

ANEXO I

INTRODUÇÃO	3
1. BEM ESTAR ANIMAL	3
1.1. Definições: Dor, Distresse e Sofrimento	4
1.2. Efeitos do bem-estar de um animal em resultados científicos.....	5
2. MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS	5
3. PLANEJAMENTO DE NOVOS PROTOCOLOS	8
3.1. Modelos animais.....	9
3.1.1. Escolhendo o animal adequado.....	10
3.1.2. Origem dos animais.....	10
3.1.3. Transporte dos animais.....	10
3.1.4. Aclimatação e quarentena.....	11
3.1.5. Alojamento e manejo.....	11
3.2. Biossegurança	12
3.2.1. Biossegurança em Biotérios	13
3.3. Desenho experimental.....	13
3.3.1. Análise estatística.....	15
3.3.2. Métodos utilizados.....	15
3.3.3. Após a coleta de dados.....	15
3.4. Prevenção da dor e do distresse potencial.....	16
3.4.1. Estudos piloto.....	16
3.4.2. Testes Toxicológicos.....	17
3.4.3. Graus de invasividade.....	19
3.5. Desenvolvimento de estratégias para avaliar, minimizar e monitorar dor e distresse.....	20
3.5.1. Avaliação do impacto de efeitos adversos sobre o bem estar.....	20
3.5.2. Definição de sinais apropriados ou critérios de monitoramento.....	21
3.5.3. Sinais gerais de alteração do comportamento normal.....	21
3.5.4. Sinais específicos de alteração do comportamento normal.....	21
3.5.5. Pontos finais humanitários.....	22
3.5.6. Procedimentos em casos de presença de sinais de perda do bem estar.....	23
3.5.7. Treinamento.....	23
3.5.8. Abordagem em equipe.....	23
3.5.9. Documentando a estratégia de monitoramento.....	23
3.5.10. <i>Checklist</i> de monitoramento.....	24
3.5.11. Especificidade de um checklist de monitoramento	24
3.5.12. Envolvendo a Comissão de ética para uso de animais.....	24

3.6. Treinamento de Pessoal	25
4. OBTENÇÃO DE APROVAÇÃO PARA NOVOS PROTOCOLOS DE PESQUISA.....	25
4.1. Comissões de ética no uso de animais (CEUAs).....	25
4.2. Submetendo uma proposta ao comitê de ética para o uso de animais.....	25
4.2.1. Antes de iniciar seu trabalho.....	25
4.2.2. Se for usar animais, os seguintes dados deverão constar no protocolo de estudo.....	26
4.2.3. Quando do procedimento experimental: método.....	26
Tabela 1 - Orientação para cuidados com o bem estar animal em protocolos de pesquisa experimental.....	27

INTRODUÇÃO

Guia Brasileiro de Criação e Utilização de Animais para Atividades de Ensino e Pesquisa 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, cria o CONCEA, representa uma mudança de paradigma no que tange o uso de animais para ensino e pesquisa no Brasil. Como Lei Federal, gerou condições para que se estabeleça uma política nacional para o uso de animais no ensino e na pesquisa. Neste sentido, a pertinência, bem como a análise crítica da real necessidade do uso de animais de laboratório 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 da área da Ciência de Animais de Laboratório, constituindo-se em um documento que tem por finalidade nortear pesquisadores quanto ao uso de animais para ensino e pesquisa..

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

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.

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 dos resultados pretendidos em seus projetos de pesquisa e atividades didáticas. Preenchidas estas 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 – MCTI).

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 constitui-se em maus tratos.

1. BEM ESTAR ANIMAL

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

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

Existem várias definições de bem estar animal e quase todas o caracterizam como sendo 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 esta 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 (advindos da pesquisa ou atividade didática). Não se pode deixar de citar que o custo para o bem estar de animais criados, mantidos e usados para procedimentos científicos possui dois componentes distintos: o primeiro é o custo inerente que compreende os aspectos negativos da produção e cuidados que podem ser causados por atos de desconhecimento ou omissão 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 no seu bem estar; seja porque os animais serão expostos a manipulações diversas; à 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 deve ser minimizada ou evitada. Este item é tão importante quanto alcançar os objetivos científicos ou didáticos;
- Seguir os Princípios Éticos da Experimentação Animal;
- 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;
- Prover alojamento, ambiente e controle ambiental adequados para a espécie;
- Realizar manejo adequado para a espécie e prever que o mesmo 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 a uma Comissão de Ética antes de executá-lo.

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 estas definições para animais de laboratório.

