apenas um guia geral. Há uma grande variação entre linhagens e animais. Recomendam-se consultas adicionais sobre anestesia da espécie alvo. Estes fármacos e concentrações não garantem anestesia eficaz. É necessário adequar a concentração do fármaco de acordo com o grau de invasividade do procedimento e o animal e para tal é fundamental a qualificação em reconhecer os planos anestésicos e a monitoração da profundidade anestésica na espécie.

Fontes: Flecknell (1996), Kohn et al (1997), Hawk et al (2005).



Figura 1 - Exemplo de opções de controle da dor classificados, de acordo com o potencial do procedimento em resultar dor ou estresse (“grau de invasividade”)

6.2 Questões específicas a considerar

Há variações significativas na resposta a agentes anestésicos, analgésicos e sedativos, de acordo com a espécie, linhagem e sexo do animal. Também pode haver variações individuais consideráveis entre animais de mesma linhagem e sexo. Não se recomenda extrapolar os efeitos de um agente anestésico ou analgésico de uma espécie para outra, incluindo humanos. Deve-se consultar orientação especializada ao planejar um novo protocolo de anestesia e controle da dor.

Para minimizar as interações potenciais com o protocolo de pesquisa, os efeitos farmacológicos dos agentes devem ser revisados. É importante considerar a resposta sistêmica ao procedimento anestésico, os efeitos do procedimento em si (ex.: canulação, cirurgia), da monitoração anestésica (ex.: hipotermia, ventilação e perfusão tecidual inadequadas) ou de um controle inadequado da dor no pós-operatório, que podem produzir efeitos indesejados e afetar os dados da pesquisa.

6.3 Anestesia

Para a supressão da percepção da dor durante a realização de um procedimento, deve-se realizar anestesia geral ou local. Essa seção discute sobre a seleção da técnica de anestesia mais apropriada e os passos para controle da anestesia.

6.3.1 Anestesia geral

A anestesia geral pode ser realizada com anestésicos injetáveis e ou inalatórios. A indução anestésica é o período entre o estado consciente e o estado de anestesia cirúrgica (inconsciência ou dissociação, quando se usar anestésicos dissociativos). A anestesia deve preceder o início do procedimento, se manter durante a cirúrgica até o início do período de recuperação.

A anestesia geral envolve perda de consciência e sensação dolorosa e relaxamento muscular. O grau e a necessidade de depressão da atividade reflexa, do tônus muscular e do sistema nervoso central variam com o procedimento a ser realizado. A anestesia geral com perda da consciência não garante analgesia eficaz, já que a inconsciência apenas evita a percepção de dor somente enquanto o animal está sob anestesia. Entretanto, os estímulos nocivos são transmitidos e processados pelo sistema nervoso central, durante os atos cirúrgicos, e podem desencadear hipersensibilidade central e produzir dor crônica e/ou neuropática. Portanto, embora a percepção de dor esteja ausente enquanto o animal está inconsciente, tal percepção pode estar aumentada no pós-operatório, quando não se tomam medidas antinociceptivas ou analgésicas no pré e trans-operatório. Outro ponto a se considerar é o grau de depressão do sistema nervoso central que os anestésicos ou as diferentes associações devem promover para que ocorra a insensibilidade durante o procedimento.

6.3.2 Anestesia inalatória

Pode ser induzida por meio de máscara facial e mantida por meio de máscara facial ou tubo endotraqueal. Para prevenir ou minimizar a exposição indesejada do operador aos gases anestésicos, deve-se prover, no recinto, um sistema eficiente de exaustão.

Para se administrar a anestesia inalatória, usa-se equipamentos anestésicos específicos, com fluxo diluente de oxigênio, com ou sem ar comprimido, para fins medicinais, e, vaporizadores, para controle da concentração do agente inalatório utilizado. Em animais de peso até 7 kg, recomenda-se o uso de circuito avalvular, antigamente denominado “aberto”, como, por exemplo, o circuito de T de Ayre, ou coaxial de Bain ou Mapleson A ou D, entre outros, já que são circuitos de baixa resistência e pequeno espaço morto.

O uso de uma caixa ou vidro, onde o animal é colocado dentro de uma câmara, contendo uma gaze ou algodão embebido do líquido anestésico, não deve ser usado, pois a concentração de anestésico atingida dentro do recipiente é imprevisível e apresenta risco de óbito quando se usa anestésicos de fácil vaporização (ex.: isoflurano, sevoflurano). Além disso, o contato direto com o líquido anestésico é desagradável para o animal, por causar irritação das membranas mucosas, além de não ser seguro para o operador.

6.4 Máscara facial

As máscaras faciais são utilizadas para induzir e manter a anestesia e fornecer oxigênio suplementar para animais anestesiados ou para aqueles que se recuperam da anestesia. A indução anestésica por máscara pode ser utilizada como alternativa à indução em câmara anestésica. Quando a primeira for usada, inicia-se sem o anestésico, para que o animal se acostume a respirar com o aparato apenas com oxigênio, em seguida, aumenta-se gradualmente, a partir de zero, a concentração do anestésico inalatório, até a concentração apropriada compatível com o plano anestésico almejado. Em seguida, pode-se intubar a traqueia ou continuar a usar a máscara facial. A concentração é então reduzida para o que for adequado para manutenção anestésica, mais detalhes na Tabela 5 (pág.86).

6.5 Câmara anestésica

Há câmaras anestésicas comercialmente disponíveis. O animal é colocado na câmara e o agente inalatório administrado com alto fluxo de oxigênio (5 litros ou mais por minuto), até que o animal perca o reflexo postural. O animal é então retirado da câmara e entubado ou mantido com uma máscara facial para a manutenção da anestesia.

6.6 Vantagens da anestesia inalatória:

- a) relativamente simples de administrar;
- b) controle mais preciso da profundidade da anestesia;
- c) indução e recuperação rápidas;
- d) a provisão de oxigênio resulta em maior concentração de oxigênio no sangue durante a anestesia.

6.7 Desvantagens da anestesia inalatória:

- a) necessidade de equipamento específico;
- b) necessita boa ventilação e sistema de exaustão no recinto, para a segurança do operador.

6.8 Anestesia injetável

Para informações sobre os métodos de administração de agentes anestésicos injetáveis, consultar procedimento “Administração de substâncias”.

6.9 Administração de anestésicos e via de predileção

6.9.1 Intravenosa (IV) - Na maioria das circunstâncias, de um terço à metade da dose calculada de anestésico é injetada rapidamente (normalmente por um período de 5 a 10 segundos) e complementada, se necessário, por anestesia adicional para produzir o efeito desejado. Após a indução IV, a anestesia pode ser mantida com anestesia inalatória ou IV contínua. Esta via apresenta como vantagem a indução rápida da anestesia e permite que a dose administrada possa ser adaptada para o animal, visando atingir e manter a profundidade desejada de anestesia. Entretanto, não podemos deixar de ressaltar que esta via requer muita experiência por parte do operador, uma perfeita imobilização do animal, para que não seja estressante ou recomenda-se a sedação prévia. Alguns agentes anestésicos são citotóxicos, se administrados por via perivascular (ex. Propofol, Barbitúricos).

6.9.2 Intraperitoneal (IP) - Quando a via IP é utilizada, o início da ação é mais lento do que com a administração IV e o animal pode passar por uma fase de progressiva ataxia (“cambaleante”). Pode exibir excitação e hiperatividade,

para, em seguida, perder a habilidade de se endireitar, e finalmente perder a consciência. A anestesia fica progressivamente mais profunda até a perda do reflexo interdigital após estímulo doloroso. A vantagem da escolha desta via é ser relativamente simples de administrar. Podemos citar alguns pontos negativos para a escolha desta via, tais como a dificuldade de ajustar a dose, de acordo com a resposta individual do animal, pode ocorrer a sobredosagem ou subdosagem acidental. Quase sempre são administradas doses relativamente grandes de anestésicos para produzir o efeito necessário, sua absorção é lenta se comparada com a administração IV. Efeitos residuais dos fármacos podem persistir por um longo tempo. Portanto, a recuperação total pode ser prolongada. Doses repetidas podem causar aderências abdominais e há risco considerável de injeções nos órgãos e vísceras.

6.9.3 Subcutânea (SC) - Normalmente utilizada apenas para administrar sedativos. O início da ação é mais lento quando comparado com outras vias de injeção. É relativamente simples de administrar. Entretanto, alguns fármacos (ex.: pentobarbital, tiopental) não podem ser administrados, pois causam dano ao tecido e escamação da pele. As desvantagens citadas para injeções IP também se somam a esta via.

6.9.4 Intramuscular (IM) - As injeções por esta via são dolorosas e devem ser evitadas sempre que possível. Volumes maiores devem ser administrados em múltiplos locais. O êmbolo deve ser retraído antes da injeção para evitar injeção IV. Sua escolha, na maioria das vezes, é por ser relativamente simples de administrar. Entretanto, a injeção de um composto irritante pode causar dor ou estresse ao animal. Há relatos de reações teciduais e miosite com a administração IM de alguns fármacos (ex.: quetamina). Em animais pequenos, o volume de injeção é grande se comparado ao volume de massa muscular, o que pode resultar em dor ou desconforto. Deve-se evitar em pequenos roedores. As desvantagens citadas para injeções IP também se aplicam a esta via.

6.10 Anestesia local

A anestesia local envolve a perda de sensação em uma área delimitada como resultado do bloqueio das terminações nervosas. Utiliza-se durante um procedimento cirúrgico ou para contribuir no controle da dor durante o período pós-operatório. Para procedimentos simples, como cateterização e procedimentos estereotáxicos, cremes ou pomadas de anestésicos locais podem ser aplicados topicamente na pele. Colírios com anestésicos locais podem ser utilizados em exames oftalmológicos.

A anestesia local para procedimentos cirúrgicos é mais usada quando o animal já está acostumado ao manuseio e pode ser imobilizado seguramente. Os anestésicos locais, como a lidocaína, podem ser infiltrados na área alvo, ou injetados por via perineural, correspondente à inervação local da área a ser anestesiada. Além das vias tópica, infiltrativa e perineural, outras vias que podem ser utilizadas incluem a epidural, intratecal ou subaracnoide e intra-articular.

A anestesia local pode ser associada aos anestésicos injetáveis ou inalatórios, para impedir a transmissão da dor (estímulo nociceptivo) oriunda do sítio cirúrgico (ver “Analgesia multimodal ou balanceada”).

6.11 Técnicas especializadas

6.11.1 Anestesia reversível - Muitos regimes de anestésias injetáveis envolvem períodos de recuperação prolongados, como, por exemplo, em roedores, nos quais os anestésicos administrados pela via IP produzem em média 30 a 60 minutos de anestesia, seguidos de tempo de recuperação de 2 a 4 horas. Durante o período de recuperação, os animais permanecem suscetíveis à hipotermia e apresentam algum grau de depressão cardiorrespiratória. Esses efeitos podem ser superados ao se utilizar antagonistas. Os antagonistas, como a

naloxona, estão disponíveis para opioides, bem como há a alternativa de utilizar agonistas-antagonistas (ex.: butorfanol e nalbufina), para reverter os efeitos adversos dos opioides agonistas totais (ex.: morfina, metadona). Os agonistas adrenérgicos- α_2 , como a medetomidina e xilazina, podem ser revertidos pelos antagonistas ioimbina, tolazolina e atipamezol e as benzodiazepinas, pelo flumazenil.

6.11.2 Anestesia neonatal - A anestesia de animais recém-nascidos é um desafio, dada a capacidade reduzida de biotransformação e eliminação dos fármacos. Desta forma, a resposta aos anestésicos pode diferir consideravelmente dos adultos. A recuperação prolongada pode reduzir os estoques de glicogênio hepático e resultar em hipoglicemia (baixa concentração de glicose no sangue). Outros problemas são a maior suscetibilidade à hipotermia, maior possibilidade de má função pulmonar e circulatória e a rejeição pela mãe após o procedimento (especialmente em roedores). Por essas razões, é preferível utilizar anestesia por inalação (ex.: isoflurano) para que a recuperação seja rápida e a alimentação normal seja reiniciada tão logo quanto possível.

6.12 Cuidados gerais para a eficácia da anestesia

O controle eficaz da dor depende dos cuidados com o animal antes da indução da anestesia, do desempenho do procedimento, da monitoração da eficácia da anestesia durante o procedimento e dos cuidados com o animal após o procedimento e recuperação.

6.12.1 Pré-anestesia - Deve-se aclimatar o animal ao manuseio para reduzir os efeitos do estresse e a possibilidade de acidentes com o animal e o operador durante a indução. Avaliar se o animal está saudável, registrar o peso corporal, para ajudar na monitoração anestésica e no cálculo das doses. Em algumas situações, o registro de consumo de alimento e água antes do procedimento auxiliará na monitoração pós-operatória.

6.12.2 Jejum - O período de jejum pré-anestésico é espécie-específico. Em roedores pequenos e coelhos, é geralmente desnecessário, pois o vômito durante a indução não ocorre nessas espécies. Além disso, o jejum pode resultar em depleção de reservas de glicogênio e causar hipoglicemia. Alguns autores só recomendam o jejum em coelhos em casos de cirurgia no sistema digestório. Coelhos e roedores são coprofágicos (ingerem suas próprias fezes). Portanto, medidas para prevenir a ingestão de fezes são necessárias se o estômago precisar estar vazio para o protocolo de pesquisa. Deve-se ter especial atenção com as cobaias, pois cerca de 40% de seu peso vivo é ingesta.

Ao induzir um animal e monitorar a profundidade da anestesia, deve-se estar ciente dos estágios anestésicos. O tempo gasto para um animal passar por cada estágio depende do agente anestésico utilizado e da resposta do animal. A anestesia pode ser induzida por agentes inalatórios ou injetáveis. Seja qual for a técnica escolhida, a anestesia deve ser administrada com equipamento apropriado, em uma sala específica, sem a presença de outros animais.

A anestesia pode ser mantida por agentes inalatórios administrados via máscara facial ou tubo endotraqueal, infusão contínua de agentes injetáveis, ou uma associação de métodos. Mesmo durante breves períodos de anestesia, é importante dar atenção ao suporte das funções corporais vitais do animal, particularmente os sistemas cardiovascular e respiratório.

Após a indução anestésica, posicionar o animal com sua cabeça e região cervical em extensão para minimizar a obstrução das vias aéreas. Nos casos de intubação traqueal, é necessário garantir uma via aérea adequada, especialmente para procedimentos longos. Para isso, é essencial a familiaridade com a anatomia específica da espécie e com a técnica.

A hipotermia (redução da temperatura corporal) pode se desenvolver rapidamente durante a anestesia e é uma das causas mais comuns de óbito por anestesia, especialmente em animais menores, como roedores, que perdem calor rapidamente sob anestesia cirúrgica, dada a alta proporção da superfície corporal em relação ao peso. Deve-se manter a temperatura do corpo o mais próximo possível do normal, pela provisão de calor suplementar (ex.: bolsas quentes, colchões térmicos). Por outro lado, deve-se tomar cuidado para não superaquecer ou queimar o animal.

Para manter a hidratação, a infusão IV ou SC de fluidoterapia (ex.: Ringer com lactato) é especialmente importante em anestésias longas ou cirurgias invasivas. Os fluidos devem ser aquecidos para não contribuírem para a hipotermia.

Sob anestesia, os olhos dos animais frequentemente ficam abertos. Portanto, deve-se garantir que a córnea esteja protegida de ressecamento e trauma, por meio de uso de pomadas oftálmicas.

A posição do animal deve ser monitorada, para evitar compressão exacerbada de partes ou de todo o corpo. Também é importante evitar o excesso de alongamento ou imobilização dos membros, pois há risco de danos nos nervos e vasos sanguíneos. Quando possível, permitir que os membros fiquem em uma posição anatômica natural. Quando os animais estão anestesiados ou imóveis por longos períodos, é recomendado que o animal seja movido ou virado a cada 20 minutos para promover o fluxo normal de sangue nos tecidos da superfície inferior.