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.

Entretanto, o pessoal envolvido com experimentação animal deve conhecer os conceitos de dor, distresse e sofrimento e saber como reconhecer, avaliar, controlar e, preferencialmente, prevenir esta

experiência em seus animais. Não há um consenso sobre a definição destes termos, mas para o propósito deste guia, as definições descritas na Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos – DBCA, serão usadas.

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 experimentais 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 destes 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 destes fatores durante a coleta e interpretação de dados. A dor e o distresse devem, sempre que possível, serem minimizados de acordo com o objetivo do estudo, para que sejam evitadas alterações fisiológicas e comportamentais associadas a estes fatores.

Além dos efeitos dos procedimentos da pesquisa no seu bem-estar, os animais podem também ficar expostos a uma série de estressores presentes em seu ambiente. Entretanto, quando esses efeitos são incidentais e não fazem parte do protocolo experimental, 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 no 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 impubescíveis;
- 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.

2. 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 vivissecção. 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 experimentação e representou um marco na discussão sobre a utilização de animais para a avaliação de toxicidade. A partir deste movimento, o princípio dos 3R’s (Reduction, Refinement e Replacement) para o uso de animais é 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 de experimentação na pesquisa biomédica, ensaios ou ensino.**

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

Nos anos posteriores, o avanço da ciência evidenciou as diferenças metabólicas e de respostas que controlam a homeostasia tecidual entre animais 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 através 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 a 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 ZEBET (Zentralstelle zur Erfassung/Bewertung von Ersatz und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch – National Centre for Documentation and Evaluation of Alternative Methods to Animal Experiments). Em 1991 é criado o ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) a partir da diretiva de 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 ICCVAM (Interagency Coordinating Center for the Validation of Alternative Methods). O ICCVAM é composto por 15 Agências regulatórias e de pesquisa, dentre as quais incluem a Environmental Protection Agency (EPA), a Food and Drug Administration (FDA) e a Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), sendo que essas fornecem ou utilizam informações dos testes toxicológicos para o processo de avaliação do risco. O Comitê coordena, através 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 JaCVAM (Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods) e em 2012 foi estabelecido no Brasil o BraCVAM (Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos), 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 diretiva de cosméticos (76/768/EEC) proibiu o teste de ingredientes de cosméticos e do produto final acabado em animais (testing ban) e proibiu a comercialização de produtos cosméticos acabados (ou seus ingredientes) que tiverem 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 Comunidade 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 Comunidade Europeia num 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 através de cálculos por exemplo a indicação de vias de administração ou de exposição, 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.

Frente a este panorama regulatório, a Comunidade 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 UERL ECVAM (European Union Reference Laboratory ECVAM), responsável por coordenar e promover o desenvolvimento de métodos alternativos (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:en:PDF>). A partir também desta Diretiva de 2010, os estados membros foram convocados a contribuir para esta 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 para teste diretrizes que não se enquadram dentro das quatro seções). De especial interesse, é na seção 4 que os métodos alternativos ao uso de animais são publicados (<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdguidelinesforhetestingofchemicals.htm>).

A Lei nº 11.794, de 08 de Outubro de 2008 (Lei Arouca), regulamentada através do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, regulamenta a criação e a utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica, em todo o território nacional e cria o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). A este Conselho compete, dentre outras, monitorar e avaliar a introdução de técnicas alternativas que substituam a utilização de animais em ensino e pesquisa. Esta 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 17 do Conceca, a qual determina a substituição do uso de animais por métodos alternativos quando disponíveis e descreve o processo de reconhecimento de métodos alternativos validados e com aceitação regulatória internacional.

De forma complementar às Leis Nacionais, recentemente o Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) estabeleceu, através 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 através do auxílio e do treinamento técnico nas metodologias necessárias;
- monitorar periodicamente o desempenho dos laboratórios associados através de comparações inter-laboratoriais;
- promover a qualidade dos ensaios através do 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); e
- contribuir para o desenvolvimento, a validação e a certificação de novos métodos alternativos ao uso de animais.

A RENAMA disponibilizará, através 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. Desta forma a RENAMA contribuirá para a garantia da qualidade dos serviços ofertados ao setor produtivo e 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 Européias 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 neste 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 este fim, uma vez que só estão disponibilizados aqueles que se consideram validados.