6.12.3 Pré-medicação - A pré-medicação é geralmente administrada 5-30 minutos antes dos agentes anestésicos. A grande vantagem do emprego destes fármacos é a potencialização da ação dos anestésicos, obtendo-se, desta forma, plano mais adequado de anestesia, além de significativa redução da dose dos agentes anestésicos gerais. Os agentes empregados na pré-medicação podem incluir:

a) analgésicos administrados antes de um procedimento, para inibir a nocicepção e a percepção de dor e, portanto, para prevenção de dor. Opióides, como a morfina, meperidina, tramadol, butorfanol e mesmo o fentanil podem ser utilizados para este fim. No caso da neuroleptoanalgesia esses agentes podem ser associados a um sedativo (ex.: acetilpromazina + butorfanol).

b) sedativos (ex.: acetilpromazina, diazepam) em algumas espécies facilitam a imobilização. A acepromazina na dose de 3mg/kg como medicação pré-anestésica em camundongos, por exemplo, minimiza a ocorrência de excitação inicial que normalmente se observa quando se associa xilazina e quetamina nesta espécie, além de propiciar melhor plano de anestesia.

c) anticolinérgicos (atropina ou glicopirrolato), para reduzir os efeitos adversos de agentes anestésicos, como, por exemplo, reduzir as secreções respiratórias e o estímulo parassimpático cardiovascular. Algumas espécies, como os coelhos, podem ser refratários à atropina, requerendo doses de até 2mg/kg para serem efetivas.

6.12.4 Profundidade da anestesia

O controle de monitoração e as técnicas empregadas são determinadas pela espécie e tipo de procedimento. Os pesquisadores devem se familiarizar com os sinais específicos da espécie e dos estágios da anestesia. No mínimo, deve-se monitorar e registrar em fichas a profundidade da anestesia pela presença ou ausência de reflexos. Anestesia cirúrgica é obtida quando os seguintes reflexos e tônus muscular normal estão ausentes:

a) reflexo postural: o animal não tenta se endireitar se colocado em decúbito dorsal;

- b) tônus muscular da mandíbula;
- c) reflexo palpebral ao toque na pálpebra;
- d) reflexo interdigital, quando o espaço interdigital é pinçado;
- e) reflexo de pinçamento da cauda: ratos e camundongos;
- f) reflexo ao pinçamento na orelha: cobaia, coelhos;
- g) tônus do esfíncter anal.

6.13 Sistema respiratório a monitoração mais usual é realizada por:

- a) observações clínicas: monitora-se a amplitude, a frequência e o padrão da respiração (aumento na amplitude e diminuição da frequência se intensifica com o aprofundamento da anestesia);
- b) monitor respiratório: alguns equipamentos podem não ser sensíveis o suficiente para detectar apnéia em espécies pequenas, como o rato ou camundongo. Entretanto, há equipamentos disponíveis comercialmente para tal;
- c) oximetria do pulso: mede a saturação de oxigênio no sangue arterial;
- d) capnometria e capnografia: mede a concentração expiratória final de CO₂;
- e) hemogasometria: pH e pressão parcial de O₂ e CO₂ no sangue venoso ou arterial, com cálculo automático da concentração de bicarbonato, CO₂ total e déficit ou excesso de bases;

A obstrução respiratória pode ser causada por secreções, objetos externos, língua ou posições anormais do pescoço. A respiração pode ser comprometida por compressão do tórax.

6.14 Sistema cardiovascular a monitoração mais usual é realizada por:

- a) observações clínicas: cor das membranas mucosas, tempo de preenchimento capilar, sons cardíacos e frequência cardíaca, qualidade de pulso periférico;
- b) eletrocardiograma;
- c) pressão sanguínea: pressão arterial sistêmica, pressão venosa central;
- d) débito cardíaco.

6.15 Temperatura do corpo

A temperatura do corpo pode ser monitorada por um termômetro retal, ou termômetro de infravermelho, em que se aponta o feixe de infravermelho para a cavidade bucal ou o abdômen e se obtém o registro da temperatura corporal. A habilidade do animal de regular a temperatura é reduzida até que se recupere da anestesia. Em sua forma mais branda, a hipotermia aumenta o período de recuperação anestésica e pode alterar o metabolismo. Quanto maior a hipotermia, maior a suscetibilidade do animal à sobredosagem anestésica e choque. Portanto, a temperatura ambiente da área de recuperação deve ser de 30-35°C para roedores pequenos. Pode-se fornecer calor suplementar (ex.: lâmpadas de aquecimento, bolsas quentes, incubadora, colchão térmico), mas se deve tomar cuidado para não sobreaquecer o animal. A provisão de zonas aquecidas e não aquecidas na área de recuperação permitirá que o animal escolha sua zona preferida após a recuperação. A temperatura do corpo do animal durante o período de recuperação pós-anestesia e a temperatura do ambiente devem ser monitoradas.

6.16 Período pós-anestésico - deve-se observar os animais durante a recuperação de anestesia para garantir que:

- a) as vias respiratórias não sejam obstruídas;
- b) a temperatura do corpo seja mantida;
- c) eles não se machuquem;
- d) a dor pós-operatória seja adequadamente controlada.

Quando se utiliza os anestésicos inalatórios, o animal deve receber oxigênio puro após o fim do procedimento, para que o agente anestésico seja exalado pelos pulmões e a oxigenação garantida aos tecidos.

Uma vez colocado, deve-se remover o tubo endotraqueal só quando retornar o reflexo laringotraqueal.

Deve-se alojar individualmente os roedores pequenos e outras espécies sociais durante a recuperação, para evitar ataques de companheiros de gaiola e para prevenir a perturbação dos outros animais. No caso de cirurgia, o leito na gaiola deve ser adequado para prevenir contaminação da ferida cirúrgica.

Se os animais tiverem passado por um procedimento invasivo, uma monitoração cuidadosa, durante o período pós-operatório, é essencial para avaliar se a analgesia foi eficaz e se analgesia adicional é necessária. A dose ou frequência de administração deve ser modificada de acordo com as necessidades do animal.

Os líquidos aquecidos (37°C) auxiliam na recuperação do animal. Líquidos apropriados (ex.: Ringer com lactato, solução fisiológica) podem ser administrados IV lentamente, por via subcutânea ou intraperitoneal em uma dose de até 3-4% do peso corporal do animal.

6.17 Analgesia

Os agentes analgésicos mais indicados para procedimentos cirúrgicos são os opioides e os anti-inflamatórios não esteroides (AINE). Os anestésicos locais podem ser utilizados para aliviar a dor no pós-operatório, por bloquearem as sensações de dor da área afetada. O protocolo de analgesia pode também incluir o uso de antagonistas receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (ex.: quetamina em doses subanestésicas), sedativos ou tranquilizantes.

A via oral pode ser utilizada para a administração de fármacos em dose única ou múltiplas (ex.: tratamento analgésico contínuo fornecido via tabletes, ou em alimento, água ou gelatina). Entretanto, deve-se ter especial atenção quando da administração de agentes na água, pois vários agentes empregados para este fim possuem gosto amargo e; na maioria das vezes; o consumo adequado de água não ocorre, especialmente se o animal já estiver com dor.

6.18 Analgesia preventiva ou protetiva

A dor pós-operatória é controlada mais prontamente quando se realiza a analgesia no pré-operatório. Isso é conhecido como analgesia preventiva ou protetiva, administrada antes da incisão e continuamente durante o tempo no qual os sinais nociceptivos são maiores (aproximadamente 6-36 horas no pós-operatório para a maior parte das cirurgias). A analgesia protetiva previne o estabelecimento de sensibilização periférica e central causada por lesões incisionais e inflamatórias e cobre o período de cirurgia e o pós-operatório imediato.

Ao se administrar AINE no pré-operatório, deve-se dar preferência por inibidores preferenciais (carprofeno e meloxicam) e seletivos da ciclooxigenase 2 (coxibes), para minimizar a inibição de plaquetas e hipoperfusão renal.

6.19 Analgesia multimodal

A percepção de dor envolve uma multiplicidade de vias nociceptivas, mecanismos e sistemas transmissores (Figura 2). Portanto, é improvável que uma única classe de analgésicos alivie completamente a dor, independentemente da dose utilizada.

Normalmente; recomenda-se associar opioides e AINE. O opioide diminui a transmissão nociceptiva periférica e central aferente. Em contraste, os AINE agem periféricamente para diminuir a inflamação local e a informação nociceptiva para o sistema nervoso central como resultado de inflamação. Adicionar um anestésico local injetável (ex.: lidocaína, bupivacaína) fornece analgesia adicional, pelo bloqueio da transmissão nervosa periférica da área em questão.

Utilizam-se os antagonistas do receptor NMDA (ex. quetamina) para reduzir a sensibilização central. Sedativos e tranquilizantes diminuem a ansiedade e o estresse, que comprovadamente elevam as respostas à dor.

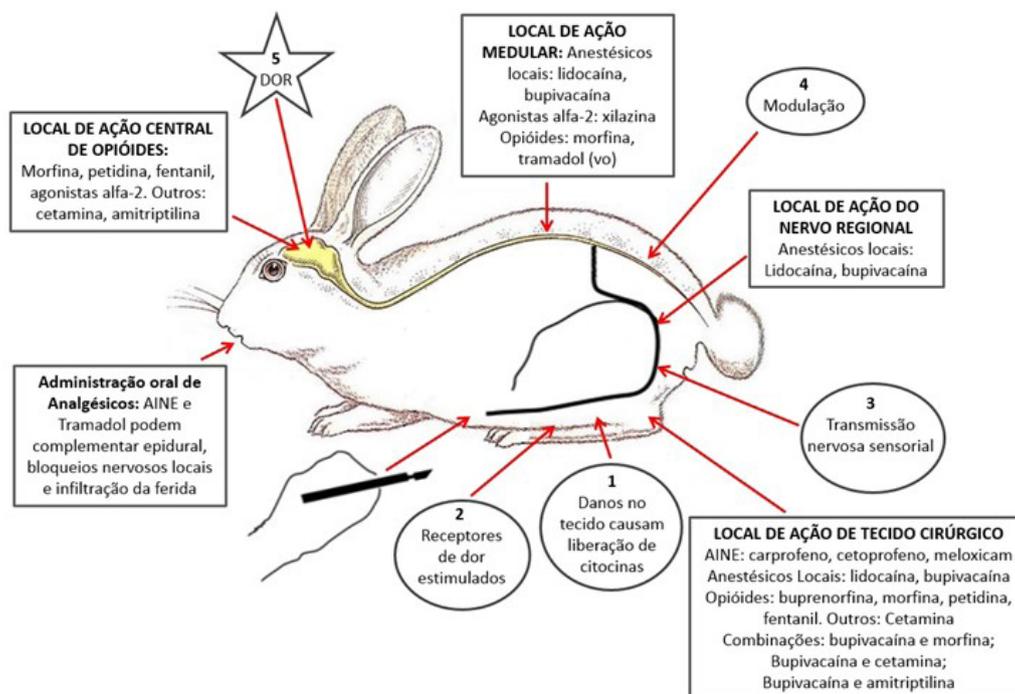


Figura 2 – Locais de ação de agentes analgésicos nos mecanismos da dor

Fonte: Schofield e Williams (2002) <http://www.biosecurity.govt.nz/animal-welfare/analgesic-practice.htm>

6.20 Monitoração da analgesia

Deve-se monitorar os animais cuidadosamente durante o pós-operatório para avaliar se a analgesia foi eficaz e se analgesia adicional é necessária. Deve-se modificar a dose ou frequência de administração, de acordo com as necessidades do animal. Descreve-se, a seguir, as recomendações sobre a rotina de uso dos analgésicos, agentes a serem utilizados e a frequência de administração:

a) Procedimento relativamente pequeno (ex.: cateterização vascular): uma dose única de analgésico sistêmico é administrada, seja um opioide ou um AINE. Alternativamente, pode ser apropriado, em algumas situações, injetar um anestésico local de longa duração (ex.: bupivacaína) na pele e tecidos circunjacentes.

b) Procedimentos cirúrgicos mais invasivos (ex.: laparotomia): a administração de analgésicos sistêmicos (AINE e opioide) é recomendada por 72 horas.

6.21 Ansiolíticos

A ansiedade pode elevar as respostas à dor e, desta forma, recomenda-se usar sedativos, que também facilitam a anestesia. Geralmente não se utilizam sedativos para produzir sedação profunda ou hipnose. O efeito máximo deve ser observado antes da indução da anestesia.

6.22 Manuseio seguro de analgésicos

Por serem entorpecentes, a maioria dos agentes anestésicos e analgésicos são fármacos controlados e devem ser armazenados em um armário trancado, em uma área segura. A legislação pertinente rege a aquisição, o uso e a manutenção de registros destas substâncias.

Alguns fármacos também se associam a questões significativas de saúde e segurança ocupacionais (ex.: riscos à saúde associados à exposição crônica aos anestésicos inalatórios, como potencial carcinogênico, mutagênico e teratogênico). Os pesquisadores devem estar cientes de qualquer risco potencial associado aos agentes que utilizam e tomar as precauções devidas.

Na escolha de anestesia dissociativa para um procedimento cirúrgico, salienta-se a importância de não se usar o anestésico dissociativo (ex. quetamina ou tiletamina) isoladamente ou apenas em associação com um benzodiazepínico (ex. midazolam, diazepam, zolazepam), já que, apesar de ocorrer imobilização do animal, não há uma analgesia efetiva para o procedimento cirúrgico. Nestes casos, deve-se associar, ao anestésico dissociativo, um alfa-2 agonista (ex. xilazina, medetomidina) e um opioide.

Para garantir que o bem-estar animal seja mantido durante a pesquisa científica, este guia orienta os usuários a lançarem mão de todos os recursos, objetivando minimizar a dor e o estresse aos animais. Procedimentos e protocolos de controle da dor consistentes, planejamento detalhado de procedimentos cirúrgicos e de outros procedimentos potencialmente dolorosos, uma compreensão da biologia animal e conhecimento detalhado das ações fisiológicas e farmacológicas dos fármacos sedativos, analgésicos e anestésicos propostos para o uso nestas circunstâncias, devem estar disponível antes de qualquer manipulação que possa causar dor aos animais.

VII - Procedimentos cirúrgicos

Define-se procedimento cirúrgico como uma intervenção que requer acesso a um tecido vivo. No cenário científico, o tipo de procedimento dependerá do propósito científico e pode variar desde uma incisão superficial até a penetração de uma cavidade do corpo, intervenção em órgão (s) ou dissecação tecidual extensa, que deverá ser realizada sob supervisão de um médico veterinário de acordo com as definições da Diretriz Brasileira para o Cuidado e Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (RN 30).

7.1 Os procedimentos cirúrgicos são realizados por diversas razões:

- a) coletar tecidos;
- b) realizar biópsias (incisional ou excisional);
- c) inserir cateteres vasculares de longa permanência (portal vascular) para permitir a coleta de sangue de animais;
- d) inserir cateteres para monitorar a pressão sanguínea venosa ou arterial;
- e) infundir substâncias e/ou fármacos;
- f) implantar cateteres ou aparelhos para coletar outros fluidos corporais;
- g) implantar eletrodos para registrar ou estimular locais específicos em estudos neurofisiológicos;
- h) implantar equipamentos, como sondas de telemetria para monitoração fisiológica e comportamental prolongada;
- i) transplantar órgãos, seja no mesmo indivíduo (autólogo), seja em indivíduos da mesma espécie (homólogo) ou em espécies diferentes (xenólogo ou heterólogo), no mesmo local (ortotópico) ou em locais diferentes (heterotópico) no animal receptor;
- j) desenvolver um modelo de estudo para um processo fisiológico ou patológico;
- k) desenvolver e avaliar novas técnicas cirúrgicas para utilização posterior em animais e humanos.

Qualquer procedimento cirúrgico deve ser acompanhado de anestesia e analgesia apropriadas para o tipo de procedimento, bem como, da espécie envolvida. Dependendo dos objetivos do estudo, ao final do procedimento cirúrgico, os animais podem recuperar a consciência ou não. No segundo caso, o animal deve sofrer eutanásia no final do procedimento.

Quando um animal se recupera de uma intervenção cirúrgica, precauções especiais devem ser tomadas para minimizar o risco de complicações, tais como dor ou infecção no pós-operatório. A natureza dos procedimentos cirúrgicos coloca o bem-estar de um animal em risco significativo, mais frequentemente associado ao controle inadequado da dor tanto durante como após o procedimento.

7.2 Técnica asséptica

A cirurgia asséptica é definida como intervenção realizada de formas e por meios suficientemente livres de micro-organismos, para que não se desenvolvam infecções. Procedimentos assépticos devem sempre ser utilizados, principalmente, quando se objetiva conseguir resultados após o procedimento cirúrgico.

A cirurgia asséptica é definida como uma intervenção em que se realiza um conjunto de medidas (esterilização do instrumental, desinfecção do ambiente, antissepsia do campo cirúrgico e equipe), com a finalidade de evitar a contaminação/infecção em locais sem contaminação.

Por alguns anos, havia uma visão de que procedimentos assépticos não eram necessários quando procedimentos de recuperação eram realizados em roedores. Hoje se sabe que uma boa técnica cirúrgica é tão importante quanto a assepsia na prevenção de infecções trans e pós-cirúrgicas em roedores.

7.3 Os elementos de técnica asséptica envolvem:

- a) realização de procedimentos cirúrgicos em uma determinada área em que foi feita a antissepsia;
- b) preparação do sítio operatório para minimizar o risco de entrada de bactérias na ferida; isto normalmente envolve a remoção de cabelo, pelo ou lã nas imediações da ferida cirúrgica pretendida e a limpeza e desinfecção daquela área;

- c) cirurgião e assistentes cirúrgicos devem utilizar aventais cirúrgicos e luvas estéreis (apenas luvas podem ser utilizadas em intervenções cirúrgicas em roedores e a campo) para efetuar a higienização cirúrgica;
- d) local da intervenção cirúrgica deve estar delimitado por campos estéreis para criar um “campo” estéril adjacente; um método de cobertura dupla é utilizado para procedimentos cirúrgicos grandes da cavidade abdominal ou torácica ou quando houver intervenção em vísceras;
- e) utilizar instrumentos e kits estéreis;
- f) somente instrumentos, campos cirúrgicos, kits e luvas estéreis devem entrar em contato com o campo operatório;
- g) superfícies estéreis devem ser mantidas secas para evitar que a umidade contamine a área cirúrgica.

A saúde clínica de todos os animais deve ser checada alguns dias antes da intervenção cirúrgica ser executada; atenção especial para sinais de respiração ou função cardiovascular comprometidas ou de infecção intercorrente. Além disso, quando os procedimentos estiverem propensos a comprometer sua habilidade em responder a infecções (ex.: imunossupressão), os animais devem ser examinados quanto a infecções subclínicas.

Os efeitos do transporte, introdução em novas instalações, novos grupos sociais e novo cuidador (técnico), sobre a resposta ao estresse (juntamente com alterações fisiológicas, bioquímicas e comportamentais) são bem documentados. O estresse cirúrgico exacerbará essas alterações e não somente comprometerá a habilidade do animal de manter a homeostase durante o procedimento cirúrgico, mas aumentará o risco de infecções no pós-operatório ao comprometer a função imunológica. Um período de aclimatação deve ser dado, para garantir que o animal tenha se recuperado desses estressores antes que seja marcada a intervenção cirúrgica. Este tempo pode variar com as circunstâncias, mas é recomendado um mínimo de 10-14 dias para animais criados em laboratório.

7.4 Atenção especial deve ser dada durante ou imediatamente após uma intervenção cirúrgica, especialmente aos seguintes eventos:

- a) perda de sangue devido a um trauma no tecido ou controle inadequado da hemorragia, resultando em perfusão e oxigenação comprometidas do tecido e, se for grave, em colapso cardiovascular;
- b) desidratação devido à perda descompensada de líquido durante o procedimento cirúrgico, que será exacerbada pela exposição e ressecamento dos tecidos, consumo restrito de fluido no pré-operatório e consumo voluntário reduzido no período pós-operatório;
- c) hipotermia devido ao comprometimento da termorregulação pelos agentes anestésicos, o que é um grande risco em pequenos roedores que possuam área de superfície extensa em relação à massa corporal e uma alta taxa metabólica;
- d) hipóxia e má perfusão tecidual (i) como consequência do decréscimo no volume de sangue, desidratação, desequilíbrio ácido-base ou hipotermia, ou (ii) associada com função respiratória inadequada;
- e) distúrbios metabólicos devido à ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e mudanças associadas na função celular, com metabolismo alterado de glicose e proteína resultando em hiperglicemia e balanço nitrogenado negativo;

f) falência cardiovascular e/ou respiratória, riscos durante procedimentos cirúrgicos e no período pós-operatório imediato, não somente devido às complicações potenciais, listadas anteriormente, mas também porque muitos agentes anestésicos possuem efeitos depressivos significativos e específicos em ambos os sistemas, um risco exacerbado por mau gerenciamento da dose anestésica;

g) choque-hipovolêmico ou séptico.

Infecções no pós-operatório podem incluir infecção e ruptura da ferida causada por uma falha nas técnicas assépticas; ou podem ser resultado de um trauma excessivo no tecido, má homeostase, aparelhos, cateteres, os quais podem ser um receptáculo de infecção. A hipotermia e agentes anestésicos modulam a resposta imune e aumentam o risco de infecção após procedimentos cirúrgicos.

7.5 A demora na cura do ferimento ou deiscência pode resultar de um ou mais dos seguintes fatores:

a) infecção;

b) comprometimento da viabilidade tecidual associada a uma má perfusão tecidual ou dano excessivo ao tecido causado por (i) mau manuseio do tecido, (ii) falha em manter um suprimento de sangue adequado, ou (iii) desidratação de tecidos durante a intervenção cirúrgica;

c) má posição de órgãos ou tecidos durante o fechamento;

d) escolha inadequada de materiais e/ou métodos de sutura, o que impede a perfusão tecidual e pode resultar em má posição dos tecidos e um maior risco de o animal acidentalmente remover as suturas (observação: inflamação do local da ferida aumentará este risco);

e) cura comprometida devido à função imunológica suprimida, seja como parte de uma intervenção deliberada (por exemplo, quando um animal é imunossuprimido após um transplante de órgão ou tem função imunológica suprimida devido à seleção genética ou manipulação genética), seja por associação com uma complicação perioperatória como hipotermia.

7.6 Complicações com cateteres ou aparelhos implantados são mais frequentemente devido a:

a) desenvolvimento de uma infecção no local do implante onde o cateter ou aparelho é a fonte de uma infecção sistêmica ou (ii) uma infecção na pele que se desenvolve no ponto de saída de um cateter ou sonda, que pode resultar em infecção sistêmica, rastreando o cateter ou aparelho ou um túnel subcutâneo, ou (iii) a introdução sistêmica de um patógeno durante a lavagem de cateteres;

b) vazamento de conteúdo gastrointestinal ao redor de uma fístula externa, causando supuração da pele ao redor;

c) cateteres, eletrodos ou aparelhos implantados sendo desalojados pelo animal ou seus companheiros de gaiola, resultando em hemorragia, trauma no tecido, contaminação da cavidade abdominal por conteúdo gastrointestinal ou secreções, sepse e, possivelmente, morte, devido a um choque hemorrágico ou séptico;

d) vazamento de conteúdo gastrointestinal, secreções pancreáticas ou bile na cavidade abdominal causando peritonite;

e) falha de cateteres vasculares devido à trombose ou infecção;

- f) danos em órgãos como o rim devido a infarto por trombos liberados a partir do implante;
- g) bloqueio ou infecção de cateteres biliar ou pancreático, os quais, devido à natureza das secreções, resultam em colecistite e insuficiência hepática ou pancreatite aguda;
- h) tamanho, peso ou local de implante dos cateteres e aparelhos que impactam nas atividades normais de um animal e, quando implantados nas cavidades do corpo, impactam na função dos órgãos vitais.

Isolamento social pode ser necessário durante a recuperação da anestesia para prevenir agressão de outros membros de um grupo social. Entretanto, em alguns casos, o isolamento contínuo pode ser necessário, para prevenir danos ao local da incisão/cateter/instrumentos cirúrgicos ou implantes. Nestes casos, recomenda-se alojar o animal em gaiola que lhe permita o contato visual, auditivo e olfatório deve ser mantido.

Após um procedimento cirúrgico, o padrão de comportamento que indica que um animal está sentindo dor é variável dependendo da espécie e do grau de invasividade do procedimento cirúrgico.

7.7 O risco potencial ao bem-estar do animal originado por procedimento cirúrgico pode ser reduzido, quando certos cuidados são tomados no pré, trans e pós-cirúrgico, tais como:

- a) desenvolvimento e revisão de planos de controle da dor, incluindo analgesia preventiva ou protetiva;
- b) seleção de agentes anestésicos e analgésicos apropriados para a espécie e o procedimento;
- c) monitoração da profundidade da anestesia e o controle dos efeitos adversos da anestesia;
- d) uso de procedimentos assépticos em todos os procedimentos de recuperação;
- e) competência dos envolvidos em todos os aspectos do processo, especialmente na administração e monitoração do anestésico e analgésico e desempenho dos procedimentos cirúrgicos.

7.8 Equipe técnica

Cirurgias frequentemente envolvem a utilização de técnicas novas ou a adaptação de métodos cirúrgicos que são utilizados em outras espécies. Nestas circunstâncias, quando o cirurgião não estiver familiarizado com o procedimento em uma espécie específica, com sua abordagem anatômica, com a viabilidade do procedimento novo ou recentemente proposto, para minimizar complicações cirúrgicas e para desenvolver e revisar estratégias de administração do pós-operatório, os seguintes passos são propostos:

- a) desenvolver procedimentos desfechos todas às vezes que a dor ou o desconforto for detectado nos animais em estudo, com a finalidade de evitar sofrimento desnecessário;
- b) realizar um estudo da anatomia topográfica, utilizando amostras de cadáver para se familiarizar com os planos e acidentes anatômicos, para avaliar a viabilidade do procedimento proposto e abordagem cirúrgica ideal e para identificar riscos cirúrgicos;
- c) realizar a intervenção cirúrgica como um procedimento prévio de não recuperação em um número suficiente de animais para ter confiança para lidar com o animal ao longo do período de recuperação; este passo também permitirá uma avaliação da técnica anestésica e terapias de apoio que melhor manterão a estabilidade fisiológica durante os procedimentos cirúrgicos;

- d) desenvolver um plano de gerenciamento do pós-operatório baseado nas consequências e riscos previstos;
- e) conduzir um estudo piloto que permita a recuperação de um número limitado de animais;
- f) analisar e rever os procedimentos cirúrgicos e anestésicos e planos de gerenciamento pós-operatório e da dor;

Realizar um curso e trabalhar com um mentor experiente é recomendado para pessoas que precisam adquirir habilidades em técnicas cirúrgicas básicas. Modelos de simulação podem ser utilizados para praticar técnicas de sutura e colocação de cateteres.

Ações que reduzem ou minimizam a magnitude e duração de perturbações metabólicas associadas ao estresse cirúrgico e complicações no pós-operatório auxiliam nos objetivos de qualidade de vida animal e na promoção dos princípios de Refinamento e Redução. Um resumo de estratégias para minimizar os riscos ao animal está listado na **Tabela 8**.

Tabela 8: Minimizando os riscos cirúrgicos ao bem-estar animal

Maiores Riscos	Possíveis causas	Ações corretivas
Dor	Escolha inadequada de anestésicos ou analgésicos	<ul style="list-style-type: none"> Selecione agentes apropriados para a espécie e tipo de procedimento
	Controle inadequado da dor	<ul style="list-style-type: none"> Desenvolva um plano de controle da dor Monitore e avalie a eficácia
Má circulação do sangue (má perfusão tecidual)	Perda de sangue	<ul style="list-style-type: none"> Utilizar adequada técnica cirúrgica e controle de hemostase Monitorar a frequência cardíaca e tempo de preenchimento capilar Manter a volemia com sangue ou fluidos de reposição Repor a perda de sangue >10% do volume de circulação
	Dose excessiva de analgésicos depressão cardíaca	<ul style="list-style-type: none"> Monitorar a profundidade da anestesia, função cardiovascular e perfusão tecidual, e ajuste a dose anestésica Administrar estimulantes cardíacos se necessário
	Hipotermia	<ul style="list-style-type: none"> Ver “Hipotermia” abaixo
	Desidratação	<ul style="list-style-type: none"> Manter a hidratação com fluidos aquecidos IV ou SC (ex.: solução de Ringer lactato ou NaCl 0,9% - 10 mL/kg/h no intra-operatório; manutenção diária de 40-80 mL/kg/24h) Manter os tecidos expostos umedecidos com solução salina
	Desequilíbrio ácido-base e eletrolíticos	<ul style="list-style-type: none"> Ver “alterações metabólicas” abaixo

Má oxigenação	Hipóxia devido a depressão respiratória causada por dose excessiva de anestésicos	<ul style="list-style-type: none"> • Monitorar a profundidade da anestesia, frequência respiratória e cor das membranas mucosas • Administrar oxigênio • Fornecer suporte respiratório mecânico • Reduzir a dose de anestesia • Administrar estimulante respiratório • Se a intervenção cirúrgica tiver terminado, administrar agente para reverter o anestésico, se aplicável
	Hipóxia devido a obstrução das vias aéreas	<ul style="list-style-type: none"> • Verificar a desobstrução das vias aéreas • Remover qualquer obstrução mecânica, como excesso de muco, sangue ou corpo estranho • Verificar a posição do corpo para garantir que o movimento respiratório não seja restringido ou as vias aéreas obstruídas
	Hipóxia tecidual ligada a má perfusão tecidual	<ul style="list-style-type: none"> • Ver “Má circulação do sangue” acima
Hipotermia	Agentes anestésicos	<ul style="list-style-type: none"> • Monitorar a temperatura do corpo durante a intervenção cirúrgica
	Exposição de cavidade do corpo ou tecidos ao ar frio ambiente (sério problema em animais com grande área de superfície em relação ao peso corporal e/ou alta taxa metabólica)	<ul style="list-style-type: none"> • Limitar a exposição a superfícies frias, especialmente quando o animal estiver anestesiado; deite o animal em material isolante e forneça fonte de calor (ex.: colchão térmico durante o procedimento cirúrgico e recuperação) • manter os tecidos expostos quentes e úmidos • Colocar os animais em um ambiente quente durante a recuperação
	Uso de líquidos parenterais frios	<ul style="list-style-type: none"> • Administrar fluidos mornos
	Inspiração de ar/gases frios	<ul style="list-style-type: none"> • Umidificar e aquecer o ar inspirado, se possível
Alterações metabólicas	Estresse cirúrgico ativa o eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal, resultando em glicogenólise e hiperglicemia, e afeta o metabolismo de proteínas, levando ao balanço nitrogenado negativo	<ul style="list-style-type: none"> • Aclimatar os animais às instalações e ao pessoal para reduzir a ativação da resposta ao estresse • Monitorar e controlar os fatores propensos a exacerbar a resposta ao estresse da intervenção, principalmente dano ao tecido e dor • Fornecer suporte nutricional para minimizar a glicólise durante o ato operatório e recuperação no pós-operatório • Monitorar o consumo de água e alimento no pós-operatório
	Má perfusão tecidual e hipóxia levam a acidose e perturbações eletrolíticas	