3. PLANEJAMENTO DE NOVOS PROJETOS

Esta seção fornece informações para auxiliar pesquisadores e docentes a decidir se experimentos com animais são necessários para atingir os objetivos propostos. Se, para projetos cujo uso dos animais é justificado, existem informações para todas as etapas da condução da pesquisa ou atividade didática. Entre elas destacam-se: a escolha correta do animal, sua origem, a forma de seu transporte e o tipo de abrigo; o planejamento do experimento ou atividade didática; a previsão e minimização da dor e das repercussões negativas para a saúde do animal, treinamento de pessoal e a publicação dos dados.

Pesquisadores e docentes são responsáveis ética e legalmente por garantir que os princípios de Redução, Refinamento e Substituição 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 ou não ser alcançados por meio de métodos alternativos, tais como cultura de tecidos, modelos matemáticos, métodos *in silico*, etc.

Os pesquisadores e 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 docentes antes de submeterem uma proposta de uso de animais à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA). 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.

A colaboração entre pesquisadores (intra- e inter-institucional) concorre para reduzir o número de animais ou para a quantidade de tecido animal necessária para conduzir um estudo ou responder 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, cada CEUA deverá analisar, aprovar e monitorar o componente do projeto a ser realizado em instalações sob sua responsabilidade.

Atividades científicas envolvendo animais serão mais bem vistas se forem percebidas como um esforço colaborativo entre pesquisadores, especialistas em cuidado animal, equipe técnica, professores e alunos. Para este fim, todos os que trabalham com animais de laboratório devem possuir treinamento e suporte adequados, e desta forma poderem cuidar e utilizar animais em obediência ao CONCEA.

Isso garantirá que:

a dor e o desconforto nos animais serão mínimos;

todo o pessoal envolvido possui o conhecimento e as habilidades necessárias ao uso de animais;

a segurança pessoal daqueles que realizarão a experiência 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 humanas e animal, adviram de estudos comparativos utilizando animais. Nesse contexto, estes 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.
 - A variabilidade genética pode reduzir a precisão dos resultados e desta 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.
 - 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 uma melhor compreensão dos efeitos e consequências específicas da manipulação experimental. O fornecedor deve fornecer atestados sanitários, que esclareçam o pesquisador quanto ao estado sanitário dos animais com os quais ele estará trabalhando.
- **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 humanos.

3.1.2. Origem dos animais

A maior parte das espécies animais utilizadas em atividades científicas é criada especificamente para esse fim, principalmente os roedores. Por esta 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 em instituições não credenciadas no CONCEA, é responsabilidade do pesquisador principal e da CEUA de sua instituição garantir que os animais a serem utilizados tenham qualidade condizente com os objetivos do estudo.

É imprescindível que os pesquisadores definam a origem de seus animais nos projetos encaminhados às CEUAs.

3.1.3. Transporte dos animais

O transporte de animais de laboratório é potencialmente estressante devido aos vários riscos a que os animais estão sujeitos. Problemas de diferentes natureza 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. É vital a troca de informações claras entre a pessoa que despacha os animais e a que recebe para minimizar o máximo possível o tempo de permanência dos animais fora do seu ambiente próprio. Atenção especial deve ser dada ao transporte de animais geneticamente modificados, estes devem atender as exigências da Comissão Interna de Biossegurança e, quando necessário, da Comissão Técnica Nacional Biossegurança.

Alguns fatores que podem causar estresse aos animais são: o barulho excessivo, movimento das gaiolas de transporte, 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 e seja capaz de reconhecer sinais de desconforto e dor;
- assegurar que o tempo de transporte seja o mínimo possível.

3.1.4. Aclimação e quarentena

Animais de laboratório são extremamente sensíveis ao novo, seja este o ambiente ou alterações do mesmo; outros animais ou pessoas e estes 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 na pesquisa. Quanto à extensão deste 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 irão trabalhar com eles. No caso de pesquisadores este período é importante para que se familiarizarem com 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 todos os dados inesperados devem ser registrados para detectar problemas de saúde e serem tomadas as medidas necessárias para saná-las. 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 criação.

Idealmente, aclimação e quarentena serão combinadas.

3.1.5. Alojamento e manejo

As condições ambientais afetam a biologia e o conforto 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 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 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 do mesmo alojamento, pode ser necessária a indicação de um local específico para ele. Exigências podem também ser direcionadas pelo estado reprodutivo do animal, necessidades da pesquisa e experiência anterior de alojamento.

Necessidades ambientais específicas para uma espécie, tais como iluminação, temperatura, qualidade do ar, ciclos apropriados luz e proteção contra ruídos excessivos e vibrações, deverão ser

providenciadas. O acesso rápido ao alimento e à água e o fornecimento regular de acomodações limpas e livres de parasitas e patógenos, também precisam ser consideradas.

Com relação à alimentação, animais possuem necessidades específicas de nutrientes nos diferentes estágios de suas vidas. Há uma variabilidade considerável nas dietas preparadas comercialmente, que podem conter ingredientes, contaminantes ou erros na composição que podem afetar os resultados da pesquisa ou o bem estar do animal. Ao utilizar dietas balanceadas e reconhecidas internacionalmente para os 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 da ração e a frequência de fornecimento. Más condições de armazenamento podem resultar em contaminação por bactérias ou perda da bioatividade de suplementos.

3.2. Biosegurança

A biossegurança deve ser entendida como elemento de grande importância e integrar-se rotineiramente em qualquer atividade, principalmente nos laboratórios onde os riscos (sejam químicos, físicos ou biológicos) estejam presentes em maior grau. 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, a preservação do meio ambiente e a qualidade dos resultados. Biossegurança como condição de segurança deve ser alcançada através de um conjunto de ações destinadas a prevenir, controlar, reduzir ou eliminar riscos inerentes às atividades que possam comprometer a saúde humana, animal, vegetal e o meio ambiente. (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 e 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 as condições estabelecidas pela Resolução Normativa Nº 2, de 27 de novembro de 2006, da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), que define organismo como: toda entidade biológica capaz de reproduzir ou transferir material genético, inclusive vírus e outras classes que venham a ser conhecidas; Desta forma, sempre que se manipular organismos OGM as diretrizes definidas na Resolução Normativa Nº 2 deverão ser obedecidas. Por outro lado, os setores que manipulam OGMs ficam, também, obrigados por lei a requisitarem o Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) a CTNBio, conforme a lei nº 11.105, de 24 de março de 2005 e resolução normativa nº1, de 20 de junho de 2006 (alterada pela resolução normativa nº11, de 22 de outubro de 2013), além de atenderem rigorosamente às RN emanadas da CTNBio na sua área de atuação, sem o que estarão trabalhando à margem da Lei. De grande relevância é a conscientização de que a espinha dorsal da prática da biossegurança é a avaliação de risco e as auto-inspeções periódicas de biossegurança. Apesar das ferramentas disponíveis para ajudar nesta 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 estão sendo considerados para o uso. É fundamental o domínio dos equipamentos laboratoriais, dos modelos animais e dos equipamentos de contenção que podem ser utilizados, bem como das instalações disponíveis.

3.2.1 Biossegurança em biotérios

A biossegurança em biotérios assume uma dimensão diferenciada de outras atividades em função da presença do animal. Esse elemento diferenciador assume grande importância pelo risco biológico agravado, em virtude de circunstâncias especiais do trabalho ou das condições em que este se realiza. 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. Os microrganismos e parasitas merecem cuidadosas normas de biossegurança devido às zoonoses. 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 – torna os biotérios ambiente propício para o desenvolvimento de alergias. Fora isso, a agressão animal, presente no manejo, pode causar ferimentos e determinar infecções. As instalações de experimentação animal assumem papel de maior importância tendo em vista os riscos potenciais e efetivos dos experimentos com agentes patogênicos de diferentes classes de risco. Consequentemente, os aspectos de biossegurança, relacionados às atividades com animais de laboratório, são amplos, uma vez que podem estar envolvidos diferentes riscos, alguns comuns a todos os animais e, outros, únicos e diferentes em grau. Os riscos específicos ficam, portanto, na dependência das espécies animais envolvidas e da natureza da atividade de pesquisa. Quanto às medidas específicas de segurança para experimentação animal com agentes perigosos, deve ser dada especial atenção aos procedimentos sobre cuidados e alojamento de 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 e carcaças e proteção pessoal. Exige-se o emprego de equipamento de segurança específico, bem como um ~~o seu~~ manejo adequado, além de práticas laboratoriais seguras. Em suma, para uma segurança eficaz, é necessário pessoal treinado e que siga rigorosamente a aplicação das normas de proteção contra riscos. Claro é que os indivíduos que lidam com animais de laboratório, em locais de pesquisa com agentes infecciosos, apresentam um risco muito maior de exposição devido às mordidas, arranhões e aerossóis emanados por eles. Os técnicos envolvidos diretamente na pesquisa, e os que estão presentes nas instalações, devem receber equipamentos de proteção individual-EPI e as instalações devem ser adequadas e sempre que possível credenciadas pelo órgão competente. Logo, um programa eficiente de *saúde, biossegurança e ambiente* deve concentrar seus esforços para que os riscos inerentes ao uso experimental de animais sejam reduzidos a níveis aceitáveis. Possíveis riscos – como mordidas de animais, agentes químicos de limpeza, alérgenos e zoonoses conforme referenciado anteriormente – devem ser identificados e avaliados. Portanto, cada laboratório 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 a estes perigos.