Má recuperação	Recuperação retardada do anestésico devido a dose excessiva ou metabolismo de fármacos comprometido associado a hipotermia, perfusão tecidual reduzida e comprometimento da função do órgão	<ul style="list-style-type: none"> Promover a homeostase metabólica mantendo normotermia e perfusão tecidual adequada e oxigenação Minimizar a isquemia tecidual durante a intervenção cirúrgica Minimizar a perda de sangue e desidratação Monitorar e corrigir corrija os desequilíbrios ácido-base e eletrolíticos durante a intervenção e a recuperação
	Hipotermia	<ul style="list-style-type: none"> Monitorar a profundidade da anestesia para evitar dose excessiva Monitorar e controle complicações potenciais da anestesia, especialmente temperatura do corpo e funções cardiovascular e respiratória
	Má perfusão tecidual	<ul style="list-style-type: none"> - Ver “Hipotermia” acima
	Má oxigenação	<ul style="list-style-type: none"> Ver “Má circulação do sangue” acima
	Desidratação	<ul style="list-style-type: none"> Ver “Má oxigenação” acima
	Infecção no pós-operatório	<ul style="list-style-type: none"> Ver “Desidratação” acima; também é necessário garantir hidratação adequada no período pós-operatório – monitore se líquidos parenterais são necessários
	Falha na ferida cirúrgica	<ul style="list-style-type: none"> Ver “Infecção no pós-operatório” abaixo
	Auto-trauma	<ul style="list-style-type: none"> Ver “Falha na ferida cirúrgica” abaixo
Infecção no pós-operatório	Estresse social	<ul style="list-style-type: none"> Escolher um anestésico com propriedades de recuperação mais suaves Melhorar a monitoração e proporcionar alívio à dor apropriado Melhorar as condições de alojamento
	Colapso na técnica cirúrgica	<ul style="list-style-type: none"> Garantir contato auditivo, visual e olfativo com outros animais
	Técnica cirúrgica inadequada	<ul style="list-style-type: none"> analisar e revisar os procedimentos; implementar treinamento se necessário
	Hipotermia no perioperatório	<ul style="list-style-type: none"> Ver “Hipotermia” acima
	Má perfusão tecidual	<ul style="list-style-type: none"> Ver “Má circulação do sangue” acima
	Cateter ou aparelho implantado ou local de saída infectado	<ul style="list-style-type: none"> Esterelização eficaz do implante; procedimentos assépticos durante a manutenção do cateter
Doença pré-existente	<ul style="list-style-type: none"> Triagem clínica antes da intervenção cirúrgica 	

Falha na ferida cirúrgica	Má técnica cirúrgica	<ul style="list-style-type: none"> • Revisar os procedimentos para garantir o manuseio atraumático do tecido, hemostase eficaz, manutenção de perfusão tecidual e métodos e materiais apropriados para fechamento da ferida • Garantir que técnicas assépticas sejam utilizadas para qualquer procedimento de recuperação ou na manutenção de cateteres intravasculares
	Infecção no pós-operatório	<ul style="list-style-type: none"> • Ver “Infecção no pós-operatório” acima

A complexidade e extensão das questões envolvidas em procedimentos cirúrgicos requerem avaliação cuidadosa para identificar riscos, desenvolver estratégias para minimizar ou gerenciar esses riscos e desenvolver um plano eficaz de controle da dor. Um estudo piloto pode ser necessário para informar este processo. O planejamento também deve incluir uma avaliação da disponibilidade e adequação de instalações e equipamentos, bem como das habilidades, conhecimento e experiência das pessoas envolvidas. Uma vez que um plano de gerenciamento foi formulado, uma análise contínua irá identificar oportunidades para refinar métodos e procedimentos.

VIII - Toxicologia

Toxicologia, segundo um consenso estabelecido entre as sociedades mundiais que atuam nessa área, é o estudo dos efeitos adversos de agentes químicos, físicos ou biológicos sobre organismos vivos e no ecossistema, incluindo a prevenção e ou minimização desses efeitos.

8.1 Testes toxicológicos

Testes toxicológicos podem identificar potenciais efeitos adversos à saúde ou demonstrar a segurança de novas substâncias químicas e novos produtos, fornecendo assim a base para a salvaguarda da saúde humana e animal. Estes testes são importantes para a análise de risco. Testes ecotoxicológicos podem ser exigidos pela legislação para caracterizar perigos e para avaliação de risco ambiental tanto pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), quanto por ministérios responsáveis pelo registro de novas moléculas para variados fins.

Autoridades reguladoras nacionais e internacionais necessitam equilibrar as preocupações entre o bem-estar animal e a necessidade de obter informações toxicológicas. A toxicologia é um campo cada vez mais harmonizado internacionalmente e considera uma vasta gama de organizações preocupadas com o desenvolvimento e validação de testes alternativos.

Para que os estudos de segurança e risco de novos produtos para utilização no animal, e aí inclui-se o próprio homem, e em relação ao impacto no meio ambiente sejam considerados por agências regulatórias, é necessária uma observância total às recomendações dos guias (guidelines) internacionalmente aceitos. Com relação aos estudos científicos, recomenda-se que esses mesmos guias sejam seguidos, sempre que possível, pois neles são considerados os aspectos éticos e a aplicação dos 3Rs (Substituição, Redução e Refinamento das técnicas).

8.2 Metodologias adotadas para avaliação de risco.

Estão disponíveis para estudos toxicológicos, vários protocolos internacionalmente aceitos, e alguns exemplos estão listados a seguir:

- a) toxicidade aguda: estudo da toxicidade produzida por uma substância teste, quando administrada uma ou mais vezes em um período que não exceda 24 horas;
- b) toxicidade subaguda: estudo da toxicidade produzida por uma substância teste, quando administrada diariamente durante período não superior a um mês. Os protocolos internacionais usualmente abrangem período que pode variar entre 14 ou 28 dias;
- c) toxicidade subcrônica: estudo da toxicidade em que a substância teste é administrada diariamente por pelo menos 90 dias;
- d) toxicidade crônica: estudo da toxicidade em que a substância teste é administrada diariamente por pelo menos 6 meses, com exigências variáveis para diferentes espécies e para as diferentes necessidades investigativas;
- e) irritação: avaliação de risco irritativo para substâncias, nos olhos, pele e mucosas. Para esse tipo de avaliação, já existem métodos alternativos validados pelo CONCEA e devem ser usados obrigatoriamente;
- f) carcinogenicidade: avaliação do potencial de uma substância para causar câncer. Esses estudos são de longa duração, prolongando-se por quase toda a vida do animal (roedores) e diante dessa situação, recomenda-se que sejam desenvolvidos somente em instalações ou laboratórios de utilização com condições sanitárias e estruturais capazes de manter a vida desses animais por longos períodos sem interferências, a não ser aquelas previstas na proposta do estudo aprovada por Comissão de Ética;
- g) teratologia: estudos que visam a determinação do potencial de uma substância para causar desenvolvimento pré-natal anormal, a produção de anomalias congênitas.
- h) reprodução: Estudos que visam à determinação do potencial de uma substância para causar desenvolvimento anormal no período perinatal, incluindo-se os estudos de uma ou duas gerações sequenciais. Sempre que possível, deve-se optar pelos protocolos de uma geração com extensão de observações, no intuito de diminuir o número de animais incluídos nos estudos;
- i) genotoxicidade: estudos que avaliam a habilidade de uma substância para induzir alterações no material genético (DNA, nucleotídeos, cromossomos);
- j) estudos ecotoxicológicos: avaliam o risco e a segurança de substâncias para o ecossistema.

8.3 Questões essenciais referentes ao bem-estar animal a serem consideradas.

As considerações essenciais ao bem-estar animal para condução de estudos de avaliação de risco e segurança são:

- a) avaliar a possibilidade de utilização de métodos alternativos à utilização de animais.

b) minimizar a utilização de animais, lançando mão delineamento estatisticamente projetado, protocolos internacionalmente aceitos e validados, ainda que se trate de estudos acadêmicos – considerar protocolos descritos em guias que contemplem as exigências regulatórias em parte ou em sua totalidade.

c) minimizar a dor e a perturbação quando essas condições forem essenciais ao estudo.

8.4 Métodos alternativos

Há um amplo escopo para a aplicação do Princípio dos 3R's na utilização de animais em estudos toxicológicos. Cada vez mais, alternativas validadas a animais sencientes são utilizadas em testes de toxicidade e, nesse sentido, a validação de um método é definida como um processo pelo qual a confiabilidade e relevância de um procedimento são estabelecidas para um fim específico. Todavia, nas situações em que a finalidade é regulatória, deverão ser usados os delineamentos propostos pelo CONCEA e quando não houver uma legislação nacional ordenatória a orientação é basear-se nas diretrizes internacionalmente aceitas para esse fim.

8.5 Projetos de estudo para atender às necessidades regulatórias

No sentido de evitar a utilização desnecessária de animais, é essencial observar as exigências regulatórias especificadas pelas autoridades nacionais e internacionais e que estão descritas nos guias. Essas incluem os tipos de teste, espécies-alvo, via de administração e parâmetros estatísticos, de forma a se obter o máximo de informações com o mínimo de envolvimento animal e resultados aplicáveis e seguros.

O racional para estudos que visam à determinação de risco e segurança de novas moléculas inclui o seguinte: estudos de genotoxicidade, estudo da toxicidade aguda em substituição ao cálculo da DL50, que foi abandonado pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) em 2001; estudos de toxicidade em doses repetidas (duas espécies, uma roedora e uma não roedora); estudos de toxicidade para a produção e para novos fármacos; adicionalmente estudos de segurança farmacológica específicos. Os protocolos para conhecimento do potencial irritativo ou corrosivo para olhos, pele e mucosas devem ter sua aplicabilidade avaliada caso a caso, uma vez que o dano é presumido, tornam-se desnecessários para substâncias ou formulações nas quais propriedades químicas ou físicas sugerem que essa forma de toxicidade é provável, por exemplo, pH acima de 11,5 ou abaixo de 2.

Ainda no sentido de minimizar e racionalizar a utilização de animais para estudos de toxicologia, o planejamento deve incluir a busca de informações relacionadas à molécula (pKa, pH, estrutura química, caracterização físico-química etc), parâmetros que podem ser base para cálculos que facilitem estabelecer concentrações para teste e a indicação de vias de administração ou de exposição, eliminando a possibilidade de procedimentos desnecessários.

8.6 Minimizar a dor e a perturbação

Quando alternativas não estão disponíveis, não estão previstas nos guias, ou não são permitidas pelos órgãos de registro, há um forte indicativo para que os estudos de toxicidade conduzidos em animais sejam acompanhados de observação de sinais clínicos que indiquem dor e perturbação. No entanto, deve-se ter em mente que a toxicologia não visa exclusivamente a determinação do risco, mas primordialmente a determinação clara da segurança. Dentro dos limites da legislação, a minimização de dor e perturbação deve ser um requisito primordial. Regulamentações de testes de toxicidade normalmente permitem somente o tratamento de dor e perturbação em animais se as providências para minimizar essas situações não apresentarem interferência direta com o estudo.

Assim, os animais nesses estudos são raramente tratados com analgésicos ou outras providências, tendo em vista a probabilidade de mascarar resultados. Nesse sentido, é essencial que os protocolos propostos tenham desfechos claramente definidos, descrevendo quando os animais devem ser removidos do estudo por razões humanitárias, e devem incluir previamente os critérios descritos para determinar quando os animais podem ser removidos, tratados ou receber eutanásia. A morte como desfecho deve ser evitada em todas as circunstâncias a não ser que seja uma exigência legislativa obrigatória. A identificação e desenvolvimento de biomarcadores detectáveis podem servir como desfecho antecipado. Esses devem ser conectados ao mecanismo ou modo de ação de toxinas e podem ser clínicos, patológicos, fisiológicos ou comportamentais. Esses biomarcadores podem ser observáveis, como comportamento, ou mensuráveis, como a temperatura do corpo e pressão sanguínea, ou dados resultantes de análises bioquímicas. Avanços em telemetria não invasiva permitem que ECG e dados de pressão arterial sejam registrados com mínimo de impacto no animal.

Alguns autores consideram que a marcha da pesquisa toxicológica deve considerar os desfechos humanitários baseados em procedimentos que causem quantidade mínima de dor e perturbação aos animais e que detectem e monitorem sinais precoces de dor e desconforto. Biomarcadores urinários poderiam fornecer indicadores precoces e sensíveis de desconforto devendo-se considerar que a coleta de urina pode ser não invasiva. O monitoramento do estado do animal no transcorrer do estudo deve ser feito de forma responsável e incluir, além do exame clínico diário, a observação constante, bem como o amparo de análises clínicas por profissional capacitado que, em conjunto, poderão determinar o ponto final da participação de cada um dos animais na investigação. É aconselhável, para esses casos, o acompanhamento de um médico veterinário. Adicionalmente, a implementação de um estudo piloto pode ajudar a prever quais critérios serão utilizados para determinar o momento da exclusão do animal por eutanásia, evitando-se sofrimento desnecessário.

IX - Procedimentos para modificação no comportamento animal

Em alguns projetos de pesquisa, o comportamento animal é modificado ou manipulado para obter um resultado científico. Isso pode envolver tratamentos como o uso de recompensas ou estressores biológicos, incluindo imobilização física, privação social, administração de drogas, restrição de comida ou água ou exposição a estímulos que causam dor ou distresse.

O comportamento de animais é modificado ou manipulado em muitos campos de pesquisa científica, incluindo psicologia, ciência do comportamento animal (etologia), pesquisa fármaco-comportamental e pesquisa da dor, pesquisa genética e neurociência.

9.1 Estratégias para modificar o comportamento:

- a) esquivar: o animal recebe opções e pode tomar uma decisão quanto a seu comportamento baseado em preferência;
- b) manipulação de variáveis sociais: incluindo densidade populacional, experiência social prévia, introdução de novos animais “intrusos” em um grupo estabelecido, separação social, isolamento ou perda;
- c) recompensa: uma recompensa (reforço positivo) pode ser oferecida quando o animal completa com sucesso uma tarefa que foi treinado a fazer. Em alguns casos, a recompensa é um “agrado”, como um alimento ou bebida altamente saborosos. Em outros casos, o acesso do animal à comida e água é limitado antes de uma sessão de treino e o animal recebe alimento e água adicionais como recompensa;

d) punição: os estímulos que são considerados aversivos podem variar entre espécies e podem incluir gaiolas novas ou não familiares, sabores desagradáveis, presença de um predador, um animal ou grupo social estranho, extremos de luz, temperatura ou som, um sopro de ar frontal, ou outros estímulos aversivos. Os animais responderão, escapando ou evitando os estímulos.

No item “c”, pode ser utilizado alimento sólido ou líquido como recompensa, mesmo em animais bem alimentados (saciados). A restrição de comida ou água é normalmente alcançada, limitando-se a quantidade diária disponível para o animal ou limitando o período diário de acesso. Se a restrição for prolongada, poderá ocorrer desidratação ou perda de peso corporal. O impacto da restrição de alimento ou água é descrito no item Modificação no consumo de alimento e água. Privação considerável de água ou alimento deve ser evitada.

9.2 As respostas básicas comportamentais e fisiológicas (medo e estresse) são minimizadas se o animal for capaz de controlar os estímulos aversivos. Situações nas quais os animais não podem influenciar ou controlar a experiência aversiva são especialmente perturbadoras para eles. Respostas comportamentais de medo e estresse incluem:

- a) escape: interromper contato com um estímulo aversivo;
- b) recusa: um comportamento assimilado que previne uma experiência aversiva;
- c) diminuição da higiene, consumo de alimento, nível de atividade, exploração, atividade sexual, comportamento materno e perda de peso corporal;
- e) aumento do comportamento de “congelamento”.

Esses comportamentos de resposta são típicos da espécie, mas os estímulos aversivos que os evocam são assimilados. Estímulos sensoriais aversivos ou negativos não podem ser utilizados e estímulos de dor ou enjoo devem ser evitados. Caso seu uso seja necessário, o nível e duração dos estímulos devem ser minimizados e o escape do estímulo deve estar disponível.

9.3 Agrupamentos sociais apresentam efeitos comportamentais e fisiológicos potencialmente benéficos e também adversos na maior parte das espécies de animais de laboratório:

a) os efeitos positivos do agrupamento social incluem higiene e cuidados maternos e paternos, afeição social (desenvolvimento de vínculos) e influencia no desenvolvimento de filhotes. Estimular o cérebro com informações sensoriais afeta o crescimento e a interconectividade do cérebro, afetando assim a função. O enriquecimento dos estímulos do ambiente possui efeitos permanentes nos cérebros de ratos e esse efeito pode ocorrer até em animais idosos. A privação social pode resultar em prejuízo ao crescimento;

b) os efeitos negativos incluem agressividade, brigas e alterações imunológicas e cardiovasculares, além de depressão induzida por estresse social. Em muitos casos, os efeitos negativos em animais subordinados, nos casos de hierarquias de dominância social, somem com o tempo. Entretanto, se comida ou água for restringida, os animais subordinados podem continuar a ser afetados adversamente.

9.4 Em algumas situações, o protocolo de pesquisa requer alojamento individual, como, por exemplo:

c) consumo individual de alimento e água do animal deve ser registrado;

d) efeitos farmacológicos sobre o comportamento de um indivíduo podem reduzir sua habilidade de se alimentar, ou induzi-lo a ser atacado por companheiros de gaiola;

e) instrumentos de modificação de comportamento e de registro são anexados à gaiola e respostas individuais dos animais são necessárias;

Privação social ou interações sociais negativas não podem ser utilizadas. Quando espécies sociais necessitam permanecer fisicamente isoladas, o contato visual, auditivo e olfatório deve ser mantido.

Déficit neurológico: criação de anormalidades na estrutura ou função do sistema nervoso. Por exemplo, por alterações genéticas, por uso de substâncias químicas tóxicas ao sistema nervoso, ou por danos físicos em áreas específicas do cérebro, medula espinhal ou nervos. Essas anormalidades assemelham-se às doenças neurológicas que ocorrem em humanos naturalmente e que envolvem disfunção comportamental ou sensorial. Exemplos incluem modelos quimicamente induzidos da Doença de Parkinson; dano físico em vasos sanguíneos para causar acidente vascular cerebral; e linhagens de camundongos com uma alta predisposição genética à epilepsia ou convulsões.

Dependendo do local e gravidade da patologia, após o déficit neurológico ser induzido, atenção especial deve ser dada aos animais. O déficit pode diminuir a habilidade de cuidar de si mesmo. Sua posição na hierarquia social provavelmente será baixa, uma vez que o déficit for criado, e isso poderá resultar em conflitos e habilidade reduzida de obter alimento quando alojados com o grupo. Em algumas situações, eles necessitam ser alojados em isolamento físico. Primatas não humanos alojados em pares podem ser cuidados, em parte, por seu companheiro de gaiola.

f) drogas: alterações na função do sistema nervoso através do uso de substâncias químicas. Por exemplo, drogas analgésicas alteram a percepção de dor do animal e retardarão ou eliminarão a resposta comportamental ao estímulo de dor;

g) aparato: equipamentos que contêm o animal apresentam estímulos ou registram respostas comportamentais;

g.1) aparato inclui:

1. instrumentos de imobilização (gaiola metabólica, imobilizador de cabeça);
2. câmaras de registro (incluindo monitor de atividades, plataforma de telemetria);
3. aparato especial (ex.: área de campo aberto, labirinto, roda giratória, tambor rotativo, câmara operante/"caixa de Skinner");
4. aparato de memória e aprendizado espacial utilizado com roedores (ex.: labirintos como braço radial, plataforma circular de Barnes, labirinto aquático de Morris);

h) Estudos de neurociência de comportamento acordado: incluem estudos das funções mais "elevadas" do cérebro, como a percepção, a memória e o controle motor, que envolvem a participação ativa do animal. Esses estudos requerem um estágio preliminar extensivo, durante o qual o animal é treinado para realizar uma tarefa e tem implantado, cirurgicamente, os instrumentos de coleta de dados ou de monitoramento. Os dados são coletados diariamente por um período que pode se estender por anos.

9.5 Cuidados a serem considerados para a modificação do comportamento:

Sinais gerais de dor ou desconforto devem ser monitorados constantemente. Atenção especial é requerida aos protocolos de restrição de fluídos que podem resultar em perda rápida de mais de 15% do peso do corpo, sede, secura das membranas mucosas, quantidade reduzida de urina, consumo reduzido de alimento, perda de elasticidade da pele, olhos fundos, tremor, letargia e choque ou colapso cardiovascular.

Em todos os casos nos quais a pesquisa pode ter impacto sobre o consumo de alimento ou água de um animal, uma justificativa científica circunstanciada deve ser fornecida à Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) ao buscar aprovação.

Animais com aparência descuidada ou suja, produção reduzida ou ausente de urina ou fezes, postura anormal, fraqueza ou perda de função generalizada ou localizada, ou movimentos gerais reduzidos devem ser monitorados cuidadosamente.

Aumento de mordidas, de escape e de comportamento de congelamento; produção de lágrimas, incluindo lágrimas vermelhas ou porfíria; ranger de dentes; vocalização aumentada; movimento exacerbado ou reduzido; auto isolamento, agressividade exacerbada ou reduzida; respiração rápida, de boca aberta ou exagerada; alteração de hierarquias sociais, também devem ser monitorados;

Todos os passos devem ser tomados para garantir que a dor e o desconforto sejam minimizados. Portanto, a pesquisa envolvendo modificações de comportamento deve ser justificada cientificamente, aprovada pela respectiva comissão de ética para o uso de animais e conduzida de forma a minimizar qualquer efeito adverso para os animais. A **Tabela 6** resume procedimentos gerais e considerações para minimizar os efeitos adversos da modificação de comportamento.

Tabela 6 – Procedimentos para minimizar a dor e o desconforto ao modificar o comportamento

Procedimentos gerais
<ul style="list-style-type: none"> • Em todos os casos, limite a duração e severidade do evento. • Em caso de imobilização, verifique as Diretrizes do CONCEA • Em caso de perturbação e estresse, permita que o animal reaja e controle. • Em caso de medo ou luta, permita evitação ou escape.
Imobilização
<ul style="list-style-type: none"> • O método de imobilização utilizado deve ser apropriado para a espécie e permitir que o animal descanse em uma posição natural. Por exemplo, um roedor pode ser colocado em um saco folgado, que, por sua vez, é colocado em uma caixa ou tubo, enquanto um primata não humano poderia sentar em uma cadeira de imobilização. • Os animais devem ser acostumados adequadamente (“condicionados comportamentalmente”) ao equipamento de imobilização. O indicador ideal de aceitação é o movimento de entrada voluntário do animal no equipamento.
Alojamento individual e em grupo
<ul style="list-style-type: none"> • Quando novos grupos ou pares sociais estão prestes a serem formados, pode ser possível alojar os animais com bastante proximidade para permitir a familiarização e o estabelecimento de hierarquias de dominância antes que eles tenham contato físico. • Em algumas espécies (ex.: camundongo), machos pós-pubescentes lutam e ferem outros machos. Nesses casos, os animais não devem ser alojados juntos. • Quando o alojamento individual for inevitável, os animais devem ainda ter contato visual, auditivo e olfatório. Tratadores podem ser uma fonte de enriquecimento social.

Déficit neurológico induzido

- A necessidade científica de induzir déficits debilitantes em animais precisa ser justificada rigorosamente, e os pesquisadores necessitam demonstrar que são capazes de fornecer cuidado especial que esses animais requerem.
- O número de animais com déficits neurológicos induzidos deve ser minimizado.
- Mamíferos devem ser substituídos por espécies menos sencientes, não mamíferas, sempre que possível.
- O protocolo de pesquisa deve ser refinado para reduzir ou eliminar dor, desconforto e mortalidade.

X. INDUÇÃO DE TUMOR

Tumores podem ser induzidos em animais de laboratório por meio de transplante de células tumorais específicas (frequentemente de origem humana), exposição a substâncias cancerígenas ou infecção com vírus indutores de tumor. Com o advento das técnicas de manipulação genética, linhagens de animais podem ser estabelecidas para desenvolver tumores espontâneos específicos.

Por meio da indução de tumores pode-se investigar sua biologia e avaliar a eficácia de vários tratamentos para inibir ou reverter o crescimento de tumor e o desenvolvimento metastático. O nível e frequência de tratamentos dependerão dos agentes de interesse. Os animais podem ser submetidos a uma única ou múltiplas exposições e mantidos em isolamento sob barreiras sanitárias.

O procedimento utilizado com maior frequência envolve o enxerto de células tumorais no animal hospedeiro, por transplante de células ortotopicamente, isto é, no tecido ou órgão de origem, ou ectopicamente, geralmente no espaço subcutâneo no flanco. O transplante envolverá um procedimento cirúrgico, exceto nos casos em que as células tumorais forem transmitidas via intravenosa ou implantadas subcutaneamente.

A fim de aumentar a absorção do enxerto, o estado imunológico do hospedeiro pode ser modulado por irradiação no corpo inteiro ou pelo uso de agentes imunossupressores. Podem ser utilizados animais imunologicamente comprometidos, tais como camundongos nude (atímicos), camundongos SCID (imunodeficiência grave combinada) e camundongos RAG (sem células B e T). Uma combinação dessas estratégias pode ser empregada.

O estudo de tumores estabelecidos pode envolver a administração de biomarcadores ou moduladores metabólicos para estudar a regulação de desenvolvimento e migração de células, colheita de células tumorais em vários estágios de desenvolvimento para uma análise *in vitro* mais aprofundada ou a variação de vários regimes terapêuticos.

Existe uma tendência à utilização de modelos ortotópicos que facilita o estudo de interações entre as células tumorais e tecidos hospedeiros. Estes tipos de estudo são relevantes principalmente para compreender o crescimento do tumor, o desenvolvimento de metástase e a eficácia de estratégias terapêuticas que são específicas ao tecido hospedeiro. Da mesma forma, animais transgênicos e nocautes são modelos de eventos celulares e moleculares mais precisos e são cada vez mais utilizados em estudos de câncer.

10.1 Considerações de bem-estar animal

O grande impacto no bem-estar dos animais em estudos indutores de tumor está associado ao desenvolvimento e biologia do tumor, aos efeitos colaterais de agentes terapêuticos, às consequências da cirurgia e aos efeitos colaterais de tratamentos imunomoduladores, como a irradiação. Efeitos adversos, em especial o tamanho do tumor, dor e subnutrição, irão variar com o tipo de tumor. Dependendo do local de implante, o crescimento do tumor pode afetar a mobilidade de um animal ou, especialmente em transplantes ortotópicos, resultar em sérias complicações fisiológicas. Somamos a isso, o desenvolvimento e disseminação de metástases em órgãos como o fígado ou pulmões.

Estudos neuroquímicos recentes indicam que os tumores são associados ao estado de dor persistente diferente da dor inflamatória ou neuropática. Entretanto, foi sugerido que os níveis de dor são significativamente menores com enxertos ectópicos do que com enxertos ortotópicos. Neste último caso, os animais estão propensos a sentir a dor de forma similar aos humanos.

A caquexia, um estado de subnutrição grave, é concomitante ao desenvolvimento do tumor. Embora haja certa diminuição no consumo de alimento, alterações metabólicas significativas são a razão primária para a perda de peso, perda de massa muscular, anemia e anorexia, a gravidade desses efeitos varia com diferentes modelos animais. Outros fatores da perda de peso incluem os efeitos da radioterapia, nos casos em que o trato gastrointestinal for danificado durante o tratamento o efeito atenuador do tumor na resposta metabólica à cirurgia com alterações na permeabilidade do intestino; e consumo reduzido de alimento associado aos efeitos colaterais de agentes quimioterápicos.

Complicações potenciais do procedimento cirúrgico podem afetar o desenvolvimento do tumor e ter implicações tanto para a interpretação de dados como para o impacto do procedimento no bem-estar do animal. A hipotermia, uma complicação cirúrgica comum, suprime a função imunológica e resistência do hospedeiro a metástases tumorais. A escolha de agente anestésico pode afetar o enxerto do tumor e a administração da dor no pós-operatório pode afetar o desenvolvimento do tumor.

Os efeitos colaterais específicos dos agentes quimioterápicos também necessitam ser levados em consideração. Eles podem incluir os efeitos imediatos de náusea ou perda de apetite e efeitos a mais longo prazo, incluindo a perda de peso e alterações patológicas como comprometimento das funções hepáticas e renais.

10.2 Monitoramento da dor e distresse

As diretrizes do Comitê de Coordenação da Pesquisa do Câncer do Reino Unido fornecem uma discussão ampla de como o bem-estar do animal deve ser monitorado em animais que foram submetidos à indução de tumores e, em especial, a implementação de desfechos humanizados nas estratégias de monitoramento.

O monitoramento da dor em roedores e coelhos deve incluir a verificação da expressão facial dos animais, com o enquadramento na escala de expressão facial conforme literatura disponível. As publicações científicas sobre diagnóstico da dor devem ser acompanhadas e incorporadas assim que novos métodos se tornem disponíveis.

A interpretação das alterações no peso corporal de um animal deve ser feita cuidadosamente, pois este dado sozinho pode não ser um indicador confiável. Com o crescimento do tumor, o peso do tecido do tumor aumenta

e, às vezes, o líquido fica acumulado nos tecidos corporais (edema) e cavidades do corpo (ex.: ascite). Isso pode mascarar perdas significativas de peso corporal e a interpretação de tais alterações deve ser feita de forma crítica, levando em consideração outros fatores, como a condição do corpo e comportamento.

É evidente o valor de novas técnicas de imagem, como a bioluminescência, ultrassom com agente de contraste aumentado, tomografia computadorizada volumétrica e microscopia de vídeo para monitorar o crescimento do tumor e disseminação da metástase. Entretanto, as imagens devem ser associadas com dados específicos da função do órgão para avaliação das alterações e estabelecimento de desfechos.

10.3 Minimização da dor e distresse

O protocolo escolhido deve ser compatível com os objetivos do estudo e ter mínimo risco para o animal. Deve ser realizado um estudo piloto nos casos em que o protocolo não ficar consistente.

O planejamento de estudos de procedimentos indutores de tumor em animais deve considerar o local de implante ou método de indução do tumor, a biologia do tumor, o potencial para lesões, desenvolvimento de metástases, produção de fatores caquéticos, estabelecimento do desfecho mais antecipado possível, efeitos tóxicos separados da terapia anticâncer e estabelecimento dos desfechos compatíveis com uma avaliação confiável da eficácia da terapia em estudos iniciais.

As estratégias para minimizar o impacto de um determinado protocolo necessitarão ser desenvolvidas especificamente no contexto de cada estudo, levando em consideração o impacto de cada um dos fatores citados.

Um elemento essencial no planejamento de estudos é o estabelecimento de desfechos humanizados e existe uma vasta discussão de como desenvolver esses desfechos.

O desenvolvimento de técnicas de imagem que permitem o monitoramento in vivo do crescimento do tumor e metástase é um avanço importante para o refinamento e controle do impacto do desenvolvimento do tumor e para o estabelecimento de desfechos precisos em termos de crescimento, metástases e eficácia de intervenções terapêuticas.

Os efeitos de caquexia são difíceis de administrar, mas é importante garantir que os animais recebam uma dieta nutricional adequada. Também é importante reduzir os efeitos de outras causas de perda de peso, como o uso profilático de líquidos parenterais em casos de radioterapia.