3.3. Desenho experimental

A experimentação científica deve ser bem planejada e contar com um desenho experimental adequado.

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

Os pesquisadores devem garantir que, seus desenhos experimentais, os objetivos e as hipóteses presentes, estejam plenamente considerados e completados antes do início de qualquer ensaio envolvendo animais.

3.3.1. Análise estatística¹

Como ressaltado acima, desenhos experimentais 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 e durante o plano experimental, a fim de que saibam, antecipadamente, como os dados serão analisados.

Outro ponto que deve ser considerado ao desenhar um experimento 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.

Experiências bem concebidas e analisadas corretamente podem levar a uma redução no uso de animais e aumentar a validade científica dos resultados. Um experimento bem concebido deve ser:

◆ **Imparcial**

Quando dois ou mais grupos de tratamento 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 grupos de tratamento (um processo físico é necessário, por exemplo, jogar uma moeda, a escolha de um número)
- Assegurar que todos os tratamentos subsequentes (incluindo alojamento) sejam aplicadas em uma ordem aleatória
- Garantir que os investigadores que analisam os resultados experimentais não tenham conhecimento do tratamento recebido (duplo-cego) até a análise estatística final.

◆ **Poder de Análise Adequado** (ou seja, uso de animais suficientes).

Experimentos robustos são aqueles que têm a oportunidade máxima de detectar um efeito verdadeiro do tratamento. O poder de análise (robustez) é obtido por:

- Uso de um número adequado de animais (tamanho da amostra)
- Controle da variação inter-sujeito (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 aumentado pelo aumento do tamanho da amostra, uma experiência desnecessariamente grande desperdiçará animais e recursos científicos.

Varição é controlado através 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 reduzidos em delineamento experimental adequado, por meio de uso de bloco randomizado ou experimentos 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%)

¹ O NC3Rs (Centro Nacional para a Substituição, Refinamento e Redução de Animais para Pesquisa) 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). Dentre suas atividades, o NC3Rs desenvolveu um roteiro para auxiliar o delineamento experimental e análise estatística. A versão original e em inglês deste roteiro pode ser encontrado no seguinte endereço eletrônico: <http://www.nc3rs.org.uk/>.

- 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 online 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 experiência comparando quatro tratamentos, utilizando seis ratos por tratamento, terá $N = 24$ (6×4) e $T = 4$, então $E = 24 - 4 = 20$. Isto está dentro da faixa aceitável. No entanto, pode haver boas razões para ir acima desse limite superior. Se E for 30 ou 40, a experiência pode ser muito grande, possivelmente desperdiçando recursos. Esta 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. Estes efeitos podem ser estudados de forma eficiente utilizando desenhos experimentais fatoriais.

Desenhos experimentais 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 experimentais a metade dos sujeitos são fêmeas e a outra metade machos. Um experimento 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 experiências diferentes.

◆ **Seja simples e eficiente**

Experiências não deve 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 uma grande experimento para assegurar que o estudo é logisticamente eficiente e para dar alguma indicação preliminar de resultados prováveis. Todos os experimentos devem ser pré-planejados e não podem ser alterados enquanto estiverem em andamento.

◆ **Indique a faixa de certeza**

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

3.3.2. Métodos utilizados

Antes de iniciar uma pesquisa, também é importante certificar-se 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 deve ser considerada no planejamento do projeto. A metodologia, os dados e suas análises devem estar acessíveis a outros

pesquisadores e desta forma pode contribuir para a redução e refinamento do uso de animais por outros grupos de pesquisa. Esta 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 do experimento;
- O animais utilizados (ex.: espécies, linhagens, fontes, tipos, estado sanitário);
- Condições de transporte e a duração do período de aclimatação antes do experimento;
- Condições do alojamento do animal, da alimentação e da água;
- Os métodos estatísticos utilizados para analisar os dados.

3.4. Prevenção da dor e do distresse potencial

Todo protocolo de pesquisa deve descrever claramente os pontos finais (“endpoints”) que serão utilizados. Estes pontos finais devem ser adequados para a espécie utilizada no estudo e o monitoramento das condições deve ser feita para cada animal envolvido. Idealmente os objetivos científicos do protocolo de pesquisa devem ser atingidos sem afetar negativamente o bem estar animal. Entretanto, muitas vezes não é possível atingir os objetivos nesta condição ideal, assim deve se considerar: os requisito científicos do protocolo; efeitos negativos previstos e/ou esperado 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 protocolo que podem ter impacto para o animal, não estão limitadas unicamente, aos procedimentos experimentais. Outras fontes potenciais de dor, estresse e distresse podem ser consideradas, tais como captura, transporte, manuseio, contenção, alojamento, ambiente social e físico, manipulação genética entre outros. A prevenção de dor e distresse potencial requerem conhecimento do controle e manuseio do animal, seu comportamento normal e o que pode ser esperado se os procedimentos utilizados causarem efeitos adversos nele.

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 protocolos e a reduzir o impacto adverso nos modelos, antes que experimentos empregando um grande número de animais sejam realizados.

Estudos piloto devem ser considerados como parte importante de um projeto e devem ser avaliados pela CEUA com os mesmos critérios aplicados na aprovação dos ensaios. Quando o estudo piloto fizer parte do protocolo enviado à CEUA, a aprovação do projeto deve necessariamente estar condicionada a apresentação dos resultados provenientes deste estudo inicial.

Um estudo piloto, ou de viabilidade, é um pequeno experimento destinado a testar a logística e reunir informações antes de um estudo mais amplo, a fim de melhorar a qualidade e eficiência deste último. Ela pode revelar deficiências na concepção de um projeto de pesquisa ou procedimento, os quais poderão ser tratadas antes que animais, tempo e recursos sejam gastos em estudos em larga escala. Experiências em animais não são normalmente realizadas de forma isolada, mas fazem parte de um programa de pesquisa. 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 o experimento 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 sozinho possa fornecer os dados adequados sobre a variabilidade e o poder da análise que determina o número de animais a serem incluídos num estudo bem desenhado. Uma revisão sistemática da literatura, ou mesmo uma única publicação pode ser uma fonte mais adequada de informações sobre a variabilidade. O estudo piloto pode, contudo, fornecer informações vitais sobre a gravidade dos procedimentos ou tratamentos propostos.

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

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

- Verifique se as instruções dadas aos pesquisadores (por exemplo, procedimentos de randomização) são compreensíveis.
- Verifique se os pesquisadores e técnicos estão suficientemente qualificados nos procedimentos.
- Verifique o funcionamento dos equipamentos.
- Verifique se o animal experimental 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) causadas pelo procedimento, bem como a eficácia das ações para reduzi-los (por exemplo, taxa de dose de analgesia e cronograma).
- Defina antes desfechos humanitários.

◆ **O que fazer com os dados / informações**

As informações obtidas sobre as questões logísticas devem ser incorporados ao desenho do estudo principal. Como o objetivo de um estudo piloto é avaliar a viabilidade de um experimento é muito raro apresentar mais que um resumo dos dados estatísticas. Na verdade, os dados podem ser irrelevantes se problemas com os métodos são descobertos.

Se um estudo piloto não leva a modificação de materiais ou procedimentos, em seguida, os dados podem ser incorporados no estudo principal. A estratégia de amostragem utilizado para selecionar os animais, e a possibilidade de mudanças ao longo do tempo devem ser cuidadosamente considerados antes de incorporar dados de estudos piloto. Mesmo que os dados do estudo piloto não sejam utilizadas deste 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 experiência principal, como esta pode contribuir para o desenho em estudos futuros.

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

Referências

Lancaster GA, Dodd S, Williamson PR (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](https://doi.org/10.1111/j.2002.384.doc.x).

Ruxton GD, Colegrave N (2006). [Experimental Design for the Life Sciences](#) (2nd edition). Oxford University Press.

Cochran WG, Cox GM (1992). *Experimental Designs* (2nd Edition). John Wiley & Sons.

Altman DG (1991). [Practical Statistics for Medical Research](#). Chapman & Hall.

Festing MF 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.

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, 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 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 e para o próprio homem sejam considerados por agências regulatórias, é necessário que guias nacionais e os internacionalmente aceitos sejam seguidos, bem como suas recomendações. Com relação aos estudos acadêmicos e de pesquisa, recomenda-se que estes 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**

Estão disponíveis para uso, vários protocolos internacionalmente aceitos para 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 experimental 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 6 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. Estes estudos são de longa duração, prolongando-se por quase toda a vida do animal (roedores) e diante desta situação, recomenda-se que sejam desenvolvidos somente em instalações animais com condições sanitárias e estruturais capazes de manter a vida destes 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, cromossomos). 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 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. 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 internacionais e que estão descritos nos documentos regulatório. 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 Económico 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 esta 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 a molécula (pKa, pH, estrutura química, caracterização etc) que poderá determinar através 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, CEUAs e todos os responsáveis pelos cuidados dos animais nos procedimentos, de quando há risco de dor e distresse para os modelos.

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

Esta classificação está contida na DBCA 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 e distresse como consequência da alteração genética. Devemos, neste caso, classificar corretamente o grau de invasividade para poder atender às necessidades de cuidados especiais destes animais.

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

Para cada protocolo 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 irá conduzir o monitoramento e seu treinamento;
- Sistema para registrar as observações.

Todos os aspectos de uso e manejo dos animais, incluindo a manipulação e alojamento, que podem impactar negativamente o seu bem estar, bem como a estratégia para que esse impacto seja minimizado, deve estar presente na proposta enviada a CEUA.

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 dos animais não poderem comunicar suas experiências diretamente aos humanos, sua dor e distresse somente podem ser avaliadas por observação de seu comportamento e fisiologia. O desafio é medir ou avaliar estes sinais no animal e determinar quando uma resposta ao estresse se desenvolve a ponto de resultar em um efeito nocivo sobre o seu bem-estar e levar 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 protocolo de pesquisa;
- Relevância de critérios para os tipos específicos de protocolos 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;
 - O momento provável do início dessas 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 desfechos 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 externos. 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 este 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 este 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 num 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 moderadas. 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 ex: em um modelo animal de falência crônica renal, marcadores bioquímicos de função renal seriam utilizados para reconhecer o início e avanço da doença, juntamente 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 nestas situações são resultados já publicados com protocolos semelhantes, e a experiência de outros pesquisadores, veterinários e técnicos. Nestes casos, o uso do conhecimento e da experiência humana para dor e desconforto, também pode ser útil na avaliação destes 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). Esta estratégia auxilia na compreensão da importância de critérios de monitoramento.

3.5.5. Pontos finais humanitários

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. Um ponto final humanitário deve permitir o alcance dos objetivos científicos do protocolo de pesquisa e ao mesmo tempo minimizar o sofrimento. Todo protocolo experimental de conter a descrições de pontos finais (endpoints) apropriados para espécie de animal de experimentação em uso.

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 e o distresse do animal sejam prevenidos, aliviados ou finalizados. Em protocolos experimentais 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 experimentais 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 um ponto final 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 isto permitir que o animal se recupere;
- Administrar tratamentos sintomáticos ou de suporte;
- Morte humanitária (eutanásia) do animal.

Deve-se destacar que não pode haver demora entre reconhecer e agir; o bem estar animal não está 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 estes elementos reais ou potenciais, os mesmos 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 monitoradas e estar sujeitas 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 veterinário com experiência apropriada;
- administrar um tratamento específico (ex.: um agente analgésico);
- submeter o animal à eutanásia;

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 dos quais um desfecho será determinado, devem ser competentes na avaliação da fisiologia, do comportamento e da condição geral, utilizando como referência o padrão normal destas variáveis, bem conhecer as alterações específicas esperadas. O grupo de pesquisa e a CEUA 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 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 eutanásia 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 recolhida de um animal caso a eutanásia se faça necessária na ausência da equipe de pesquisa.

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 NAD (nenhuma anormalidade detectada) 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 chefe 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 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 empregam 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 para uso de animais

Uma estratégia de monitoramento deve fazer parte do processo de solicitação à CEUA. A CEUA pode interferir na revisão dos critérios de monitoramento e pontos de intervenção mediante consulta à equipe de pesquisa. Desta forma, todos os critérios para monitoramento e ações subsequentes são acordadas e documentadas antes do início do projeto. A CEUA deve também garantir que os pesquisadores possuam a experiência e/ou treinamento apropriado 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 do treinamento 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 pode interferir com o bem-estar dos animais ou com os resultados de atividades de ensino e pesquisa.

Pesquisadores, professores ou usuários de animais devem ter treinamento ou experiência nos procedimentos que realizam. Caso contrário, necessitarão estar sob supervisão direta de uma pessoa competente no procedimento. O conhecimento dos preceitos éticos da experimentação animal 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 para ensino e 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 (CEUAs)

- É responsabilidade da CEUA, no âmbito de suas atribuições, cumprir e fazer cumprir o disposto na Lei 11794/08 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 credenciada no CONCEA, que manterá os animais durante a condução do projeto de pesquisa ou procedimento de ensino por garantir, em nome da instituição, que o uso de animais se dá em conformidade com a lei 11794/08 e seus dispositivos infra-legais; é justificado, e que os princípios dos 3R's (Redução, Substituição e Refinamento) são seguidos. Quando a atividade for conduzida a campo, a CEUA a se responsabilizar pelo projeto e, portanto, aprova-lo, deverá ser a da instituição (credenciada no CONCEA) do pesquisador principal ou, quando aplicável, a do patrocinador do estudo (credenciado no CONCEA).

4.2. Submetendo uma proposta ao comitê de ética para o uso de animais

Antes de submeter uma proposta à CEUA, pesquisador deve considerar as questões a seguir:

4.2.1. Antes de iniciar seu trabalho:

- O uso de animais é necessário?
- Existe alternativa ao uso dos animais? Se existem citar quais e porque 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 disponíveis?
- Todo o pessoal envolvido está adequadamente treinado? Tem algum conhecimento sobre a biologia e 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 no protocolo de estudo:

- Espécie e linhagem dos animais/inbred ou outbred/idade ou peso/sexo;
- Fonte de obtenção dos mesmos;
- Período de adaptação;
- Alojamento durante o experimento: 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 experimental: método

- A descrição dos procedimentos experimentais dependerá do propósito do estudo. Contudo, ao menos as seguintes informações deverão estar presentes:
- número de animais e qualquer tratamento prévio;
- esquema dos procedimentos, tais como hora em que serão realizados, intervalos de tomada de amostras, descrição genérica dos equipamentos utilizados. Em procedimentos dolorosos, indicar quais medidas serão adotadas para evitar ou reduzir, a dor e o sofrimento;
- grau de severidade;
- no caso de eutanásia o método que será utilizado deverá estar descrito claramente, independente dele ser aplicado durante ou ao final do experimento. Também deverá ser indicado como serão descartadas as carcaças.

Estudos adicionais ou alterações na proposta; eventos adversos ou imprevistos e a suspensão da pesquisa, deverão ser informados à CEUA.

A solicitação à CEUA deve conter informações suficientes para que a Comissão possa avaliar com segurança a proposta presente no projeto de pesquisa.

Em resumo o projeto deve incluir:

- o título do projeto;
- o cronograma estimado;
- os nomes, papéis e experiência de todo o pessoal;
- a fonte de animais e as licenças exigidas;
- detalhes de alojamento ;
- detalhes dos procedimentos que serão desenvolvidos;
- 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;
- uma justificativa para o uso de animais no projeto;
- considerações como riscos potenciais a outros animais ou humanos;
- declaração de que o projeto segue a legislação e princípios éticos.

A tabela abaixo pode ser utilizada para orientar os pesquisadores sobre questões que deverão ser consideradas ao planejar e conduzir protocolos de pesquisa. A tabela objetiva manter ou aumentar o bem estar e reduzir ao mínimo a dor e o distresse dos animais durante o desenvolvimento do projeto.

Tabela 1- Orientação para cuidados com o bem estar animal em protocolos de pesquisa experimental

PLANEJAMENTO DO ESTUDO	
Avalie se há alternativas ao uso de animais	
Preveja a extensão da dor e do distresse e encontre formas de evitá-las ou de minimizá-las	
Avalie a dor e o distresse antecipados individualmente versus causar menos dor em um número maior de animais	
Planeje o protocolo de pesquisa para durar o menor tempo possível	
Conheça o comportamento normal da espécie e os sinais de dor e de distresse	
Considere se as técnicas propostas são as melhores possíveis para serem empregadas	
CONDUÇÃO DO ESTUDO	
Monitore os animais para verificar alterações no comportamento e sinais de dor e de distresse ao longo do estudo	
Forneça tratamento paliativo para a dor nos animais, ex. cuidado pós-operatório, leitos confortáveis, temperatura e umidade ambientes ótimas, barulho mínimo, etc., incluindo anestesia ou analgesia	
Eutanásie 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 desfecho humanitário são adequados	
Técnicas de revisão e estratégia de promoção	
Continue a revisar as técnicas e a refiná-las sempre que possível	
Revise os POPs periodicamente	
Continue a revisar procedimentos voltados ao cuidado e à administração em instalações que contenham animais confinados.	
Continue a revisar os procedimentos voltados para a boa prática	
Relatando à CEUA	
Faça relatórios à CEUA conforme necessário	