Outros aspectos a serem considerados incluem o delineamento estatístico para garantir a utilização mínima de animais, o cuidado animal, o alojamento de animais, o estresse social decorrente dos efeitos de isolamento de estudos da função imunológica e crescimento do tumor e o potencial para essas influências de perturbar a interpretação da eficácia da quimioterapia.

XI. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS

Os anticorpos são imunoglobulinas séricas com especificidade de ligação para antígenos específicos.

Embora os anticorpos possam ser identificados no soro de indivíduos e animais doentes que tenham sido expostos a determinados agentes patogênicos, os métodos usuais para eliciar anticorpos envolvem a imunização com preparações de antígenos purificados ou parcialmente purificados. Os antígenos mais frequentemente utilizados

são proteínas ou peptídeos, hidratos de carbono, ácidos nucleicos, pequenas moléculas orgânicas (haptenos) conjugados com proteína carreadora, células, extratos de células e também tecidos.

A primeira consideração a fazer, em geral, é distinguir entre anticorpos policlonais ou monoclonais. Os anticorpos policlonais são particularmente valiosos para imunoprecipitação e imunotransferência (soro terapêuticos), enquanto que os anticorpos monoclonais podem ter excelentes especificidades e pode ser aplicado para quase qualquer finalidade.

A escolha da espécie animal a ser utilizada para a imunização é baseada, em parte, na capacidade de gerar anticorpos de grande especificidade para antígenos geneticamente definidos que podem necessitar de uma produção em larga escala com desejável reatividade cruzada.

A quantidade de anticorpo necessária também deve ser avaliada. Os clones de hibridomas (somática híbridos de células B de baço e de mieloma de tumores de um animal imunizado são permissivas para a produção de imunoglobulinas monoclonais) fornecem uma quantidade bastante limitada e essencialmente tem reatividade para apenas um epítipo. No entanto, o investimento inicial na produção de um anticorpo monoclonal é grande, ao passo que quantidades relativamente abundantes de um antissoro policlonal podem ser obtidas a partir de um único coelho ou a partir de vários camundongos ou ratos geneticamente idênticos ou ainda cavalos.

A seguir, descreveremos a produção de antissoros policlonais por imunização com antígenos emulsionado em adjuvante. O método descrito é aplicável a coelhos, a camundongos, a ratos e a hamsters, e também pode ser utilizado em animais maiores, tais como carneiros ou cabras e cavalos.

É importante salientar que as emulsões de Freud completo e incompleto não são mais permitidas para obtenção de antissoros policlonais, pois a sua composição a base de lanolina e parafina, bem como, na chamada formulação completa, é acrescida de células de *Micobacterium bovis* inativado pelo calor. Todas essas substâncias são extremamente inflamatórias e levam a reações doloridas, levando ao sofrimento do animal. Pode se usar emulsões com base de óleos brancos de qualidade farmacêutica (ex: Marcol® - Exxon) e substâncias surfactantes de aplicação farmacêutica (Span 80®, tween 80®), ou ainda óleos biodegradáveis, como o esqualeno.

Os protocolos detalhados para a produção de anticorpos monoclonais são fornecidos a seguir. Com pequenas modificações, os protocolos podem ser aplicáveis a camundongos, ratos e hamsters.

Uma boa produção de antissoros depende, em grande parte, da qualidade, pureza e quantidade de antígeno disponível, bem como sobre a especificidade e sensibilidade do ensaio. Para antígenos de proteínas, se possível, o material deve ser homogêneo e bioquimicamente, dependendo da utilização pretendida, pode estar em uma conformação nativa ou desnaturada.

Deve-se estar ciente de que os contaminantes são frequentemente presentes, porém, em menores quantidades de antígenos que o imunógeno de interesse, e a partir da imunização os antissoros resultantes podem ter mais atividade contra os contaminantes do que contra a proteína de interesse.

O antissoro a ser utilizado para o rastreio de bibliotecas de expressão de cDNA de bactérias ou por imunomarcas são melhor realizadas contra a proteína desnaturada, enquanto que os que se utilizam para o rastreio de cDNA expressos em sistemas de transfecção eucarióticas ou para imunoprecipitação de estruturas de células nativas sintetizado pode ser feita melhor contra a proteína nativa.

Embora os avanços oferecidos pelo desenvolvimento de técnicas de anticorpos monoclonais têm revolucionado a especificidade, a uniformidade, e a quantidade de anticorpos, existem muitas circunstâncias em que os anticorpos policlonais são mais desejáveis do que os anticorpos monoclonais. Produção de antissoros policlonais leva menos tempo e esforço do que a produção de anticorpos monoclonais, exige um equipamento relativamente simples e prontamente disponível e produz reagentes que podem ser utilizados para imunoprecipitação, imunotransferência e ensaio imunoenzimático (ELISA).

A escolha do animal para a produção de anticorpos depende da quantidade desejada de antissoro, da distância evolutiva entre as espécies, a partir do qual a proteína de interesse foi derivada e da espécie do animal a ser imunizado e experiência prévia com os imunógenos. Os coelhos são os animais de escolha, porque eles são geneticamente distintos das fontes de proteínas humanas e de camundongos, os quais possuem as proteínas mais estudadas. Coelhos podem fornecer até 25 ml de soro, sem efeitos prejudiciais significativos aos animais.

Quando for utilizada pequena quantidade de antissoro ou para aqueles que dependem de anticorpos com especificidades precisamente definidas, linhagens puras de animais podem ser o sistema de escolha. Porque camundongos são menores, o volume de suspensão de antígeno utilizado para a imunização é significativamente menor e a quantidade de soro que pode ser obtido a partir de uma única punção não é superior a 0,5 ml. Os ratos e hamsters podem ser usados, quando for necessárias quantidades de soro maior, ou quando a maior distância evolutiva é vantajosa. Com punção repetida, pode ser obtido até 5 ml de soro a partir destas espécies.

Na presença de adjuvante (emulsões ou hidróxido de alumínio), o antígeno à base de proteína é aplicado por via intramuscular, intradérmica, subcutânea, conforme protocolo sob supervisão de médico veterinário, na espécie escolhida de animal. Imunizações de reforço são iniciadas 4 a 8 semanas após a imunização primária e continua em intervalos de 2 a 3 semanas. Antes da primeira imunização e de cada imunização de reforço, é obtido o sangue do animal e o soro preparado a partir de sangue total.

11.1 Materiais - Coelho, camundongo, rato ou hamster

- a) adjuvante (ISA 52® - Seppic®, Hidróxido de Alumínio);
- b) 1 a 2 mg/mL de antígeno de proteico em tampão salina-fosfatada (PBS) purificado;
- c) tubos de 50 ml para centrifuga de polipropileno descartáveis;
- d) seringas descartáveis de 3 ml;
- e) conector hub com bloqueio duplo-end (Luer-Lok, Becton Dickinson) ou torneira plástica de 3 vias para conexão para seringa;
- f) reagentes adicionais e equipamentos para a contenção do animal, material para injeção parenteral e coleta de sangue.

11.2 Produção de Anticorpos Policlonais em Coelhos com adjuvante oleoso (emulsão)

- a) obter de 0,5 a 2,0 mg de antígeno em 1,0 mL de PBS;
- b) misturar com 1,0 mL de adjuvante oleoso (ex: ISA-52);
- c) emulsificar com duas seringas de 5,0 mL conectados com hub duplo-end ou com torneira plástica de (três) vias;
- d) após 5 minutos, colocar 1 (uma) gota da emulsão em uma superfície de água. Caso a emulsão se disperse, a emulsificação deverá continuar por mais cinco minutos, até que o a emulsão na superfície da água não se disperse;
- e) o antígeno emulsificado poderá ser inoculado até 0,5 mL da seguinte forma:

1. no músculo semitendíneo ou músculo grácil;
2. subcutâneo, em até 100µL em 10 pontos no dorso (total de 1,0 mL).

- f) após 21 dias, repetir a imunização sem adjuvante;
- g) após 28 dias da primeira imunização, repetir a imunização sem adjuvante;
- h) após 35 dias da primeira imunização, obter uma pequena fração de soro determinar o título de anticorpos;
- i) se o título de anticorpo não for suficiente, imunizar após 36 dias da primeira imunização;
- j) repetir o item 8, após 45 dias da primeira imunização.

11.3 Produção de Anticorpos Policlonais em Coelhos com hidróxido de alumínio

Observação – O hidróxido de alumínio deve ser usado de acordo com a concentração de alumínio que não deve ser superior de 1,25 mg por dose.

Existem diversas marcas de hidróxido de alumínio para formulação de antígenos vacinais. As preparações estão muitas vezes na forma de gel de hidróxido de alumínio, o que indica que estão na forma de suspensão, devendo então ter sua concentração conhecida, observando-se condições abaixo:

- a) separar de 0,3 a 1,5 mg de hidróxido de alumínio estéril (o volume dependerá da concentração do gel);
- b) misturar de 0,5 a 2,0 mg de antígeno proteico em condições assépticas (dependente do volume, quanto maior o volume maior a concentração de antígeno);
- c) manter a temperatura ambiente em constante agitação (o suficiente para não precipitar o gel);
- d) inocular por via intramuscular no máximo 0,25mL ou via subcutânea no máximo 0,1mL.

1. no músculo semitendíneo ou músculo grácil;
2. subcutâneo, em até 100µL em 10 pontos no dorso.

- e) após 21 dias, repetir a imunização sem adjuvante;
- f) após 28 dias da primeira imunização, repetir a imunização sem adjuvante;
- g) após 35 dias da primeira imunização, obter uma pequena fração de soro determinar o título de anticorpos;
- h) se necessário, imunizar após 36 dias da primeira imunização;
- i) repetir o item 8, após 45 dias da primeira imunização.

11.4 Produção de Anticorpos Policlonais em camundongo com adjuvante oleoso (emulsão)

- a) obter de 10 a 50µL de antígeno em 1,0 mL de PBS;
- b) misturar com 1,0 mL de adjuvante oleoso (ex: ISA-52);
- c) emulsificar com duas seringas de 3,0 mL conectados com hub duplo-end ou com torneira plástica de três vias;
- d) após 5 minutos, colocar 1 gota da emulsão em uma superfície de água. Caso a emulsão se disperse, a emulsificação deverá continuar por mais cinco minutos, até que o a emulsão na superfície da água não se disperse;
- e) o antígeno emulsificado poderá ser inoculado até 0,5 mL da seguinte forma:

1. via intraperitoneal;
2. subcutâneo, em até 50µL em 2 pontos na base da cauda.

- f) após 21 dias, repetir a imunização sem adjuvante;

- g) após 28 dias da primeira imunização, repetir a imunização sem adjuvante;
- h) após 35 dias da primeira imunização, obter uma pequena fração de soro determinar o título de anticorpos;
- i) se necessário, imunizar após 36 dias da primeira imunização;
- j) repetir o item 8 após 45 dias da primeira imunização.

11.5 Produção de Anticorpos Policlonais em Camundongos com hidróxido de alumínio

Observação – O hidróxido de alumínio deve ser usado de acordo com a concentração de alumínio que não deve ser superior de 1,25 mg por dose.

Existem diversas marcas de hidróxido de alumínio para formulação de antígenos vacinais. As preparações estão muitas vezes na forma de gel de hidróxido de alumínio, o que indica que estão na forma de suspensão, devendo então ter sua concentração conhecida, observando-se os requisitos abaixo:

- a) separar de 0,3 a 1,5 mg de hidróxido de alumínio estéril (o volume dependerá da concentração do gel);
- b) misturar de 10 a 100µL de antígeno proteico em condições assépticas (dependente do volume, quanto maior o volume maior a concentração de antígeno);
- c) manter a temperatura ambiente em constante agitação (o suficiente para não precipitar o gel);
- d) inocular por via intraperitoneal no máximo 0,5 mL ou via subcutânea no máximo 0,05 mL na base da cauda;
- e) após 21 dias, repetir a imunização sem adjuvante;
- f) após 28 dias da primeira imunização, repetir a imunização sem adjuvante;
- g) após 35 dias da primeira imunização, obter uma pequena fração de soro determinar o título de anticorpos;
- h) se necessário, imunizar após 36 dias da primeira imunização;
- i) repetir o item 8, após 45 dias da primeira imunização.

A produção de anticorpos policlonais em ratos e hamster é similar à produção em camundongos, sendo a quantidade de antígeno pode ser de 20 a 200µg e o volume máximo a ser inoculado por via intraperitoneal é de 1,0 mL e, por via subcutânea, de 200µL em dois pontos na base da cauda.

XII - Estratégias de enriquecimento ambiental

Os alojamentos dos animais em cativeiro, com frequência, diferem bastante do ambiente natural, que é rico em estímulos. Atualmente, a ciência reconhece estas diferenças e incentiva a modificação destes alojamentos, com o objetivo de atender às necessidades específicas de cada espécie, visto que os animais são seres complexos, com comportamento e fisiologia adaptados aos seus ecossistemas.

Enriquecimento ambiental é *“qualquer medida que promove a expressão de tipos de comportamento naturais específicos da espécie e uma diminuição, se não o desaparecimento, de tipos de comportamento anormais. Deve ser baseado na promoção de um efeito positivo no bem-estar físico e psicológico do animal.”*

12.1 Cuidados a serem considerados para o enriquecimento ambiental

12.1.1 O enriquecimento ambiental deve ser fornecido como parte dos cuidados de rotina dos animais. Devem ser levadas em consideração as necessidades comportamentais específicas da espécie, incluindo a disponibilidade e desenho de espaço que permita livre movimentação e atividade, sono, privacidade e contato com outros da mesma espécie.

12.1.2 É importante observar que espécies diferentes necessitam de diferentes ambientes sociais e, portanto, de diferentes tipos de enriquecimento ambiental. Também é importante observar que o enriquecimento ambiental deve ser realizado com cautela, pois ele pode causar danos indesejados aos animais e introduzir variabilidade capaz de interferir nos resultados da pesquisa.

Interação com o homem é importante para o bem-estar dos animais e também pode afetar os resultados. Os animais devem ser adaptados à presença humana em geral e, especificamente, aos técnicos e pesquisadores. Para evitar dor e desconforto, todo o manuseio e imobilização devem ser feitos da forma mais positiva, segura e livre de ameaças e por pessoas treinadas para este fim.

12.1.3 A mudança para um ambiente enriquecido deve ocorrer com cautela e ser iniciada também no âmbito administrativo, com sua inclusão de orçamento destinada a estas estratégias de promoção do bem-estar.

12.2 Sugestões de enriquecimento ambiental para roedores e lagomorfos

12.2.1 Enriquecimento ambiental para roedores

12.2.1.1 Social:

Ratos e camundongos são espécies altamente sociais e se comportam melhor quando alojados em pares ou em grupo. O melhor momento para a formação dos grupos é o momento do desmame.

Uma grande atenção deve ser dada aos grupos formados por camundongos machos. Quanto mais velho for o camundongo, maior a ocorrência de problemas de agressão. Devemos ter como regra que grupos de indivíduos do mesmo sexo devem ser formados antes da puberdade. A organização territorial e social apresenta diferenças entre as linhagens de camundongos. Os machos adultos da linhagem Swiss demonstram maior intolerância uns com os outros no estabelecimento de territórios e apresentam maior grau de agressividade quando comparados a outras linhagens. Adicionar ou remover um indivíduo pode afetar o bem-estar do grupo inteiro.

A Cobaia é uma espécie social e deve ser alojada em pares ou pequenos grupos de indivíduos compatíveis sempre que possível. Machos frequentemente brigam quando atingem a maturidade sexual e devem então ser separados.

Na natureza, o hamster normalmente tem um comportamento solitário e agressivo uns com os outros, marcando seus territórios por meio das glândulas odoríferas em seus flancos. Recomenda-se, quando necessário, alojar hamster em grupos do mesmo sexo, formado durante o desmame.

12.2.1.2 Relação homem-animal:

Conduza o manejo diário de forma sistemática e suave e evite procedimentos os quais possam causar estresse.

Para familiarizar o rato ou camundongo com o técnico, deve-se permitir que o animal explore seu manuseador. Adaptar os animais para acostumar-se a procedimentos que necessitem ser repetidos. No momento da retirada da tampa das gaiolas, insira a mão dentro da gaiola e permita a proximidade do animal, permita que ele se acostume a este procedimento.

O manuseador do animal pode ser uma fonte de enriquecimento social. A implantação de reforço positivo ou agrados após o término da atividade é recomendado para todas as espécies.

12.2.1.3 Alimento:

Roedores preferem buscar seu próprio alimento. Quando permitido pela proposta do estudo e resguardados os cuidados com problemas de contaminação, sementes podem ser espalhadas na cama, o que permite a busca pelo alimento. Outra forma de enriquecimento alimentar é espalhar sementes por cima do alimento peletizado. Algumas irão cair por entre os espaços, mas a maioria ficará presa entre os pellets.

Sempre que possível, ofereça alimentos alternativos além da ração peletizada, desde que não interfira na proposta em estudo.

Para cobaias, pode ser oferecido feno dentro da gaiola; folhas verdes podem ser dadas como um suplemento a uma ração balanceada. Esta espécie reluta em comer alimentos desconhecidos e uma mudança rápida na dieta pode causar perturbações digestivas. Portanto, introduza novos alimentos de forma gradativa. Uma vez que os animais estejam acostumados, pode-se ter uma variedade de alimentos oferecidos como agrado em forma de rodízio.

Mistura de sementes podem ser dispostas no piso da caixa alimentação de hamsters jovens. Entretanto, os animais comerão principalmente sementes de girassol e excluirão outras. Estratégias alimentares poderão ser benéficas para o bem-estar dos animais. No entanto, o controle de qualidade de tais sementes é essencial, uma vez que existe o potencial de contaminação química ou biológica. Esta prática pode ser contraindicada para animais em estudos nutricionais ou de toxicologia.

12.2.1.4 Ambiente físico:

Ratos e camundongos são animais noturnos e buscam esconder-se da luz e buscar abrigo. O fornecimento de tubos de PVC ou outro material resistente propicia abrigo durante o dia. O fornecimento de uma folha de papel toalha é uma excelente forma de incentivar o comportamento de nidificação, típico de roedores.

O aumento do espaço, propiciando diferentes níveis dentro da gaiola, ou o fornecimento de objetos, para os animais escalarem ou se exercitarem, também pode ser oferecido. Quando estão se movendo, camundongos preferem ficar em contato com uma parede e longe de espaços abertos. Fornecer divisórias na gaiola pode fazer o camundongo sentir-se mais seguro.

Brinquedos de atividade, como cordas, objetos de borracha resistentes a mordidas que possam ser autoclavados podem ser introduzidos.

Uma caixa de nidificação sólida e opaca, com uma parte superior, pode ser colocada na gaiola de ratos, permitindo que eles a utilizem como plataforma.

Cobaias demonstram boa aceitação por caixas de papelão ou plástico que fornecem um abrigo escuro e escondido de outros indivíduos. Estas caixas servem como um lugar para se esconder e como um lugar seguro para o parto.

A presença de abrigos reduz a agressividade em hamsters. Estes abrigos permitem que eles se escondam uns dos outros, ajudando a minimizar encontros agressivos. Abrigos que simulem um túnel escuro é o mais desejável.

Rodas de correr podem ser oferecidas para camundongos e hamsters e os animais normalmente as utilizam

extensivamente. No entanto, existem controvérsias sobre os benefícios destas rodas. Elas podem ser vistas como uma maneira de proporcionar atividade física, mas, por outro lado, pode ser considerado como um facilitador para um comportamento obsessivo, já que os animais se exercitam mais do que normalmente se exercitariam na natureza.

12.2.1.5 Estimulação olfatória:

Marcações olfativas são muito importantes para roedores e são a base do desenvolvimento de sua organização social. A agressividade em machos é comum após a limpeza da caixa, pois a marcação do cheiro territorial é alterada.

Atenção especial deve ser dada ao fato de que ratos são predadores naturais de camundongos. Portanto, o cheiro de ratos causará uma reação de medo no camundongo. Logo, essas duas espécies não devem ser alojadas juntas.

Adicionar papel toalha após a limpeza da gaiola reduz a carga olfatória e encoraja o comportamento de nidificação.

As cobaias e os hamsters devem ser capazes de manter contato olfativo com outros animais familiares.

12.2.1.6 Promoção de tipos de comportamento naturais:

A luz ambiente deve funcionar em ciclo dia-noite, preferencialmente com escurecimento gradual para imitar o nascer e o por do sol para os roedores. Sistemas de dimerização podem ser previstos.

O fornecimento de materiais para nidificação tais como lenços, feno, papel toalha, tiras de papel ou algodão, deve ser incentivado. Os camundongos construirão ninhos com esses itens com entusiasmo, mas também utilizam para se abrigarem da luz ou outros estímulos estressantes.

Tipos de comportamento naturais, como cavar e criar túneis podem ser estimulados se for fornecido um substrato que tenha vários centímetros de espessura. Objetos para mastigar, tais como blocos de madeira com buracos pré-existentes, bolas de golfe ou bolinhas de madeira, blocos de madeira macia, palha ou tubos de papelão. Tubos de papelão também fornecerão abrigo e uma oportunidade para escalar.

Forneça aos ratos uma maior complexidade estrutural, utilizando abrigos com plataformas.

12.2.2 Enriquecimento ambiental para coelhos

12.2.2.1 Social:

Em seu habitat, os coelhos são animais sociais e, em muitos casos, vivem em tocas de até 100 ou mais animais de várias idades. Alojamento em grupos proporciona aos animais a oportunidade de um comportamento social mais próximo do natural, incluindo uma ampla oportunidade para o exercício adequado, limpeza mútua e melhora no bem-estar geral. Coelhos alojados em grupo realizam uma higiene grupal, que é um comportamento importante e aumenta a coesão do grupo.

Os coelhos podem também ser alojados em pares com gaiolas interconectadas. Animais alojados individualmente devem ter contato visual e olfativo com outros coelhos.

12.2.2.2 Humano-animal:

O homem também pode ser uma fonte de enriquecimento social. A remoção frequente da gaiola para manuseio e o contato com os cuidadores é recomendada. Deve se ter uma relação de carinho com os animais, manuseando-os com segurança e minimizando o estresse da contenção.

12.2.2.3 Alimento:

Feno pode ser fornecido no topo da gaiola para que o coelho fique em uma posição bípede para sua obtenção. Uma variedade de suplementos alimentares, como cenoura, maçã, verduras e outros vegetais, podem ser servidas em rotação, além da ração formulada balanceada. Agrados alimentares podem ser espalhados pelo local onde os animais estão confinados, para permitir a busca por comida, sempre que a proposta em estudo e o procedimento operacional padrão permitirem.

12.2.2.4 Ambiente físico:

A dimensão dos recintos de alojamento deve permitir os diversos movimentos dos animais. Plataformas ou caixas colocadas entre 20 e 30 cm acima do chão fornecem um bom abrigo escuro. Bolas e pesos de polipropileno resistentes a mordidas servem como bons brinquedos, bem como correntes de aço inoxidável suspensas com madeiras penduradas.

12.2.2.5 Estimulação olfatória:

O coelho tem uma alta sensibilidade olfativa, o que é de extrema importância no comportamento social e sexual. Portanto, deve-se evitar o uso de substâncias químicas de odor forte. Os coelhos devem ser capazes de manter contato olfativo com outros animais familiares.

12.2.2.6 Promoção de tipos de comportamento naturais:

Galhos, gravetos e caixas de papelão não tóxicos devem ser fornecidos para os animais roerem. Caixas de nidificação devem ser preenchidas com feno, palha ou retalhos de papel para as fêmeas prenhes.

Tabela 7: Estratégias de enriquecimento ambiental para espécies animais utilizados em pesquisas.

Roedores	
Tipo de enriquecimento	
Social:	<ul style="list-style-type: none"> Ratos e camundongos são melhores alojados aos pares ou grupos, contudo para evitar a agressividade, observada entre os machos, os grupos devem ser formados com indivíduos recém-desmamados que conhecem uns aos outros. Adicionar ou remover um indivíduo pode afetar o bem-estar de todo o grupo.
Humano-animal:	<ul style="list-style-type: none"> Permitir que o animal se familiarize com o pesquisador antes do início do trabalho favorece a realização dos ensaios que necessitam repetição.
Alimento:	<ul style="list-style-type: none"> Roedores preferem buscar seu próprio alimento. Sempre que possível ofereça alimentos alternativos, além da ração peletizada, de modo que a busca pelo alimento se assemelhe às condições encontradas na natureza.
Ambiente físico:	<ul style="list-style-type: none"> Ratos e camundongos têm hábitos noturnos e, portanto, é necessário oferecer alternativas para que eles possam se abrigar da luz. A luz ambiente deve funcionar em ciclo dia-noite, preferencialmente com escurecimento gradual para imitar o nascer e o por do sol. Para aumentar o espaço na gaiola pode-se criar diferentes níveis de modo que o animal possa escalar e se exercitar. Para protocolos específicos de reprodução, recomenda-se a oferta de material de nidificação. O fornecimento de diferentes tipos de substratos estimula tipos de comportamento naturais como cavar, criar tuneis, etc. Qualquer que seja o material adotado para o enriquecimento ambiental, não deve oferecer risco ao animal.
Lagomorfos	
Tipos de enriquecimento	
Social:	<ul style="list-style-type: none"> Os coelhos devem ser alojados em pares ou em pequenos grupos de indivíduos compatíveis, sempre que possível. Coelhos machos geralmente brigam quando atingem a maturidade sexual e devem então ser separados, sem, contudo, limitar o contato visual e olfativo.
Humano-animal:	<ul style="list-style-type: none"> A remoção frequente da gaiola por tratadores para manuseio é recomendada por constituir fonte de enriquecimento ambiental.

REFERÊNCIAS

American College of Veterinary Anesthesiologists. Monitoring standards.

<http://www.acva.org/professional/Position/monitor.htm>

American College of Veterinary Anesthesiologists' Position Paper on the Treatment of Pain in Animals (1998).

Journal of the American Veterinary Medical Association 213:628–630.

<http://www.acva.org/professional/Position/pain.htm>

Bate MJ (ed) (2001). Pain and Practical Pain Therapy, Proceedings of the ANZCCAR T/AVERT Conference, Melbourne.

Buchanan KC, Burge RR and Ruble GR (1998). Evaluation of injectable anaesthetics for major surgical procedures in guinea pigs. Contemporary Topics 37:58–63.

Grant C, Summersides GE and Kuchel TR (2001). A xylazine infusion regimen to provide analgesia in sheep.

Laboratory Animals 35:277–281.

Harvey-Clark CJ, Gillespie K and Riggs KW (2000). Transdermal fentanyl compared with parenteral

buprenorphine in post surgical pain in swine: a case study. Laboratory Animals 34:386–398.

Hawk CT, Leary SL, Morris TH. Formulary for laboratory animals. 3a. ed., Blackwell 2005, Ames, Iowa, EUA

Hellyer PW (2002). Treatment of pain in dogs and cats. Journal of the American Veterinary Medical Association

220(2):212–215.

Husby P, Heltne JK, Koller M E, Birkeland S, Westby J, Fosse R and Lund T (1997). Midazolam–fentanyl–isoflurane

anaesthesia is suitable for haemodynamic and fluid balance studies in pigs. Laboratory Animals 32:316–323.

Lascelles BDX (1996). Advances in the control of pain in animals. Veterinary Annual 36:1–15.

Livingston A (2002). Ethical issues regarding pain in animals. Journal of the American Veterinary Medical

Association 221(2):229–233.

Machin KL (2001). Fish, amphibian, and reptile anaesthesia. Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal

Practice 4(1):19–33.

Mathews KA (ed) (2000). Management of pain. The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice

30, WB Saunders, Philadelphia.

Muir WW and Woolfe CJ (2001). Mechanisms of pain and their therapeutic implications. Journal of the

American Veterinary Medical Association 219(10):1346–1355.

Phifer CB and Terry LM (1986). Use of hypothermia for general anesthesia in preweanling rodents. Physiology

and Behaviour 38:887–890.

Richardson CA and Flecknell PA (2005). Anaesthesia and postoperative analgesia following experimental surgery in laboratory rodents: Are we making progress? Alternatives to Laboratory Animals (ATLA) 33:119–127.

- Rodriguez NA, Cooper DM and Risdahl JM (2001). Antinociceptive activity of and clinical experience with buprenorphine in swine. *Contemporary Topics* 40:17–20.
- Roughan JV and Flecknell PA (2001). Behavioural effect of laparotomy and analgesic effects of ketoprofen and carprofen in rats. *Pain* 90:65–74.
- Roughan JV and Flecknell PA (2002). Buprenorphine: a reappraisal of its antinociceptive effects and therapeutic use in alleviating post operative pain in animals. *Laboratory Animals* 36:322–343.
- Sanders RD, Patel N, Hossain M, Ma D and Maze M (2005). Isoflurane exerts antinociceptive and hypnotic properties at all ages in Fischer rats. *British Journal of Anaesthesia* 95:393–399.
- Stetter MD (2001). Fish and amphibian anesthesia. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* 4(1):69–82.
- Stevens CW, Klopp AJ and Facello JA (1994). Analgesic potency of mu and kappa opioids after systemic administration in amphibians. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 269:1086–1093.
- Stevens CW, MacIver DN and Newman LC (2001). Testing and comparison of non opioid analgesics in amphibians. *Contemporary Topics* 40:23–27.
- Tasker RAR, Connell BJ, Ross SJ and Elson CM (1997). Development of an injectable sustained-release formulation of morphine: antinociceptive properties in rats. *Laboratory Animals* 32:270–275.
- Underwood WJ (2002). Pain and distress in agricultural animals. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 221(2):208–211.
- Volker D, Bate M, Gentle R and Garg M (2000). Oral buprenorphine is anti inflammatory and modulates the pathogenesis of streptococcal cell wall polymer-induced arthritis in the Lew/SNN rat. *Laboratory Animals* 34:423–429.
- Wilkinson AC, Thomas ML and Morse BC (2001). Evaluation of a transdermal fentanyl system in Yucatan miniature pigs. *Contemporary Topics* 40:12–16.

Recommended texts

- Flecknell P and Waterman-Pearson A (eds) (2000). *Pain Management in Animals*, WB Saunders, London.
- Flecknell P (1996). *Laboratory Animal Anaesthesia*, 2nd edition, Academic Press, London.
- Kohn DF, Wixson SK, White WJ and Benson GJ (eds) (1997). *Anaesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*, American College of Laboratory Animal Medicine Series, Academic Press, San Diego.

Recursos educacionais e websites

- Flecknell P. Digital veterinary anaesthesia images and videos. <http://www.digires.co.uk/>
- International Veterinary Information Services (IVIS). <http://www.ivis.org/home.asp>

Oklahoma State University (2003). Undergraduate Anesthesia Manual, College of Veterinary Medicine. <http://www.cvm.okstate.edu/Courses/vmed5412/default.htm>

The Virtual Anesthesia Machine. <http://vam.anest.ufl.edu/index.html>

Wong P (2003). The Virtual Anaesthesia Textbook—Veterinary Anaesthesia. <http://www.virtual-anaesthesia-textbook.com/vat/vet.html>

a: influence of anaesthetic protocols on experimental models. *Annales Francaises d'Anesthesie et de Reanimation* 23:811–818.

Bette M, Schlimme S, Mutters R, Menendez S, Hoffmann S and Schultz S (2004). Influence of different anaesthetics on pro-inflammatory cytokine expression in rat spleen. *Laboratory Animals* 38:272–279.

Elena G, Amerio N, Ferrero P, Bay ML, Valenti J, Colucci D and Puig NR (2003). Effects of repetitive sevoflurane anaesthesia on immune response, selected biochemical parameters and organ histology in mice. *Laboratory Animals* 37:193–203.

Kissin I (2000). Preemptive analgesia. *Anesthesiology* 93:1138–1143.

Milross CG, Peters LJ, Hunter NR, Mason KA, Tucker SL and Milas L (1996). Polarographic pO₂ measurements in mice: effect of tumor type, site of implantation and anesthesia. *Radiation Oncology Investigation* 4:108–114.

NHMRC (National Health and Medical Research Council) (2004). Australian Code of Practice for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes, 7th edition, NHMRC, Canberra.

Schofield JC and Williams VM (2002). Analgesic Best Practice for the Use of Animals in Research and Teaching — An Interpretative International Literature Review, Biosecurity New Zealand. <http://www.biosecurity.govt.nz/animal-welfare/analgesic-practice.htm>

Shafford HL, Hellyer PW and Turner AS (2004). Intra-articular lidocaine plus bupivacaine in sheep undergoing stifle arthrotomy. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 31:1–26.

Thompson JS, Brown SA, Khurdayan V, Zeynalzadedan A, Sullivan PG and Scheff SW (2002). Early effects of tribromoethanol, ketamine/xylazine, pentobarbital and isoflurane anesthesia on hepatic and lymphoid tissue in ICR mice. *Comparative Medicine* 52:63–67.

Brown MJ, Pearson PT and Tomson FN (1993). Guidelines for animal surgery in research and teaching. *American Journal of Veterinary Research* 54:1544–1559.

Hawkins P, Morton DB, Bevan R, Heath H, Kirkwood J, Pearce P, Scott L, Whelan G and Webb A (2004). Husbandry refinements for rats, mice, dogs and non-human primates used in telemetry procedures. Report of the Joint Working Party on Refinement. *Laboratory Animals* 38:1–10.

LASA /UFAW (Laboratory Animal Science Association and Universities Federation for Animal Welfare) (1989). Guidelines on the Care of Laboratory Animals and their Use for Scientific Purposes. III Surgical procedures. UFAW, Potters Bar.

Morton DB, Hawkins P, Bevan R, Heath H, Kirkwood J, Pearce P, Scott L, Whelan G and Webb A (2003). Refinements in telemetry procedures. Report of the Joint Working Party on Refinement. *Laboratory Animals* 37:261–299.

NHMRC (National Health and Medical Research Council) (1997). Guidelines on the Use of Animals for Training Surgeons and Demonstrating Surgical Equipment and Techniques.
<http://www.nhmrc.gov.au/publications/synopses/ea13syn.htm>

NIH (National Institutes of Health) (2005). Intramural Research Program. Guidelines for Survival Rodent Surgery.
<http://oacu.od.nih.gov/ARAC/surguide.pdf>

NSW Animal Research Review Panel (2003). Use of Animals in Post-Graduate Surgical Training (revised).
<http://www.animaethics.org.au/reader/animals-teaching/arrp-postgraduate-training.htm>

Recommended texts

Brown PA and Hoogstraten-Miller S (2004). Principles of aseptic rodent survival surgery. Part I & II – General training in rodent survival surgery. In: *Laboratory Animal Medicine and Management*, Reuter JD and Suchow MA (eds), International Veterinary Information Service (IVIS), Ithaca, NY. <http://www.ivis.org>

Cocchetto DM and Bjornsson TD (1983). Methods for vascular access and collection of body fluids from the laboratory rat. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 72:465–492.

Flecknell P (1996). *Laboratory Animal Anaesthesia*, 2nd edition, Academic Press, London.

Flecknell P and Waterman-Pearson A (2000). *Pain Management in Animals*, WB Saunders, London.

Foley PL (2004). Common surgical procedures in rodents. In: *Laboratory Animal Medicine and Management*, Reuter JD and Suchow MA (eds), International Veterinary Information Service (IVIS), Ithaca, NY.
<http://www.ivis.org>

Harrison FA (1995). *Surgical Techniques in Experimental Farm Animals*, Oxford University Press, Oxford.

Gardiner TW and Toth LA (1999). Stereotactic surgery and long-term maintenance of cranial implants in research animals. *Contemporary Topics* 38:56–63.

Gay WI (ed) (1986). Part A: Patient care, vascular access and telemetry. In: *Methods of Animal Experimentation*, vol 7: Research Surgery and Care of the Research Animal, Academic Press, Orlando, 143–241.

Hecker JF (1985). *The Sheep as an Experimental Animal*, Academic Press, San Diego.

Kaplan HM and Timmons EH (1979). *The Rabbit – A Model for the Principles of Mammalian Physiology and Surgery*, Academic Press, New York. Part III Surgical procedures.

Lumley JSP, Green CJ, Lear P and Angell-James JE (1990). *Essentials of Experimental Surgery*, Butterworths, London.

National Research Council (2003). *Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research*, National Academies Press, Washington, DC.

Swindle MM (1998). *Surgery, Anesthesia and Experimental Techniques in Swine*, Iowa State University Press, Ames.

Swindle MM and Adams RJ (1988). *Experimental Surgery and Physiology: Induced Animal Models of Human Disease*, Williams and Wilkins, Baltimore.

Swindle MM, Nolan T, Jacobson A, Wolf P, Dalton MJ and Smith AC (2005). Vascular access port (VAP) usage in large animal species. *Contemporary Topics* 44:7–17.

Waynforth HB and Flecknell PA (1992). *Experimental and Surgical Technique in the Rat*, 2nd edition, Academic Press, London.

Education resources

DASIE (Dog Abdominal Surrogate for Instructional Exercises): A laminated fabric and polyurethane model designed and constructed to resist cutting, and to hold sutures in a manner similar to normal tissues. Used for practising aseptic technique, instrument handling, suturing and ligation. Available from DASIE International. E-mail: dasieinternational@hotmail.com

Digital Material for Trainers: A series of 12 digital video CDs covering handling, procedures, anaesthesia and surgery for common laboratory animals. Three CDs include interactive course notes. Purchasing information available at: <http://www.digires.co.uk/index.html>

Pain Assessment in the Rat. John Roughan and Paul Flecknell developed this CD that contains movies illustrating a behaviour-based pain scoring scheme in rats. Purchasing information available at: <http://www.lal.org.uk/digital/digital.html>

Principles of Surgery: This website from the University of Pennsylvania School of Veterinary Medicine includes videos of suture patterns and techniques. <http://cal.vet.upenn.edu/projects/surgery/index.htm>

Training in Basic Biomethodology for Laboratory Mice: National Human Genome Research Institute, Office of Laboratory Animal Medicine, National Institutes of Health. Request for copies should be sent to: rodent-cd@mail.nih.gov

Training in Survival Rodent Surgery: A CD-ROM that has been developed by the NIH - Animal Research Advisory Committee to assist in the development of proper surgical skills. It has three elements: simple suture patterns, rodent survival surgery and special considerations for aseptic surgery in transgenic mice.

Bazin J-E, Constantin J-M and Gindre G (2004). Laboratory animal anaesthesia: influence of anaesthetic protocols on experimental models. *Annales Francaises d'Anesthesie et de Reanimation* 23:811–818.

Benazon D (1974). Hypothermia. In: *Scientific Foundations of Anaesthesia*, 2nd edition, Scurr C and Feldman S (eds), William Heinemann Medical Books Ltd, London, 344–356.

Ben-Eliyahu S, Shakhar G, Rosenne E and Levison Y (1999). Hypothermia in barbiturate anesthetized rats suppresses natural killer cell activity and compromises resistance to tumour metastasis. *Anesthesiology* 91:732–740.

Bonnet F and Marret E (2005). Influence of anaesthetic and analgesic techniques on outcomes after surgery. *British Journal of Anaesthesia* 95:52–58.

- Bradfield JF, Schachtman TR, McLaughlin RM and Steffen EK (1992). Behavioral and physiological effects of inapparent wound infection in rats. *Laboratory Animal Science* 42:572–578.
- Chindavijak B, Belpaire FM, De Smet F and Bogaert MG (1988). Alteration of the pharmacokinetics and metabolism of propranolol and antipyrine elicited by indwelling catheters in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 246:1075–1079. Part III Surgical procedures.
- Chuang MS, Orvieto M, Laven BM, Gerber GS, Wardrip C, Ritch C and Shalhav A (2005). Comparison of external catheters with subcutaneous vascular access ports for chronic vascular access in a porcine model. *Contemporary Topics* 44:24–27.
- Cooper DM, McIver R and Bianco R (2000). The thin blue line: a review and discussion of septic technique and post procedural infection in rodents. *Contemporary Topics* 39:27–32.
- Cunliffe-Beamer, TL (1993). Applying principles of aseptic surgery to rodents. *AWIC Newsletter* 4(2).
- Danneman PJ, Griffith JW, Beyers TM and Lang CM (1988). Renal and vascular damage associated with indwelling vascular access devices. *Laboratory Animal Science* 38:511.
- Dantzer R (2001). Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? *Brain, Behavior and Immunity* 15:7–24.
- Deng J, St.Claire M, Everett C, Retiman M and Star RA (2000). Buprenorphine given after surgery does not alter renal ischemia/reperfusion injury. *Comparative Medicine* 50:628–632.
- Einstein R, Billing RL, Singh A and Chin I (2004). Implanted telemetry transmitters alter the noradrenergic response in vas deferens from mice. *Alternatives to Laboratory Animals* 32:171–176.
- Fagin KD, Shinsako J and Dallman MF (1983). Effects of housing and chronic annulation on plasma ACTH and corticosterone in the rat. *American Journal of Physiology* 245: E515–E520.
- Freeman AJ, Gardner CJ and Dodds MG (1990). An improved method for bonding heparin to intravascular cannulae. *Journal of Pharmacological Methods* 23:7–11.
- Hampshire VA, Davis JA, McNickle CA, Williams L and Eskildson H (2001). Retrospective comparison of rat recovery weights using inhalation and injectable anaesthetics, nutritional and fluid supplementation for right unilateral neurosurgical lesioning. *Laboratory Animals* 35:223–229.
- Hayes KE, Raucci JA, Gades NM and Toth LA (2000). An evaluation of analgesic regimens for abdominal surgery in mice. *Contemporary Topics* 39:18–23.
- Heavner JE (1994). Physiological effects of anesthetics and analgesics. In: *Research Animal Anesthesia, Analgesia and Surgery*, Scientists Centre for Animal Welfare, Smith AC and Swindle MM (eds), Washington DC, 41–58.
- Heindorff H, Almdal T and Vilstrup H (1990). Contradictory effects of uncomplicated versus complicated abdominal surgery on the hepatic capacity for urea synthesis in rats. *Journal of Surgical Research* 49:239–243.

- Johnson RW (2002). The concept of sickness behavior: a brief chronological account of four key discoveries. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 87:443–450.
- Kirsch JH, Klaus JA, Blizzard KK, Hurn PD and Murphy SJ (2002). Pain evaluation and response to buprenorphine in rats subjected to sham middle cerebral artery occlusion. *Contemporary Topics* 41:9–14.
- Lapchik, VBV; Mattaraia, VGM; Ko, GM. (2009), *Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório*, Editora Atheneu, 1ª Edição.
- Liles JH and Flecknell PA (1993). The effects of surgical stimulus on the rat and the influence of analgesic treatment. *British Veterinary Journal* 149:515–525.
- Lockwood LL, Silbert KH, Laudenslager ML, Watkins, LR and Maier SF (1993). Anesthesia induced modulation of in vivo antibody levels: a study of pentobarbital, chloral hydrate, methoxyflurane, halothane and ketamine/xylazine. *Anesthesia and Analgesia* 77:769–774.
http://gestaoderesiduos.ufsc.br/files/2014/10/guia_pratico_descarte_residuos_Butantan.pdf
- Messier C, Emond S and Ethier K (1999). New techniques in stereotaxic surgery and anesthesia in the mouse. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 63:313–318.
- Morris TH (1995). Antibiotic therapeutics in laboratory animals. *Laboratory Animals* 29:16–36.
- NHMRC (National Health and Medical Research Council) (2004). *Australian Code of Practice for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes*, 7th edition, NHMRC, Canberra. Part III Surgical procedures.
- National Research Council (2003). *Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research*, National Academies Press, Washington, DC.
- Paulose CS and Dakshinamurti K (1987). Chronic catheterisation using vascular access port in rats: blood sampling with minimal stress for plasma catecholamine determination. *Journal of Neuroscience Methods* 22:141–146.
- Pearson ML (1996). Guidelines for prevention of intravascular-device-related infections. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 17:438–473.
- Popp MB and Brennan MF (1981). Long-term vascular access in the rat: importance of asepsis. *American Journal of Physiology* 241:H606–H612.
- Rembert MS, Smith JA and Hosgood G (2004). A comparison of a forced-air warming system to traditional thermal support for rodent microenvironments. *Laboratory Animals* 38:55–63.
- Reyes L, Tinworth KD, Li KM, Yau DF and Waters JA (2002). Observer-blinded comparison of two non-opioid analgesics for postoperative pain in piglets. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 73:521–528.
- Roughan JV and Flecknell PA (2000). Effects of surgery and analgesic administration on spontaneous behaviour in singly housed rats. *Research in Veterinary Science* 69:283–288.

Roughan JV and Flecknell PA (2003). Evaluation of a short duration behaviour-based postoperative pain scoring system in rats. *European Journal of Pain* 7:397–406.

Rowland RR, Reyes E, Chuhwuocha R and Tokuda S (1990). Corticosteroid and immune responses of mice following mini-osmotic pump implantation. *Immunopharmacology* 20:187–190.

Russel, W.M.S.; Burch, R.L. 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique*, Methuen, London.

Salo M (1992). Effects of anaesthesia and surgery on the immune response. *Acta*

Anaesthesiologica Scandinavica 36:201–220.

Sampath LA, Saborio DV, Yaron I and Modak S (2001). Safety and efficacy of an improved antiseptic catheter impregnated intraluminally with chlorhexidine. *Journal of Infusion Nursing* 24:395–403.

Sharp J, Zammit T, Azar T and Lawson D (2003). Recovery of male rats from major abdominal surgery after treatment with various analgesics. *Contemporary Topics* 42:22–27.

Sherertz RJ, Carruth WA, Marosok RD, Espeland MA, Johnson RA and Solomon DD (1995). Contribution of vascular catheter material to the pathogenesis of infection: the enhanced risk of silicone in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research* 29:635–645.

Stasiak KL, Maul D, French E, Hellyer PW and Vandewoude S (2003). Species-specific assessment of pain in laboratory animals. *Contemporary Topics* 42:13–20.

Stewart LSA and Martin WJ (2003). Influence of postoperative analgesics on the development of neuropathic pain in rats. *Comparative Medicine* 53:29–36.

Thornton PD and Waterman-Pearson AE (1999). Quantification of pain and distress responses to castration in young lambs. *Research in Veterinary Science* 66:107–118.

Thurmon JC and Benson GJ (1987). Pharmacological consideration in selection of anesthetics for animals. *Journal of the American Veterinary Association* 191:1245–1253.

Tornatzky W and Miczek KA (1993). Long term impairment of autonomic circadian rhythms after brief intermittent social stress. *Physiology and Behavior* 53:983–993.

van Ruiven R, Meijer GW, van Zutphen LFM and Ritskes-Hoitinga J (1996). Adaptation period of laboratory animals after transport: a review. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science* 23:185–190.

Wyatt I, Coutts CT, Foster PM, Davies DT and Elcombe CR (1995). The effect of implantation of osmotic pumps on rat thyroid hormone and testosterone levels in the plasma, an implication for tissue 'S' phase studies. *Toxicology* 95:51–54.

CONCEA

Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL