

**UNIVERSIDADE DE SOROCABA  
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Catia Helena de Almeida Lima Massari**

**O BEM-ESTAR NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL COM ÊNFASE NA  
TOXICOLOGIA DA REPRODUÇÃO E DO DESENVOLVIMENTO**

**Sorocaba/SP**

**2014**

**Catia Helena de Almeida Lima Massari**

**O BEM-ESTAR NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL COM ÊNFASE NA  
TOXICOLOGIA DA REPRODUÇÃO E DO DESENVOLVIMENTO**

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marli Gerenutti

**Sorocaba/SP**

**2014**

### Ficha Catalográfica

Massari, Catia Helena de Almeida Lima  
M869b O bem-estar na experimentação animal com ênfase na toxicologia da  
reprodução e do desenvolvimento / Catia Helena de Almeida Lima Massari.  
-- Sorocaba, SP, 2014.  
151 f.

Orientadora: Profa. Dra. Marli Gerenutti.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de  
Sorocaba, Sorocaba, SP, 2014.  
Bibliografia: f. 129-151.

1. Bem-estar do animal. 2. Experimentação animal. 3. Animal de  
laboratório. 4. Métodos alternativos. 5. Toxicologia reprodutiva. 6.  
Toxicologia do desenvolvimento. I. Gerenutti, Marli, orient. II. Universidade  
de Sorocaba. III. Título.

**Catia Helena de Almeida Lima Massari**

**O BEM-ESTAR NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL COM ÊNFASE NA  
TOXICOLOGIA DA REPRODUÇÃO E DO DESENVOLVIMENTO**

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 18/12/2014.

**BANCA EXAMINADORA:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marli Gerenutti  
Universidade de Sorocaba

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina Corrêa Porto Rossi  
Universidade de Sorocaba

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Grotto  
Universidade de Sorocaba

Dedico este trabalho ao meu esposo,  
Marco Antônio Leite Massari, quem me  
apoiou, incondicionalmente, a cursar o  
mestrado, me mostrou a arquitetura da  
felicidade em viver ao seu lado e me deu  
a sorte de um amor tranquilo.

Dedico todo amor que houver nessa vida.

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Marli Gerenutti, pela acolhida tão afetiva desde o momento que indaguei a possibilidade de cursar pós-graduação *stricto sensu* na UNISO, por ter me apresentado à toxicologia da reprodução e do desenvolvimento, por acreditar na minha capacidade de pesquisa acadêmica e na relevância do bem-estar animal, pela paciência nos momentos de angústia. Sinceramente, foi uma imensa honra ter sido sua orientada!

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial, à Profa. Dra. Cristiane de Cássia Bergamaschi, à Profa. Dra. Denise Grotto e à Prof<sup>a</sup> Dra. Yoko Oshima Franco, pelos ensinamentos acadêmicos e pessoais.

Aos professores da Graduação em Medicina Veterinária, em especial, à Profa. Dra. Ana Carolina Corrêa Porto Rossi, à Profa. Dra. Andrea Cristina Higa Nakaghia e à Profa. Dra. Angélica Paula Grando, pelas valiosas contribuições ao meu aprimoramento na carreira docente. E aos seus alunos, com quem tive o prazer de conviver em palestras, propiciando-me ambientar à sala de aula do Ensino Superior.

Aos professores da Graduação em Pedagogia, sem qualquer exceção, que me abriram os olhos para a visão de mundo da Educação.

Ao Prof. Dr. Luis David Solis Murgas, da Universidade Federal de Lavras, pelo incentivo em pesquisar o bem-estar animal. E à Profa. Dra. Rita Leal Paixão, da Universidade Federal Fluminense, pelo incentivo em estudar a ética na experimentação animal. Agradeço, também, pela disponibilidade de ambos em me ajudar à distância.

Aos companheiros de mestrado, em especial, às amigas Lilian Adriana Agasi e Thaísa Borim Pickler, quem tive o privilégio de conhecer durante esta jornada.

À minha família, pela guarida nas mais árduas circunstâncias que enfrentei durante esses dois anos de curso, em especial, ao meu pai Osmar, à minha mãe Ana Lucia, a minha irmã Camila, aos meus sogros, e aos cachorrinhos Cinza e Caramelo.

A grandeza de uma nação pode ser julgada  
pelo modo que seus animais são tratados.

(Mahatma Gandhi)

## RESUMO

A experimentação animal, embora seja um dos pilares do conhecimento científico, vêm sendo questionada pela sociedade brasileira. A conscientização sobre o bem-estar dos animais de laboratório é uma demanda atual das práticas de ensino e pesquisa em todo o país. Com o objetivo de estudar como a ciência do bem-estar animal e os avanços na utilização de métodos alternativos podem aprimorar as investigações científicas, enfatizou-se a área da toxicologia da reprodução e do desenvolvimento. Realizou-se uma revisão de literatura do tipo integrativa através de método teórico descritivo e retrospectivo, por meio de um levantamento bibliográfico de artigos científicos, dissertações, teses e artigos de revisões e opiniões encontrados em bases virtuais de dados, além de livros e leis vigentes no Brasil. A partir de um extenso cotejamento de dados, os artigos abordando as boas práticas de laboratório foram direcionados a catorze subtemas: enriquecimento ambiental, ruídos, ventilação, condições higiênico-sanitárias, fisiologia animal, etologia, manejo, dieta, identificação individual, telemetria, anestesia e analgesia, eutanásia, demais aplicação dos “3Rs” e métodos alternativos. Diante disso, analisou-se que a preocupação com o bem-estar animal deve ser contínua e pertinente em todas as etapas de vida dos seres sencientes. Assim sendo, a interpretação da legislação brasileira e da regulamentação no que tange a pesquisa científica constitui uma obrigatoriedade aos que trabalham em biotérios e laboratórios no país. Conclui-se que a prevenção e a minimização de estresse, dor e desconforto em roedores é fundamento básico da investigação toxicológica uma vez que possuem razões éticas, argumentos legais e garantias científicas. Ressalta-se que a padronização das adequadas condições de bioterismo, aliada a projetos de pesquisa bem planejados e conscientes da incorporação (sempre que possível) de métodos alternativos são apresentados como etapas essenciais para a obtenção de resultados com alto grau de acuidade, elevado nível de reprodutibilidade e precisão. Por fim, acredita-se que a boa ciência e o bem-estar animal devem caminhar continuamente de mãos dadas.

**Palavras-chaves:** Bem-estar do animal. Experimentação animal. Animal de laboratório. Métodos alternativos. Toxicologia reprodutiva. Toxicologia do desenvolvimento.



## ABSTRACT

The animal experimentation, although it is one of the pillars of scientific knowledge, has been questioned by Brazilian society. Awareness of the laboratory animal welfare is a current demand of teaching practices and research across the country. In order to study how the science of animal welfare and the progress in the use of alternative methods can enhance scientific research, it emphasized the area of reproductive and developmental toxicology. This work is a review, made by a descriptive and retrospective study through scientific publications, dissertations, thesis, articles and critical papers found in virtual data bases, as well as books and applicable laws in Brazil. From an extensive readback data, studies addressing good laboratory practices were directed to fourteen sub-themes: environmental enrichment, noises, ventilation, sanitary conditions, animal physiology, ethology, management, diet, individual identification, telemetry, anesthesia and analgesia, euthanasia, other application of the "3Rs" and alternative methods. As a result, it is considered that the concern for animal welfare must be continuous and relevant at all stages of life of sentient beings. Therefore, the interpretation of Brazilian laws and regulations with respect to scientific research is a requirement for working in animal facilities and laboratories in the country. It concludes that prevention and minimization of stress, pain and discomfort in rodents is the basic foundation of toxicological research as they have ethical reasons, legal arguments and scientific guarantees. It evidences that standardization of appropriate laboratory conditions, combined with well planned research projects and aware of the merger (always when possible) of alternative methods are presented as essential steps to obtain results with high accuracy, high-level reproducibility and precision. Finally, it believes that good science and animal welfare must go continuously hand in hand.

**Keywords:** Animal welfare. Animal experimentation. Laboratory animal. Alternative methods. Reproductive toxicology. Developmental toxicology.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórios não-esteroidais
<i>BRACVAM</i>	<i>Brazilian Center for Validation of Alternative Methods</i>
CEUAs	Comissões de Ética no Uso de Animais
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
CIAEP	Credenciamento Institucional para Atividades com Animais em Ensino ou Pesquisa
CIUCA	Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais
CK	Creatinoquinase
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CRMV-SP	Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de São Paulo
DBCA	Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos
ECG	Eletrocardiograma
<i>ECVAM</i>	<i>European Centre for the Validation of Alternative Methods</i>
EEG	Eletroencefalograma
EMG	Eletromiografia
<i>FDA</i>	<i>Food and Drug Administration</i>
<i>FELASA</i>	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
<i>FETAX</i>	<i>Frog Embryo Teratogenesis Assay Xenopus</i>
IgA	Imunoglobulina A
LAPETOX	Laboratório de Pesquisa Toxicológica
MCTI	Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
<i>OECD</i>	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
<i>QSAR</i>	<i>Quantitative structure–activity relationship</i>
<i>REACH</i>	<i>Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals</i>
RENAMA	Rede Nacional de Métodos Alternativos

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Quadro 1 -</b>	Evolução da legislação nacional, estadual e municipal em relação à experimentação animal.....	<b>31</b>
<b>Quadro 2 -</b>	Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA).....	<b>34</b>
<b>Figura 1 -</b>	Sistematização dos “3Rs” em toxicologia da reprodução e do desenvolvimento.....	<b>39</b>
<b>Figura 2 -</b>	Indagação inicial da dissertação e temas científicos avaliados.....	<b>43</b>
<b>Figura 3 -</b>	<b>A)</b> Eleição e acesso aos artigos encontrados. <b>B)</b> Distribuição dos artigos selecionados que se encontraram disponíveis para consulta integral.....	<b>45</b>
<b>Figura 4 -</b>	Subtemas relacionados às boas práticas de laboratório.....	<b>46</b>
<b>Quadro 3 -</b>	Condições de alojamento e enriquecimento ambiental no biotério..	<b>52</b>
<b>Quadro 4 -</b>	Condições sonoras e ruídos presentes no ambiente de criação e de experimentação animal.....	<b>60</b>
<b>Quadro 5 -</b>	Condições de ventilação nos ambientes de criação e de experimentação animal.....	<b>63</b>
<b>Quadro 6 -</b>	Condições higiênico-sanitárias na criação de animais em biotérios.....	<b>66</b>
<b>Quadro 7 -</b>	Condições fisiológicas de animais usados com fins experimentais.....	<b>71</b>
<b>Quadro 8 -</b>	Condições etológicas e comportamentais de animais usados com fins experimentais.....	<b>75</b>
<b>Quadro 9 -</b>	Condições de manejo e cuidados com animais usados para fins experimentais.....	<b>81</b>
<b>Quadro 10 -</b>	Condições dietéticas (alimentar e hídrica) de animais usados com fins experimentais.....	<b>87</b>
<b>Quadro 11 -</b>	Métodos de identificação individual dos animais em biotérios.....	<b>90</b>
<b>Quadro 12 -</b>	Análise de parâmetros por intermédio da tecnologia de telemetria.	<b>92</b>
<b>Quadro 13 -</b>	Protocolos analgésicos e anestésicos administrados a animais de laboratório.....	<b>95</b>
<b>Quadro 14 -</b>	Protocolos para eutanásia de animais de laboratório.....	<b>103</b>
<b>Quadro 15 -</b>	Demais aplicações dos “3Rs” à experimentação animal.....	<b>107</b>
<b>Quadro 16 -</b>	Métodos alternativos <i>in vitro</i> .....	<b>119</b>
<b>Quadro 17 -</b>	Métodos alternativos <i>in silico</i> .....	<b>126</b>



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
1.1	O bem-estar animal e a bioética.....	22
1.2	A experimentação animal.....	25
1.3	Senciência.....	28
1.4	Legislação Brasileira.....	29
1.5	Os “3Rs” na toxicologia da reprodução e do desenvolvimento.....	36
<b>2</b>	<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>41</b>
2.1	Objetivos Específicos.....	41
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>43</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
4.1	Enriquecimento ambiental.....	47
4.2	Ruídos.....	58
4.3	Ventilação.....	61
4.4	Condições higiênico-sanitárias.....	64
4.5	Fisiologia animal.....	68
4.6	Etologia.....	73
4.7	Manejo.....	78
4.8	Dieta.....	85
4.9	Identificação individual.....	88
4.10	Telemetria.....	91
4.11	Anestesia e Analgesia.....	93
4.12	Eutanásia.....	99
4.13	Demais aplicações dos “3Rs”.....	106
4.14	Métodos Alternativos.....	113
4.14.1	Estudos <i>in vitro</i> .....	116
4.14.2	Estudos <i>in silico</i> .....	124
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>127</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>129</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A ciência do bem-estar animal, embora criada em meados dos anos 60, hoje se encontra, mais do que nunca, em pauta na sociedade brasileira diante de tantos protestos e mobilizações de ativistas sociais em prol de um novo delineamento ao uso de animais nas metodologias de pesquisas. A invasão do Instituto Royal, em 2013, situado no município de São Roque-SP, reacendeu o debate sobre a experimentação animal. Este ato, entre outras manifestações que ocorreram em outras partes do país, motivou com grande pressão popular (inclusive dentro da Câmara Municipal de Sorocaba-SP), questionamentos sobre as práticas científicas adotadas em biotérios e laboratórios.

Esta questão é bastante complexa e desafiadora, mas entende-se que o experimentador tem obrigações morais e éticas com o bem-estar animal independente da área em que atue. Se por um lado o clamor popular mudou a maneira como a experimentação animal é tratada pela sociedade, por outro o cientista busca conhecimentos específicos e direcionados começando pelo entendimento das reais necessidades biológicas espécie-específicas e encerrando na conscientização sobre os padrões comportamentais e etológicos dos denominados “animais de laboratório”.

No entanto, em uma mão, tem-se o bem-estarismo tentando impedir o sofrimento animal e garantindo boas condições de vida e, em outra mão, estão grupos radicais que lutam a qualquer custo pela abolição da experimentação animal, chegando até mesmo a acusar bem-estaristas pela perpetuação desse modelo de pesquisa.

Acredita-se que ao estudar a experimentação animal, fornecem-se subsídios para consideração dessa práxis dentro da universidade que, sendo instituição de ensino, pesquisa e extensão, tem o dever de discutir preceitos éticos e de bem-estar animal. O comitê de ética em experimentação animal, ao exercer, com competência e autoridade, a análise de projetos de pesquisa, ocupa-se de encontrar soluções para dilemas éticos e morais que possam advir do uso de animais em pesquisas e aulas práticas.

Com isso, se desperta, cada vez mais e com maior amplitude, reflexões entre discentes, docentes, gestores e comunidade, propiciando a clara e necessária diferenciação entre a “virtude do ético” e a “deformidade do não ético”. Pois, citando

o filósofo francês Edgar Morin (1994, p.10), “uma ciência empírica privada de reflexão bem como uma filosofia puramente especulativa são insuficientes; consciência sem ciência e ciência sem consciência são radicalmente mutilados e mutilantes”.

### **1.1 O bem-estar animal e a bioética**

Os questionamentos sobre a legitimidade moral e científica da experimentação animal têm instigado intenso debate no meio acadêmico. A ciência, ao lado da religião, da arte e da filosofia, é uma das formas de o homem compreender o universo. A evolução dos conhecimentos científicos transformou a concepção humana não somente em relação à visão histórica que o homem possuía do universo, como também mudou drasticamente o seu próprio modo de vida (CAIS, 2011).

Em 1964, Ruth Harrison publicou sua obra *Animal Machines*, com o objetivo de chamar a atenção para os maus-tratos a que os animais de interesse zootécnico vinham sendo submetidos nas criações intensivas (HARRISON, 1964 apud PAIXÃO; SCHRAMM, 2008). O impacto desta publicação gerou grande mobilização dentro do Parlamento Britânico, e culminou com a criação do Comitê Brambell (BRAMBELL, 1965), sob liderança do médico veterinário Francis William Rogers Brambell, para avaliar o bem-estar dos animais de produção, elaborando sugestões para melhorias zootécnicas sob a visão desta então nova ciência. Este comitê teve por objetivo investigar o fundamento das acusações contidas no livro da autora britânica que inaugurou o debate sobre a ética do sistema de produção animal intensivo, apontando práticas da avicultura e da pecuária industrial. Também polemizou sobre as condições do regime de confinamento animal que estava se desenvolvendo na Europa durante o século XX. Em 1965, reconhecendo as dificuldades encontradas na pecuária moderna, o comitê propôs as cinco liberdades mínimas que todo animal deveria ter: virar-se, cuidar de seu corpo; levantar-se, deitar-se e estirar seus membros (HÖTZEL; MACHADO FILHO, 2004).

O bem-estar animal foi, então, reconhecido como uma nova ciência. E, a partir dos 60, vem recebendo conceitos, desde a primeira tentativa de definição por Brambell, como um “termo amplo que envolve tanto o bem-estar físico quanto mental de um animal” (BRAMBELL, 1965). Um dos conceitos mais populares, dado



por Barry Hughes, em 1976, o define como "um estado de completa saúde física e mental onde o animal deve estar em harmonia com o ambiente que o rodeia". Por outro lado, em 1986, Donald Broom conceitua o bem-estar animal como a "capacidade de adaptação ao meio ambiente". Posteriormente, segundo a Organização Mundial da Saúde, adotou-se a seguinte definição: "o bem-estar animal é um termo amplo que descreve a maneira como os indivíduos se enfrentam com o meio ambiente que inclui sua sanidade, suas percepções, seu estado anímico e outros efeitos positivos ou negativos que influenciam os seus mecanismos físicos e psíquicos" (BEM-ESTAR..., 2013).

Para Broom e Molento (2004), a aceção de bem-estar animal deve permitir a pronta relação com outros conceitos, tais como: necessidades, liberdades, felicidade, adaptação, controle, capacidade de previsão, sentimentos, sofrimento, dor, ansiedade, medo, tédio, estresse e saúde.

Em virtude disso, diferencia-se, aqui, bem-estar animal do conceito de bioética, sendo o primeiro um ramo da ciência moderna, enquanto o segundo, um ramo da filosofia. Em uma publicação a respeito do papel da comissão de ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo relata-se que, apesar de estarem intrinsecamente relacionados, o bem-estar animal e a ética no uso de animais são áreas diferentes do conhecimento que devem ser abordadas a partir de diferentes princípios (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2014).

A partir da leitura do filósofo norte-americano Bernard Rollin (1999), tem-se que a bioética demanda de introspecção e juízo de valores. Derivada da ética, representa um conjunto de princípios ou crenças que governam a visão do que é certo e errado, bom e mau, equitativo e não equitativo, justo e injusto; sendo necessário o bem-estar animal, por sua vez como uma ciência, ser neutro. Pode-se inferir, assim, que as leis relativas ao uso de animais têm sua origem na bioética e que a normatização dessas leis se dá a partir das informações e dados científicos provenientes das pesquisas realizadas pela ciência do bem-estar animal.

Foi a partir da década de 70, que a questão da ciência do bem-estar animal e da bioética a cerca das discussões sobre a experimentação animal eclodiu no cenário mundial. Concomitantemente, na Europa, surgiram as comissões de ética no uso de animais, denominadas pela sigla CEUAs. A primeira CEUA foi criada na

Suécia em 1979 e, nas décadas seguintes, outros países seguiram o exemplo sueco. No Brasil, as CEUAs foram criadas tardiamente dentro das instituições de ensino e pesquisa, em meados da década de 90; e, somente no ano de 2008 foram legitimadas pela legislação brasileira (CAIS, 2011).

Já em relação às sociedades protetoras dos animais, a *Society for the Preservation of Cruelty to Animals* foi a primeira, criada em 1824 na Inglaterra. Já na França, ao que consta, Fanny Bernard, esposa de Claude Bernard - conhecido por ser o pai da fisiologia experimental moderna, devido ao seu descontentamento pelos procedimentos vivisseccionistas realizados pelo marido e à sua indignação por este ter utilizando o cachorro de estimação de sua filha para demonstrações aos alunos em 1860, criou a primeira associação em defesa dos animais de laboratório, impulsionando a origem da Sociedade Francesa Antivivisseccionista, em 1883 (MIZIARA et al., 2012).

Nos Estados Unidos, a edição da lei de bem-estar para os animais de laboratório (*Laboratory Animal Welfare Act*), em 1966, atualmente denominada lei de bem-estar animal (*Animal Welfare Act*), trouxe à tona na sociedade norte-americana a questão do especismo – termo cunhado pelo psicólogo britânico Richard D. Ryder nos anos 70-80 e, amplamente, empregado pelo filósofo australiano Peter Singer. Diversas publicações discutem, até hoje, se realmente “alguns animais são mais iguais do que outros”, a partir do ponto da exclusão de ratos, pássaros e camundongos na legislação estadunidense, abordando a necessidade de políticas públicas e a ação dos grupos protecionistas na questão jurídica da experimentação animal (BALCOMBE, 2008; FISHBEIN, 2001; GLICKMAN, 2001; GOLDBERG, 2002; GUILLERMO, 2008; HOLDEN, 1986; TRULL; RICH, 2001).

No Brasil, nas últimas três décadas, o debate sobre os aspectos éticos do uso de animais e a legitimidade moral da exploração das demais espécies vivas em favorecimento humano também tomou grande força. Existe uma relação dialética entre ciência, filosofia e legislação. Esta é manifestada pela tríade bem-estar animal, bioética e regulamentação científica. Assim, a atuação de uma CEUA é capaz de impactar diretamente no bem-estar animal e contribuir para a educação ética da comunidade científica no que tange aos procedimentos de proteção (NETO, 2012).

## 1.2 A experimentação animal

Na área da medicina, seja humana ou veterinária, os inúmeros avanços tecnológicos e de conhecimento requereram, em sua grande parte, a utilização de animais de diversas espécies (CAIS, 2011). Não se pode negar que a experimentação animal nas pesquisas científicas tem contribuído, sobremaneira, para o desenvolvimento da ciência e da tecnologia, promovendo ao longo dos anos a descoberta de medidas profiláticas e tratamentos de enfermidades que acometem os seres humanos e os animais (CHORILLI et al., 2007). Especificamente, podemos citar a evolução da farmacologia e da toxicologia, entre muitas outras ciências.

Sabe-se que a utilização de animais na pesquisa é citada desde meados de 500 a.C., época em que Pitágoras acreditava na metempsicose, doutrina segundo a qual uma mesma alma pode animar sucessivamente corpos diversos, homens, animais ou mesmo vegetais. Acredita-se que as investigações na área provavelmente tiveram início com os estudos de Hipócrates (450 a.C.), que relacionava o aspecto de órgãos humanos doentes com o de animais. Os anatomistas Alcmaeon (500 a.C.), Herophilus (330-250 a.C.) e Erasistratus (305-240 a.C.) realizavam vivisseções em animais com o objetivo de observar estruturas e formular hipóteses sobre seu funcionamento. Aristóteles (384-322 a.C.) realizou estudos comparativos entre órgãos humanos e de animais, constatando semelhanças e diferenças de conformação e funcionamento. Cerca de 500 anos depois, Galeno (131-201 d.C.) ficou conhecido como um dos precursores das ciências médicas experimentais por realizar vivisseções com objetivos experimentais, retomadas por Vesalius em 1514 até 1564. William Harvey publicou, em 1638, talvez a primeira pesquisa científica com animais, sob o título *Exercitatio anatomica de motu cordis et sanguinis in Animalibus*, com resultados da fisiologia circulatória de mais de 80 diferentes espécies animais. Também, seguiram-se importantes contribuições dos cientistas René Réaumur (1683-1757) e Stephen Hales (1677-1761) (MIZIARA et al., 2012).

Relata-se que foi no século XIX que a experimentação animal emergiu como um importante método científico:

François Magendie foi considerado um pioneiro nas experimentações que caracterizaram esse século. Os experimentos realizados por Magendie refletem em grande parte o pensamento cartesiano, isto é, não levava em

consideração o sofrimento do animal, já que o animal era visto como uma máquina. Além de seu próprio trabalho, Magendie deixou um sucessor – Claude Bernard. A partir das razões filosóficas e científicas fornecidas por Claude Bernard, considerado o maior fisiologista de todos os tempos, a vivissecção tornou-se institucionalizada. Autor da *Introduction à l'étude de la médecine expérimentale*, Claude Bernard afirmava que para o estudo de um dado parâmetro no organismo, as outras variáveis deveriam ser mantidas constantes e, assim, forneceu as bases da pesquisa experimental moderna. Segundo ele: "A experimentação animal é um direito integral e absoluto. O fisiologista não é um homem do mundo, é um sábio, é um homem que está empenhado e absorvido por uma ideia científica que prossegue. Não ouve o grito dos animais, nem vê o sangue que escorre. Só vê a sua vida e só repara nos organismos que lhe escondem problemas que ele quer descobrir". E mais ainda: "O sábio só deve preocupar-se com a opinião dos sábios que o compreendem, só tirar regras de conduta da sua própria consciência.". As afirmações de Claude Bernard já pretendiam responder às críticas que cresciam em relação à vivissecção, pois na esfera científica a prática da utilização de animais ganhava impulso e até então havia uma atmosfera filosófica propícia (PAIXÃO; SCHRAMM, 2008, p. 31-32).

Com o desenvolvimento das cidades, instigado pela Revolução Industrial, um aumento significativo das doenças transmissíveis foi gerado devido à precariedade do urbanismo instalado inicialmente com inadequadas condições de habitação e carência de saneamento básico. Durante o século XIX, François Magendie e seu sucessor, Claude Bernard, impulsionaram o uso de animais na experimentação a fim de contribuir para o desenvolvimento da fisiologia e farmacologia na busca pelas bases fisiopatológicas das doenças infecciosas (LIMA, 2008).

Já durante o século XX, na Alemanha nazista, houve um amplo apoio ao bem-estar na experimentação animal. Muitos líderes do regime, partidários dos direitos dos animais e da conservação das espécies, incluindo Adolf Hitler e Hermann Göring, tomaram uma série de medidas para garantir a proteção dos mesmos. Chegaram a proibir absolutamente a vivissecção, usando até mesmo esta proibição como pretexto para a perseguição dos judeus (ANIMAL..., 2014).

Do ponto de vista da filosofia, destacam-se duas correntes teóricas que tratam da experimentação animal: a do filósofo australiano Peter Singer, que utiliza como ferramenta teórica o princípio da igual consideração de interesses, e a do filósofo norte-americano Tom Regan, que utiliza a filosofia dos direitos animais (direitos morais individuais básicos) (ALVIM, 2012).

Os animais são utilizados na experimentação científica por constituírem modelos e, estes modelos seriam como mapas de territórios não explorados e serviriam de base para encontrar o caminho de um destino. Na sua falta, chegar ao destino seria mais difícil. Os modelos experimentais desenvolvidos em animais de

laboratórios, na sua grande maioria ratos e camundongos, são utilizados na ciência para o entendimento da origem de muitas patologias (que afligem humanos e não humanos) (LIMA, 2008).

Na área da toxicologia, o objetivo central é estudar os efeitos adversos de substâncias para prevenir danos à saúde humana e veterinária. Com o avanço da toxicologia, podem-se criar melhores políticas públicas, normatizações de usos de materiais e recomendações de cuidados ao manipular ou expor seres humanos e animais a certas substâncias. Porém, as complexidades das relações do homem com ele mesmo e com o ambiente fazem com que os métodos de análise sejam rapidamente defasados, frente a novos desafios (BACHINSKI, 2011).

Especificamente, na toxicologia da reprodução e do desenvolvimento, a *Food and Drug Administration (FDA)*, órgão vinculado ao departamento de saúde dos Estados Unidos, considera três segmentos para propósito de avaliação *in vivo* dos diferentes agentes (I: da gametogênese à implantação, II: da implantação ao final da organogênese, III: do final da gestação até o desenvolvimento pós-natal). De maneira geral, as principais agências que regulamentam os protocolos de teratogenicidade, a *FDA* (segmento II) e a *Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD)* (protocolo n<sup>o</sup>. 414), propõem que a administração da substância química a ser testada abranja desde o acasalamento até o parto. Indica-se o uso de 24 fêmeas por grupo e, no mínimo, três diferentes doses da substância química, além de um grupo controle (GÓRNIAK et al., 2008). Segundo Rovida e Hartung (2009), os estudos que mais demandam da experimentação animal estão, exatamente, nesta área com cerca de 90% de todo o número de animais utilizados na pesquisa e 70% dos custos necessários para registro.

Portanto, a experimentação animal deve ser adequadamente delineada, corretamente analisada e transparentemente relatada para aumentar sua validade científica e maximizar os conhecimentos adquiridos a partir de cada experimento (MOJA et al., 2014). No entanto, enquanto na Europa tem-se a divulgação de estatísticas sobre o número de animais de laboratório usados para propósitos científicos (SAUER et al., 2005), percebe-se que tais dados ainda não são nítidos no Brasil.

Infere-se aqui, também, a atenção especial que se tem dado às políticas editoriais. Durante as últimas décadas, tem havido um crescente foco na ética, no

bem-estar animal e nos “*humane endpoints*” dentro de conselhos editoriais de revistas científicas internacionais em relação à publicação de estudos farmacológicos ou toxicológicos *in vivo* (SVENDSEN, 2005).

Ademais, tem-se instaurado certo controle realizado pelas agências de financiamento sobre a experimentação animal. Logo, países como Alemanha, Áustria e Finlândia divulgam, com frequência, informações sobre a prestação de apoio financeiro para o desenvolvimento de métodos alternativos (SAUER et al., 2005). Na Europa, a publicação da diretiva *REACH* (*registration, evaluation, authorization and restriction of chemicals*) impôs muitas exigências para a indústria química, porém existe ainda uma lacuna de dados sobre o fornecimento de informações consistentes aos órgãos reguladores (GILBERT, 2011). Ademais, existe um intenso debate a fim de reavaliar o número de animais e os custos dos testes *in vivo* (LILIENBLUM, 2008; LILIENBLUM et al., 2008; ROVIDA; HARTUNG, 2009).

Por razões éticas e econômicas, é importante ao se projetar experimentações bem como ao se analisar os dados corretamente, usar um número mínimo de animais necessários para alcançar os objetivos – não somente para evitar a desperdício de importantes efeitos biológicos, mas também para evitar a repetição desnecessária de experimentos (FESTING; ALTMAN, 2002). Diante disso, a gestão de informações faz-se primordial para evitar experimentações redundantes enquanto alguns autores veem a experimentação animal como uma ciência desatualizada (GUILLERMO, 2008). Acredita-se, portanto, que à medida que as instituições acolherem sites internacionais como uma alternativa no compartilhamento das informações (como por exemplo, o Altweb), as estatísticas atuais e os resultados serão fornecidos para a sua utilização em todo o mundo (GOLDBERG, 2002).

### **1.3 Senciência**

De forma sintética, sentiência é a capacidade de sentir, estar consciente de si próprio ou do ambiente que o cerca. Logo, a capacidade de sentir engloba, pelo menos, todos os animais vertebrados. A sentiência fornece ao animal um valor moral intrínseco, dado que há interesses que emanam destes sentimentos. E, isso pode ser evidenciado por estudos comportamentais, pela similaridade anatomo-fisiológica em relação ao ser humano e pela teoria da evolução (LUNA, 2008).

Sob o enfoque histórico, Jeremy Bentham (filósofo inglês criador da doutrina do utilitarismo) estabeleceu que quanto maior o benefício, tanto melhor a ação, ou seja, o que determina se a ação é correta é o benefício intrínseco exercido à coletividade. Diz-se que o objetivo pesquisado em toda ação moral se constitui pelo bem-estar (físico, moral e intelectual). Em sua obra *Uma introdução aos princípios da moral e da legislação*, sustenta a inclusão de todos os animais na moralidade de um ato, visto que são seres dotados de sensibilidade, ou seja, sencientes. Para ele, “(...) o problema não consiste em saber se os animais podem raciocinar; tampouco interessa se falam ou não; o verdadeiro problema é este: podem eles sofrer?”. É, possivelmente, a partir daí que podem ter surgido as primeiras questões sobre a legitimidade moral acerca do sentimento dos animais (BENTHAN, 1989 apud MIZIARA et al., 2012).

De acordo com representantes da Sociedade Mundial de Proteção Animal (*World Animal Protection*), numa matéria ao Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de São Paulo (CRMV-SP), no Brasil, o crescimento da preocupação com o bem-estar animal observado nas últimas décadas também é consequência do aumento da conscientização e percepção da sociedade de que os animais são seres sencientes - com capacidade de sentir conscientemente algo, ou seja, de ter percepções conscientes do que lhes acontece e do que os rodeia - e de que a humanidade tem dever moral para com eles (BEM-ESTAR..., 2013).

Por este viés, os animais respondem de formas diferentes aos diversos tipos de dor. Os comportamentos de alimentar-se, beber, dormir, lambar-se, coçar-se e condutas sexuais são dados que dão condições para análise das funções normais dos indivíduos. Dentre os métodos para aferir a dor, a observação comportamental é uma ferramenta útil para diagnóstico (ALVES, 2008).

#### **1.4 Legislação Brasileira**

Não somente de teor proibitivo, novas leis e regras têm surgido com o intuito de garantir a qualidade de vida dos animais, especialmente àqueles que vivem em cativeiro, sejam eles de produção, laboratório ou zoológico (BEM-ESTAR..., 2013).

No Brasil, por muitos anos, não havia regulamentação para o uso de animais em experimentação científica. Eram seguidos normas e princípios criados por organizações nacionais e internacionais (MIZIARA et al., 2012).

Porém, no século XXI, uma inédita legislação introduziu modelos de conduta que antes não existiam. Após 13 anos de debate parlamentar, o governo federal instituiu em 8 de outubro de 2008 uma nova ordem jurídico-administrativa através da Lei nº 11.794 que foi regulamentada em 15 de julho de 2009 com o decreto nº 6.899 (FILIPECKI, 2012). Iniciaram, a partir daí, grandes mudanças no cenário brasileiro no que tange a experimentação animal.

Faz-se aqui um adendo para relatar que no âmbito da Medicina Veterinária e da Zootecnia brasileiras, em 15 de fevereiro de 2008, o Conselho Federal de Medicina Veterinária publicou a resolução 879/08 na qual já dispunha sobre o uso de animais no ensino e na pesquisa e regulamentava as CEUAs em seus cursos de graduação e pós-graduação. Considerando que a formação do médico veterinário e do zootecnista lhes imputa o zelo pelo bem-estar animal, com o intuito de atender às necessidades físicas, mentais, etológicas e sanitárias dos animais, estabeleceu-se condições para o manejo animal em práticas de ensino e pesquisa, uma vez que “qualquer procedimento que cause dor no ser humano causará dor em outras espécies de vertebrados, tendo em vista que os animais são seres sencientes, experimentam dor, prazer, felicidade, medo, frustração e ansiedade”. Ademais, relatou-se que o preceito das cinco liberdades do bem-estar animal deve ser adotado com a finalidade de manter os animais: I) livres de fome, sede e desnutrição (liberdade nutricional); II) livres de desconforto (liberdade ambiental); III) livres de dor, injúrias e doenças (liberdade sanitária); IV) livres para expressar o comportamento natural da espécie (liberdade comportamental); V) livres de medo e estresse (liberdade psicológica) (BRASIL..., 2008).

Relata-se a legislação no Brasil quanto ao uso de animais, especialmente no âmbito experimental, no quadro 1.



**Quadro 1 - Evolução da legislação nacional, estadual e municipal em relação à experimentação animal.**

Documento	Data de Promulgação	Teor do Documento
Decreto nº 24.645	10 de julho de 1934	<b>“Estabelece medidas de proteção aos animais” - REVOGADO</b> No artigo 1, o governo de Getúlio Vargas reconhece que todos os animais existentes no país são tutelados do Estado.
Lei nº 3.688	3 de outubro de 1941	<b>“Lei das Contravenções Penais”</b> No art. 31, trata da omissão, condução, irritabilidade e inexperiência na guarda de animais. No art. 64, prevê pena para a prática de crueldade, estendendo-a para aquele que, embora para fins didáticos ou científicos, realiza, em lugar público ou exposto ao público, experiência dolorosa ou cruel em animal vivo, além da crueldade e do trabalho excessivo.
Lei nº 5.197	3 de janeiro de 1967	<b>“Dispõe sobre a proteção à fauna e dá outras providências”.</b> Resguarda a fauna silvestre como propriedade do Estado ou de proprietários de ambiente privado, devendo os últimos se responsabilizar pelas ações executadas sobre os animais que lá habitarem, como por exemplo, a caça, salvo em casos permitidos por lei; dita também a respeito da possibilidade de se apanhar ovos, filhotes e larvas para determinados estabelecimentos, bem como o direito de destruição daqueles que se considerarem nocivos à saúde pública; além disso, proíbe a comercialização de subprodutos da caça, como peles, e materiais que se destinarem a quaisquer ações de destruição da fauna.
Lei nº 5.517	23 de outubro de 1968	<b>“Dispõe sobre o exercício da profissão de médico-veterinário e cria os Conselhos Federal e Regionais de Medicina Veterinária”.</b>
Lei nº 6.638	8 de maio de 1979	<b>“Estabelece normas para a prática didático-científica da vivissecção de animais e determina outras providencias”.</b>
Constituição da República Federativa do Brasil	5 de outubro de 1988	<b>Estabelece no art. 225 que "Todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao poder público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações".</b> Em seu inciso VII do primeiro parágrafo, cita: "Para assegurar a efetividade desse direito, incumbe ao poder público: (...) VII - proteger a fauna e a flora, vedadas, na forma da lei, as práticas que coloquem em risco sua função ecológica, provoquem a extinção de espécies ou submetam os animais a crueldade".
Projeto de Lei nº 1.153 da Câmara dos Deputados Federais	1995	<b>“Regulamenta o inciso VII, do parágrafo 1º do artigo 225, da Constituição Federal, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providencias”.</b> Dispõe sobre a utilização de cobaias.
Lei nº 9.605	12 de fevereiro de 1998	<b>Lei de crimes ambientais - “Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências”.</b> Estabelece como crime e define multa e pena para quem praticar atos de abuso e maus tratos, ferir ou mutilar animais de qualquer espécie. Inclui na mesma categoria a pessoa que realiza experiência dolorosa e cruel com animais vivos, ainda que para fins didáticos ou científicos. Preconiza no par. 1º do artigo 32 a utilização de recursos alternativos: “Incorre nas mesmas penas quem realiza experiência dolorosa ou cruel em animal vivo, ainda que para fins didáticos ou científicos, quando existirem recursos alternativos”.

Lei nº 11.794	8 de outubro de 2008	<b>Lei Arouca - Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências</b> . Cria o Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e torna obrigatórias as Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs) em instituições com atividade de pesquisa ou ensino com a finalidade de garantir o cuidado adequado e manejo ético de animais para fins científicos e didáticos.
Decreto nº 6.899	15 de julho de 2009	<b>“Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria-Executiva”</b> Cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais (CIUCA), mediante a regulamentação da Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências.
Portaria nº 491 do MCTI	03 de julho de 2012	<b>“Institui a Rede Nacional de Métodos Alternativos - Renama e sua estrutura no âmbito do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), que será supervisionada por um Conselho Diretor”.</b>
Portaria nº 465 do MCTI	23 de maio de 2013	<b>“Aprova a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA)”.</b>
Projeto de Lei nº 441 da Câmara Municipal de Sorocaba	2013 (vetado)	“Dispõe sobre normas regulamentadoras para estabelecimentos que utilizam animais para práticas experimentais com finalidades pedagógicas, industriais, comerciais ou de pesquisa científica, e dá outras providências”.
Lei Estadual nº 15.316	23 de janeiro de 2014	<b>“Proíbe a utilização de animais para desenvolvimento, experimento e teste de produtos cosméticos e de higiene pessoal, perfumes e seus componentes e dá outras providências”.</b> No art. 1, fica proibida, no Estado de São Paulo, a utilização de animais para desenvolvimento, experimento e teste de produtos cosméticos e de higiene pessoal, perfumes e seus componentes. Para os fins do disposto no artigo 1º, consideram-se produtos cosméticos, de higiene pessoal e perfumes as preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas de uso externo nas diversas partes do corpo humano, tais como pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-lo, perfumá-lo, alterar sua aparência ou os odores corporais, protegê-lo ou mantê-lo em bom estado.
Lei Municipal nº 10.748	6 de março de 2014	<b>“Dispõe sobre normas regulamentadoras para estabelecimentos que utilizam animais para práticas experimentais com finalidades pedagógicas, industriais, comerciais ou de pesquisa científica, e dá outras providências”.</b> Proíbe, no município, experimentações com animais para avaliar produtos de toda a cadeia de cosméticos, produtos de limpeza e higiene, de nutrição animal e demais produtos das indústrias químicas

**Fonte:** Elaboração própria baseada na Legislação Brasileira.

A popular Lei Arouca legitimou o uso de animais em pesquisas no Brasil e criou o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) que, dentre as suas competências, destacam-se a formulação de normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica, bem como o estabelecimento de procedimentos para instalação e funcionamento de centros de criação, biotérios e laboratórios. O CONCEA também é responsável pelo credenciamento das instituições que desenvolvam atividades nesta área, além de administrar o cadastro de protocolos experimentais ou pedagógicos aplicáveis aos procedimentos de ensino e projetos de pesquisa científica realizados ou em andamento no país. Compete às CEUAs, por sua vez, avaliar tais protocolos, no nível das instituições, quanto aos aspectos éticos no uso dos animais (NETO, 2012).

É interessante, da mesma forma, lembrar que pesquisas que não tenham sido aprovadas pelas CEUAs, certamente, não podem ser publicadas por periódicos científicos indexados (CAVALCANTI et al., 2009). Logo, essas determinações visam assegurar a definição de um planejamento cuidadoso dos experimentos, conhecimento de leis e diretrizes do país e a aplicação de princípios éticos para o manuseio de animais de laboratório para resguardar o bem-estar animal e o reconhecimento das pesquisas em publicações no mundo científico (WATANABE et al., 2014).

O CONCEA é órgão integrante do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) constituindo-se em instância colegiada multidisciplinar de caráter normativo, consultivo, deliberativo e recursal. Suas Resoluções Normativas, publicadas até o presente momento, estão relacionadas no quadro 2.

**Quadro 2 - Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA).**

<b>Resolução</b>	<b>Data de promulgação</b>	<b>Teor do Documento</b>
RN nº 1	9 de julho de 2010	<b>Dispõe sobre a instalação e o funcionamento das Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs).</b>
RN nº 2	30 de dezembro de 2010	<b>Altera dispositivos da Resolução Normativa nº 1</b> , de 9 julho de 2010, que dispõe sobre a instalação e o funcionamento das Comissões de Éticas no Uso de Animais (CEUAs).
RN nº 3	14 de dezembro de 2011	<b>REVOGADA pela RN 16/2014.</b> Institui o Credenciamento Institucional para Atividades com Animais em Ensino ou Pesquisa (CIAEP); estabelece os critérios e procedimentos para requerimento, emissão, revisão, extensão, suspensão e cancelamento do credenciamento das instituições que criam, mantêm ou utilizam animais em ensino ou pesquisa científica; altera e revoga dispositivos da Resolução Normativa nº 1 de 9 de julho de 2010; e dá outras providências.
RN nº 4	18 de abril de 2012	Dispõe sobre a utilização do formulário unificado para solicitação de autorização para uso de animais em ensino e/ou pesquisa pelas Comissões de Éticas no Uso de Animais (CEUAs) e dá outras providências.
RN nº 5	14 de junho de 2012	Baixa recomendação às agências de amparo e fomento à pesquisa científica, na forma prevista no art. 23 da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008.
RN nº 6	10 de julho de 2012	<b>Altera a Resolução Normativa nº 1</b> , de 9 de julho de 2010, que dispõe sobre a instalação e o funcionamento das Comissões de Éticas no Uso de Animais (CEUAs).
RN nº 7	13 de setembro de 2012	Dispõe sobre as informações relativas aos projetos submetidos às Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs) a serem remetidas por intermédio do Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais (CIUCA).
RN nº 8	27 de setembro de 2012	Dispõe sobre a prorrogação do prazo para envio do Relatório Anual de Atividades pelas Comissões de Ética no Uso de Animais – CEUAs.
RN nº 9	8 de janeiro de 2013	Prorroga o prazo para requerimento do Credenciamento Institucional para Atividades com Animais em Ensino ou Pesquisa (CIAEP).
RN nº 10	27 de março de 2013	<b>REVOGADA pela RN 16/2014.</b> Altera o prazo para expedição do Credenciamento Institucional para Atividades com Animais em Ensino ou Pesquisa (CIAEP).
RN nº 11	24 de maio de 2013	Dispõe sobre os procedimentos para abertura de processo administrativo no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) para apuração de infração administrativa.
RN nº 12	20 de setembro de 2013	Baixa a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA).

RN nº 13	20 de setembro de 2013	Baixa as Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).
RN nº 14	2 de outubro de 2013	<b>REVOGADA pela RN 16/2014.</b> Dispõe sobre a situação das instituições que não solicitaram seu credenciamento no CONCEA, as quais utilizam animais para fins científicos ou didáticos.
RN nº 15	16 de dezembro de 2013	Baixa a Estrutura Física e Ambiente de Roedores e Lagomorfos do Guia Brasileiro de Criação e Utilização de Animais para Atividades de Ensino e Pesquisa Científica.
RN nº 16	30 de abril de 2014	Altera os critérios e procedimentos para requerimento, emissão, revisão, extensão, suspensão e cancelamento do Credenciamento Institucional para Atividades com Animais em Ensino ou Pesquisa (CIAEP) das instituições que produzem, mantêm ou utilizam animais para ensino ou pesquisa científica; altera e revoga dispositivos das Resoluções Normativas n.º 3, de 14 de dezembro de 2011, n.º 10, de 27 de março de 2013 e n.º 14, de 2 de outubro de 2013; e dá outras providências.
RN nº 17	3 de julho de 2014	Dispõe sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil e dá outras providências.
RN nº 18	24 de setembro de 2014	Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil, nos termos da Resolução Normativa nº 17, de 03 de julho de 2014, e dá outras providências.
RN nº 19	25 de novembro de 2014	Regula a vinculação de centros públicos ou privados que realizam procedimentos em animais vivos em atividades de ensino, extensão, capacitação, treinamento, transferência de tecnologia, ou quaisquer outras com finalidade didática, ao sistema legal que regula o funcionamento do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

**Fonte:** Elaboração própria baseada nas normativas vigentes.

Salienta-se que a RN nº 6 do CONCEA (2012) expandiu o mercado de trabalho ao médico veterinário. Reconhecendo as competências da medicina veterinária na assistência aos animais de laboratório e em ações voltadas para o bem-estar na experimentação animal, incluiu-se o médico veterinário como responsável técnico exclusivo dos biotérios de instituições de ensino e pesquisa.

Enfim, paralelamente a preocupações sobre o bem-estar animal e legislações sobre o uso de animais de laboratório, existe, também, a precaução com o bem-estar e a biossegurança das pessoas que manipulam tais indivíduos, uma vez que estas correm riscos de se adquirir doenças ocupacionais como zoonoses e alergias de contato (POLITI et al., 2008).

### **1.5 Os “3Rs” na toxicologia da reprodução e do desenvolvimento**

O conceito dos “3Rs” foram estabelecidos pelo zoólogo Russel e pelo microbiologista Burch, na obra *The Principles of Humane Experimental Technique*, publicada pela primeira vez no ano de 1959 (RUSSEL; BURCH, 1992).

A ideia dos “3Rs” representa o impulso inicial na comunidade científica do conceito de "alternativas". O 1º “R” ou “*replacement*” (substituição) indica que se deve procurar substituir a utilização de vertebrados por métodos que utilizem outros materiais, não sencientes, o que pode incluir plantas, microrganismos, etc. Já o 2º “R” ou “*reduction*” (redução) indica que se deve procurar reduzir o número de animais utilizados no experimento, o que é possível com uma escolha correta das estratégias. Nesse sentido, também a ciência estaria se beneficiando com melhores delineamentos experimentais e, mesmo na área da estatística, o diálogo com os cientistas vem inovando as estratégias, e contribuindo para o aprimoramento de ambos os campos: biomédico e estatístico. Finalmente, o 3º “R” ou “*refinement*” (refinamento) indica que se deve procurar minimizar, ao máximo, o nível de desconforto ou sofrimento animal. Diante disso, a adoção de protocolos anestésicos e analgésicos faz-se de extrema relevância (PAIXÃO; SCHRAMM, 2008).

Desde então, a bioética vem discutindo em maior profundidade a questão da proteção dos animais submetidos à experimentação científica e aos procedimentos de ensino, propondo um conjunto de condutas frente aos “3Rs” (NETO, 2012).

O CRMV-SP enfatiza que médicos veterinários responsáveis por animais utilizados em experimentação devem conhecer e aplicar o conceito dos “3Rs”, além

de participar das CEUAs para avaliarem a adequação dos protocolos de experimentação e implementarem estratégias de intervenção quando o bem-estar dos animais se mostrar comprometido (BEM-ESTAR..., 2013).

A incorporação dos "3Rs" na toxicologia da reprodução e do desenvolvimento é ilustrada na figura 1.

Historicamente, somente quando a tragédia da talidomida atingiu a humanidade é que se deu a necessária atenção aos efeitos da exposição de seres vivos às diversas substâncias químicas durante o período perinatal:

A talidomida, um sedativo/hipnótico, foi sintetizada em 1954; a partir de 1956 houve um incremento gradativo do seu emprego no mundo todo para o tratamento de náuseas e vômitos durante a gestação. Durante esse período, na Alemanha e em outros países, começaram a surgir inúmeros casos de teratogênese bastante rara, denominada focomelia, caracterizada pela redução de membros associada a outras anomalias, como retardamento mental, doença congênita cardíaca, anomalias renais, intestinais e oculares. Logo a seguir, reconheceu-se que o mundo estava frente a uma epidemia, e só mais tarde, em 1961, é que se associaram as malformações observadas com o uso terapêutico da talidomida durante a gestação. Até aquela época, os testes de toxicidade exigidos para a liberação de um medicamento compreendiam apenas estudos em uma única geração e em apenas uma espécie animal, em geral, um roedor. Até então, a maioria dos medicamentos era testada em ratos ou camundongos. Foi este fato que colaborou para a tragédia da talidomida, pois embora os testes de toxicidade perinatal tenham sido executados com este medicamento, o animal-teste empregado foi o rato, que não é sensível aos efeitos teratogênicos da talidomida, ao passo que os camundongos o são. A partir destes acontecimentos, os órgãos responsáveis pela liberação de medicamentos passaram a exigir testes perinatais bem mais complexos, com estudos multigeracionais e empregando, pelo menos, três espécies animais, sendo ao menos uma não roedora (BERNARDI, 2002, p. 691).

Após o infeliz evento com a talidomida, em princípio, nenhum medicamento é mais considerado totalmente seguro para o embrião. Como não se considera eticamente aceitável realizar estudos clínicos de novos fármacos em mulheres grávidas, o estudo do uso de medicamentos durante a gestação, em que cada exposição envolve o futuro tanto da mãe como do conceito, cria grandes desafios éticos e técnicos à toxicologia da reprodução e do desenvolvimento (OSÓRIO-DE-CASTRO et al., 2004).

No entanto, especificamente esta área alcançou, nas últimas décadas, grandes avanços científicos graças à experimentação animal. Os estudos das ações dos agentes tóxicos sobre as diversas fases do processo reprodutivo e do desenvolvimento visam, fundamentalmente, avaliar efeitos sobre: a fertilidade, o

transporte e implantação do ovo, a embriogênese e a fase fetal, o parto, o recém-nascido, a lactação, o desmame e os cuidados com a ninhada, as anormalidades pós-natais retardadas e o comportamento (GERENUTTI et al., 1991).

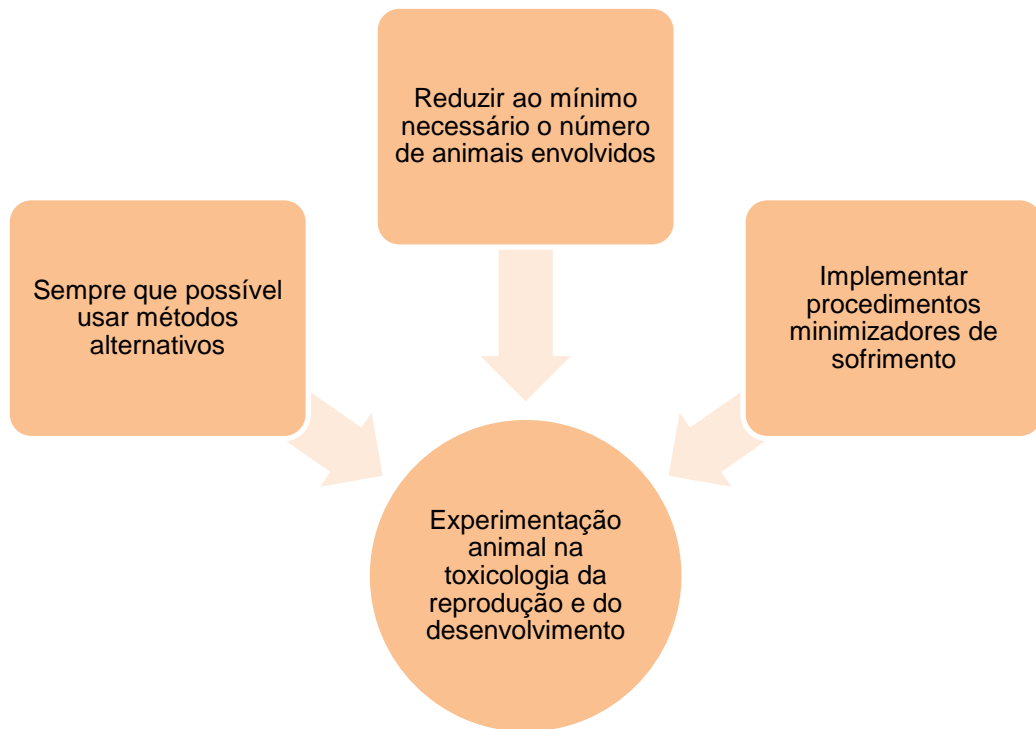
É certo que muitos agentes apresentam grande periculosidade para o conceito, devido à facilidade de serem introduzidos no organismo materno e à maneira diversa e múltipla com que podem entrar em contato com a gestante (LEMONICA, 2003).

Hoje, obrigatoriamente, o teste padrão de teratogenicidade usa uma espécie de roedor e outra de não roedor. A saber, nos estudos com ratos, metade da ninhada é preparada para a realização de exame esquelético (fixação com etanol e, em seguida, procede-se o “clareamento” com hidróxido de potássio e alizarina), e a outra metade é utilizada para avaliação de anomalias viscerais (GÓRNIAK et al., 2008).

A partir dessas preparações, a lesão teratogênica, em relação ao desenvolvimento fetal, é crítica para a determinação do tipo e da magnitude do dano (RANG et al., 2007). Entretanto, algumas alterações mais sutis do desenvolvimento ocorrem após o nascimento e podem ser observadas durante todo período de amamentação, podendo se estender até o amadurecimento sexual (GERENUTTI et al., 2008).



Figura 1 - Sistematização dos “3Rs” em toxicologia da reprodução e do desenvolvimento.



**Fonte:** Elaboração própria.

Portanto, como a utilização de animais de laboratório representa um dos dilemas mais conflitantes no debate bioético, é imperativo a adoção dos “3Rs” na toxicologia da reprodução e do desenvolvimento. Desta forma, a reflexão sobre a necessidade de um modelo biológico, a eleição do tipo de avaliação e a relevância da experimentação animal são aspectos de suma importância.



## **2 OBJETIVO GERAL**

Estudar como a ciência do bem-estar animal e os avanços na utilização de métodos alternativos podem aprimorar as investigações científicas, enfatizando a área da toxicologia da reprodução e do desenvolvimento.

### **2.1 Objetivos específicos**

- Analisar a evolução da legislação relacionada à experimentação animal no Brasil;
- Estudar as boas práticas laboratoriais e de intervenção no ambiente do biotério para o bem-estar animal;
- Caracterizar os métodos alternativos na pesquisa toxicológica realizada durante o período gestacional e embrionário.

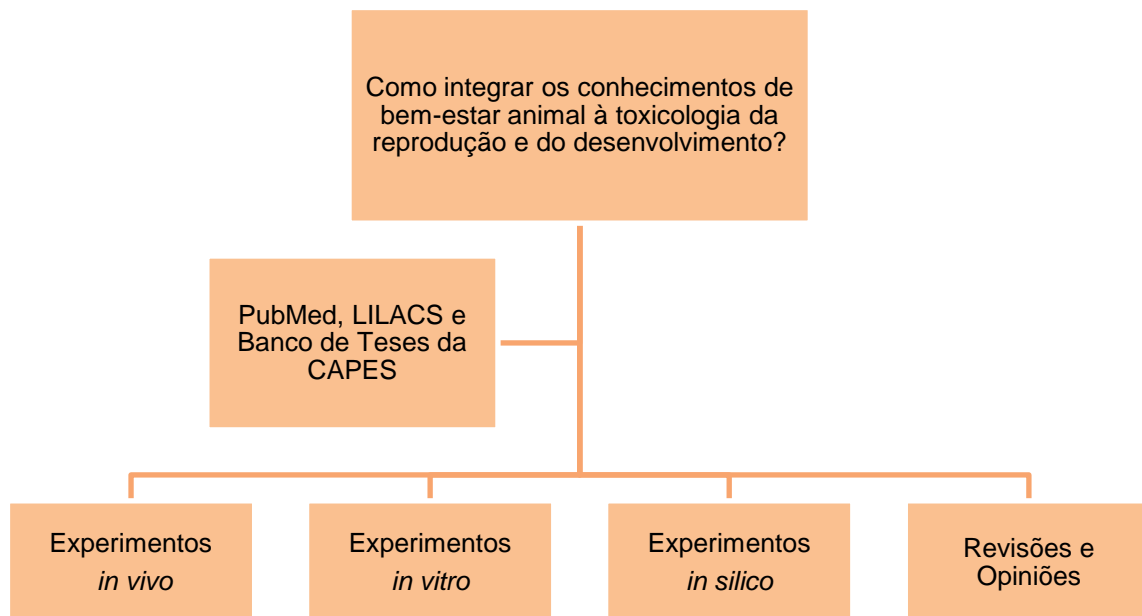


### 3 METODOLOGIA

Realizou-se uma revisão de literatura do tipo integrativa. Tal método permitiu incluir literatura teórica e empírica bem como estudos com diferentes abordagens metodológicas (quantitativa e qualitativa). Os artigos incluídos na revisão foram analisados seguindo padrões de rigor metodológico, propiciando a pesquisa das informações pré-existentes sobre o tema investigado e a geração de fonte de conhecimento atual sobre o problema (POMPEO et al., 2009).

Seguiram-se as seguintes etapas preconizadas: definição do tema (elaboração da questão), busca na literatura (amostragem através do operador booleano *AND*), estabelecimentos de critérios para categorização dos estudos (coleta de dados), avaliação dos estudos incluídos nos resultados, discussão dos resultados e, finalmente, apresentação da revisão integrativa. A pergunta inicial da dissertação, os instrumentos e produtos científicos avaliados estão esquematizados na figura 2.

**Figura 2** - Indagação inicial da dissertação e temas científicos avaliados.



**Fonte:** Elaboração própria.

Este trabalho foi desenvolvido através de método teórico descritivo e retrospectivo, por meio de um levantamento bibliográfico de artigos científicos, dissertações, teses e artigos de revisões e opiniões encontrados em três bases de dados (PubMed, LILACS e Banco de Teses da CAPES). As buscas foram realizadas de janeiro de 2013 a maio de 2014.

Empregaram-se dez palavras-chaves: *laboratory, animal, welfare, rats, experimentation, ethics, alternative, methods, reproductive, toxicology* (e devidas traduções para acesso ao banco de dados nacional citado). Estas foram agrupadas em quatro unitermos, formando quatro combinações diferentes.

Os critérios de inclusão foram: artigos disponíveis para livre acesso na íntegra, relevância e consonância aos objetivos desta pesquisa. Não foram delimitantes as datas de publicação nem os idiomas dos documentos recuperados.

Já os critérios de exclusão foram: títulos repetidos, artigos que apenas fazem uma menção a protocolo de aprovação em CEUA (sem aprofundamento no tema) e artigos indisponíveis para livre acesso na íntegra (apenas resumos acessíveis).

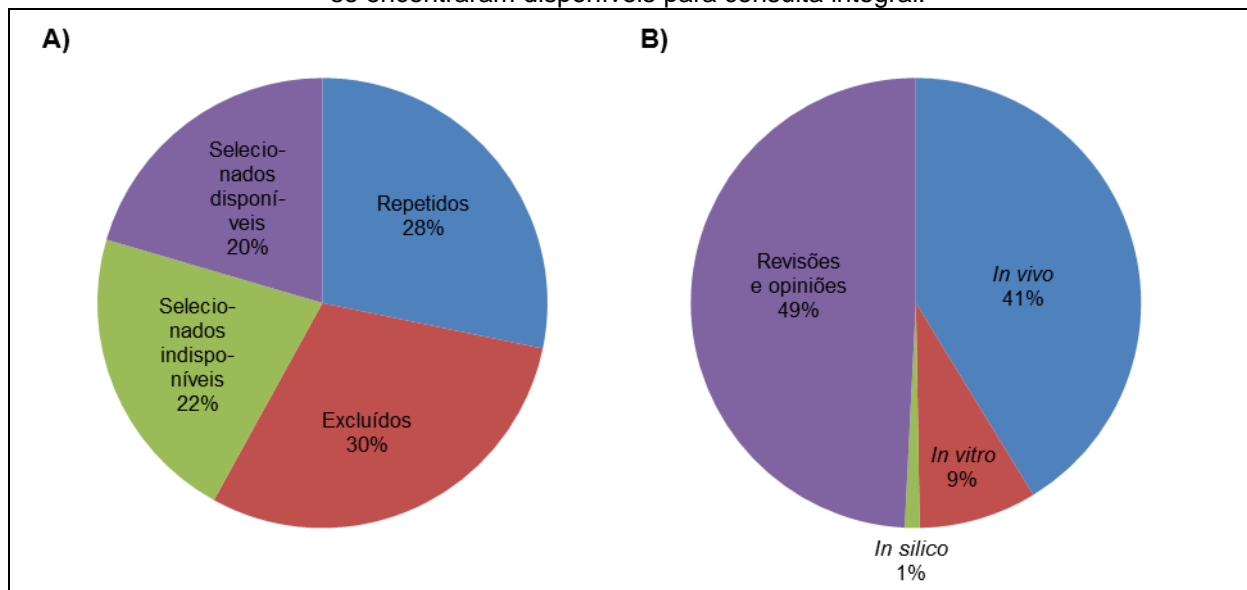
Assim, os artigos originais foram organizados por área de conhecimento, em quadros, compreendendo: descrição de indivíduos (ou técnicas), objetivo, intervenção, metodologia, resultados, possíveis consultas a *guidelines*, aprovação em CEUA institucional e indicação da origem artigos. Os artigos de revisão ou opinião foram utilizados no corpo da dissertação.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O universo das buscas compreendeu 924 títulos, sendo que, destes, 261 foram inicialmente excluídos por se apresentarem em duplicata. Os 663 títulos restantes e seus respectivos resumos foram cuidadosamente analisados, excluindo-se 275 títulos por apenas mencionarem protocolo de aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais sendo irrelevantes ao objetivo geral da pesquisa.

Dos 388 títulos restantes, 199 resumos estavam indisponíveis para o livre acesso ao texto completo. Assim, resultou-se em 189 títulos disponíveis na íntegra e de interesse a esta pesquisa. A figura 3 ilustra a eleição, o perfil de acesso e a distribuição dos artigos selecionados que se encontraram disponíveis para consulta por modelos de ensaios (*in vivo*, *in vitro*, *in silico* e artigos de revisão/opinião).

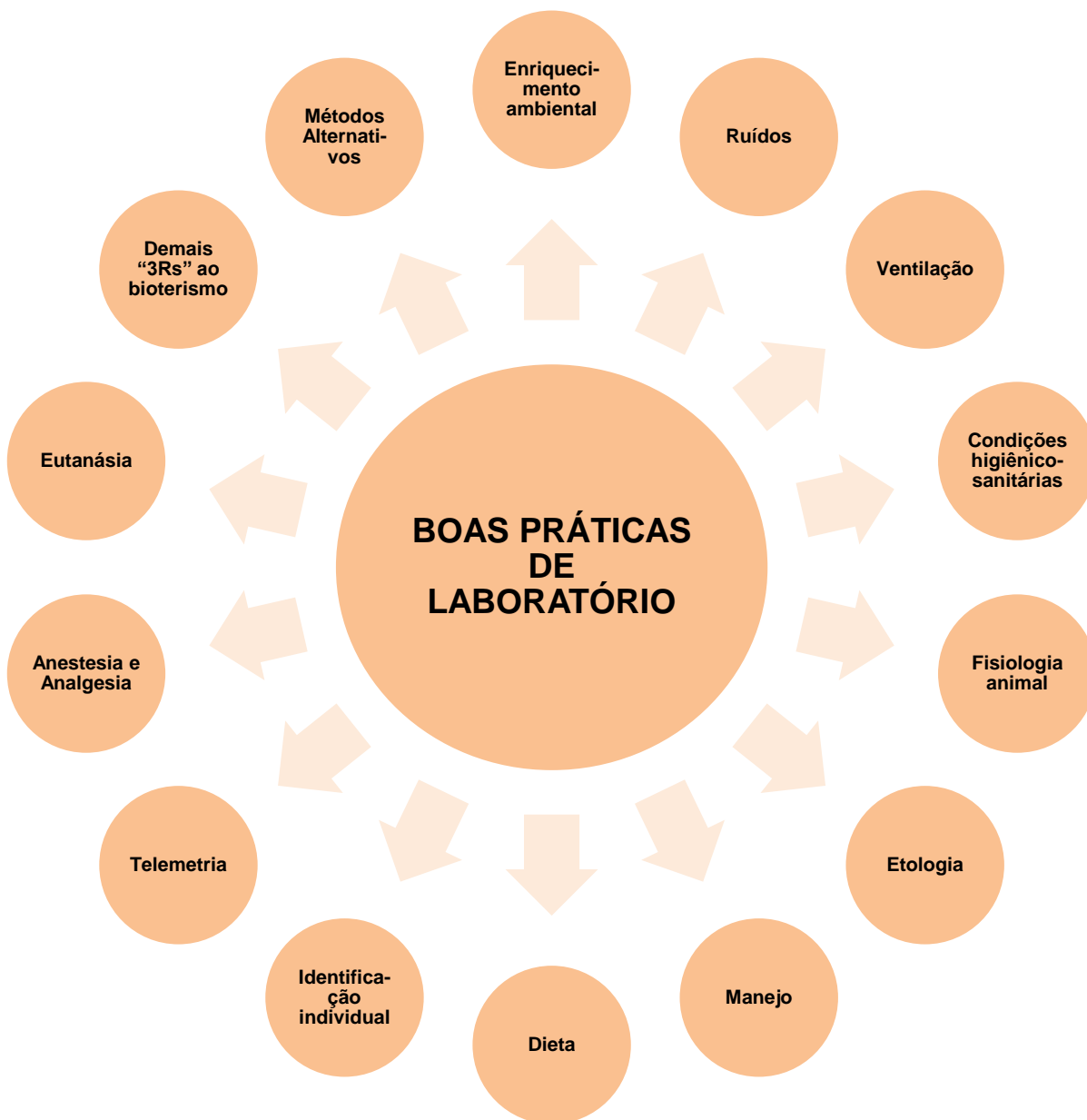
**Figura 3 – A)** Eleição e acesso aos artigos encontrados. **B)** Distribuição dos artigos selecionados que se encontraram disponíveis para consulta integral.



Fonte: Elaboração própria.

A partir desse cotejamento de dados, os artigos originais relacionados aos ensaios *in vivo* que abordaram as boas práticas de laboratório foram direcionados a catorze subtemas, conforme ilustra a figura 4. Cada subtema foi abordado em seção específica, no intuito de contribuir para a mensuração do bem-estar animal aplicada ao bioterismo.

**Figura 4** - Subtemas relacionados às boas práticas de laboratório.



**Fonte:** Elaboração própria.



#### 4.1 Enriquecimento ambiental

De maneira geral, o enriquecimento ambiental torna o ambiente mais apto para a sobrevivência, o que viabiliza no biotério ou no laboratório a reprodução e o desenvolvimento dos roedores, além do incremento do bem-estar animal. Porém, é necessário deixar claro, antes de tudo, que este subtema apresenta inúmeras interconexões com os demais abordados ao longo da presente dissertação.

É nesse sentido amplo, provando a presença dessas estreitas interfaces, que se relaciona o enriquecimento ambiental aos impactos da luz, dos ruídos, da limpeza das gaiolas e do transporte como fatores físicos ambientais com influência sobre o bem-estar e o estresse em ratos de laboratório (CASTELHANO-CARLOS; BAUMANS, 2009).

Em sentido mais restrito, trata-se de uma mudança no ambiente de cativeiro para aumentar o bem-estar físico e psicológico, proporcionando estímulo para os animais satisfazerem suas necessidades espécie-específicas (DAMY et al., 2010).

Atualmente, o enriquecimento ambiental está cada vez mais em pauta como uma forma de melhorar o bem-estar de roedores, proporcionando-lhes oportunidades de expressar seus comportamentos típicos. Compreende-se que possa ser desde tão complexo como pela adição de dispositivos comerciais nas gaiolas (frequentemente chamados de “móvel” ou “brinquedos”) ou até mesmo tão simples como pelo fornecimento de retalhos de tecidos a partir do qual os animais possam facilmente construir seus ninhos (SMITH; CORROW, 2005).

Todavia, é certo que todas as pesquisas que dependem do uso de animais também dependem da construção de ambientes e infraestruturas para alojá-los, por isso, a importância de se estudar o enriquecimento ambiental quando na experimentação animal (RAMSDEN, 2011). Assim, existe a necessidade de uma nova visão de mundo sobre o alojamento e o manejo dos animais de laboratório, apontando-se para avanços recentes da tecnologia e de novos conhecimentos sobre as várias condições de acomodação, incluindo a adequação de espaço nas gaiolas, os benefícios do alojamento isolado *versus* em grupo, a instalação de sistemas de ventilação nas gaiolas, a termorregulação do ambiente, os materiais utilizados como cama, entre diversas outras possibilidades de enriquecimento ambiental (GONDER; LABER, 2007).

Entretanto, adverte-se para o fato de que o enriquecimento ambiental reduz, porém, não elimina os inúmeros problemas associados ao confinamento espacial (BALCOMBE, 2006).

Sua provisão é recomendada pelas diretrizes europeias de bem-estar de animais de laboratório e acredita-se que sua implementação possa incrementar a aprendizagem e a plasticidade do SNC em resposta ao meio ambiente (SIMPSON; KELLY, 2011).

Embora desafie técnicas historicamente consagradas de alojamento de animais de laboratório, ao aplicar práticas de enriquecimento ambiental às pesquisas de toxicologia, relata-se que uma abordagem criativa sobre a socialização e a acomodação desses animais é, de fato, compatível com a experimentação (DEAN, 1999).

Ao enfatizar a toxicologia da reprodução e do desenvolvimento, estuda-se o enriquecimento ambiental aplicado, especialmente, a roedores fêmeas. Assim, relatam-se efeitos positivos sobre aspectos emocionais ou cognitivos maternos e sobre a secreção de hormônios. Também se leva à redução de peso corporal nas progenitoras, pois minimiza a ociosidade materna. Além do mais, o ganho de peso é mais rápido na prole uma vez que se eleva o consumo alimentar por reforçar a interação social entre os filhotes. Portanto, os resultados do enriquecimento ambiental, definitivamente, parecem ser mais benéficos tanto para a prole como para as mães quando as alterações no ambiente são implantadas ainda durante o período gestacional (GIRBOVAN; PLAMONDON, 2013).

O quadro 3 apresenta estudos *in vivo* relacionados ao enriquecimento ambiental. Nesse contexto, diversos autores demonstraram que um ambiente enriquecido leva a resultados positivos sobre diversos aspectos do bem-estar animal. Ou seja, a criação de um alojamento com estímulos apropriados aos roedores, indiretamente, oferece oportunidade para que o animal possa ter suas necessidades básicas – comportamentais e/ou fisiológicas – atendidas.

Embora o enriquecimento ambiental designe idealmente as modificações no ambiente de alojamento que resultam em melhoria significativa do bem-estar animal, para Abou-Ismaïl et al. (2010) o termo “enriquecimento” também deve envolver o ambiente social e/ou físico. Assim, aumentando a complexidade das gaiolas convencionais, promovem-se comportamentos indicativos de favorável nível de bem-

estar animal como tempo de sono mais prolongado e diminuem-se comportamentos agressivos que seriam indicativos de nível de bem-estar animal desfavorável.

Especificamente abordando o enriquecimento ambiental relacionado ao manejo reprodutivo, Moreira (2011) analisa técnicas que levam em consideração as características genéticas e reprodutivas nos biotérios de produção de roedores e sugere a adoção de modificações no ambiente com o objetivo de otimizar o acasalamento. O desafio é grande uma vez que tais locais são ambientes controlados, com espaço limitado, onde se mantêm os animais em gaiolas, restringindo assim as possibilidades de modificar o ambiente. Porém, nestas condições, o sucesso do enriquecimento ambiental está estreitamente ligado ao sistema de acasalamento, à questão de segurança sanitária, à funcionalidade e à viabilidade econômica. Espera-se que o ambiente enriquecido contribua para melhorar os índices reprodutivos e minimize a condição de estresse ocasionada pelo confinamento, promovendo o bem-estar animal.

Para Boggiano et al. (2008), a necessidade de obter resultados individualizados tem forçado muitos pesquisadores a alojar isoladamente os roedores. Porém, o isolamento é uma condição incomum para esta espécie na natureza, tendo efeitos adversos na sua fisiologia e no seu comportamento. Tal fato ameaça a validação dos resultados experimentais e a extrapolação destes dados aos humanos, os quais, por sua vez, também são seres sociais. Abou-Ismael e Mahboub (2011) citam que embora muitas vezes o alojamento individual dos roedores faça-se necessário devido ao delineamento experimental adotado, as modificações em prol do enriquecimento ambiental podem melhorar as condições de bem-estar desses animais que permanecem obrigatoriamente isolados.

Com isso, a fim de analisar o comportamento social dos roedores, diversos autores estudaram o enriquecimento ambiental aplicado a agrupamentos de animais para avaliação do comportamento coletivo (AUGUSTSSON et al., 2002; ABOU-ISMAIL et al., 2010), aplicado a alojamentos isolados para estudo do comportamento individual (ABOU-ISMAIL; MAHBOUB, 2011), aplicado ao gênero masculino para compreensão de comportamentos intrínsecos dos machos (ABOU-ISMAIL, 2011), aplicado ao comportamento alimentar (BEALE et al., 2011), para avaliar os efeitos do estímulo social no semi-contato físico com repartições no ambiente ou até mesmo com túneis interconectores de ambientes (BOGGIANO et al., 2008;

SØRENSEN et al., 2010), e o condicionamento às recompensas nos diferentes ambientes enriquecidos (VAN DER HARST et al., 2003). Portanto, sendo o rato um ser social, o seu isolamento demonstra aumentar a ansiedade e induzir distúrbios de comportamento. Por isso, recomenda-se que, sempre que possível, os roedores sejam socialmente alojados em grupos.

Sobre o papel do enriquecimento ambiental na promoção de interação com os dispositivos adicionados à gaiola, Spangenberg et al. (2005) abordam a importância da atividade física para o bem-estar animal. Esta tem a função de promover a liberdade comportamental e evitar o sedentarismo que pode levar a fatores de confusão nos resultados sobre o maior ganho de peso dos animais inativos ou ociosos. Diante desse ponto de vista, o enriquecimento ambiental, ao proporcionar atividade locomotora, tem a finalidade de exercitar e entreter os animais, possibilitando a manifestação de comportamento mais próximo do que seria considerado natural.

Já Ras et al. (2002) ao pesquisarem, especificamente, os tipos de cama empregados no interior das gaiolas, analisam o emprego de diversos materiais, como os subprodutos do milho (sabugo e palha), as lascas de madeira e o papel picado. Observam, contudo, que a cama visa proporcionar um maior conforto aos ratos, além de ter função higiênica mantendo o ambiente seco por mais tempo e retendo o odor de amônia.

Ademais, os tipos de piso do interior das gaiolas também foram analisados (MANSER et al., 1995; MERING et al., 2001; SAUER et al., 2006; UEHARA et al., 2012) constatando-se que os ratos possuem preferência por pisos sólidos (inteiriços) em detrimento dos gradis metálicos uma vez que os primeiros são os que mais se aproximam de seu habitat natural, deixando-os livres de dor e desconforto ao caminhar.

Ao investigar o tamanho e a qualidade do ambiente (CLEMENS et al., 2014; DEVONSHIRE et al., 2010; LYST et al., 2012; PATTERSON-KANE et al., 2001), destacam-se os avanços tecnológicos para o desenvolvimento de sistemas especiais de automatização de gaiolas (alguns até mesmo com programas computacionais integrados) e a tentativa de promover maior complexidade espacial através da construção de plataformas com diferentes níveis de acesso para os animais.

Enfim, conclui-se que o assunto é extenso e vai muito além da introdução de objetos nas gaiolas. No entanto, em relação à interação com estes, sumariamente, cita-se o enriquecimento ambiental com blocos e bolas de madeira para roer, brinquedos de nylon, abrigos, ninhos, teias, estruturas para subir ou escalar como escadas e cordas, papéis picados, esferas de madeira para arrastar, blocos de feno, blocos de palha, redes, tubos plásticos, palitos de madeira para roer, barreiras divisórias, canudos de papelão, pilares fixos de madeira, placas de mármore, bolas metálicas, folhas de papel de seda, plataformas de madeira, túneis de PVC, pirâmides, bases cilíndricas de plástico, latas, varas e lascas de madeira, nozes, caixas plásticas, plataformas de andares, comedouros internos adaptados e mais acessíveis aos animais, etc.

Nesse ínterim, ressalta-se a importância do estudo do enriquecimento ambiental aplicado ao âmbito da experimentação animal, melhorando, sempre que plausível, o ambiente de alojamento de roedores de laboratório. Na toxicologia da reprodução e do desenvolvimento, onde os ratos constituem a grande maioria dos animais utilizados nas pesquisas, um ambiente enriquecido pode garantir boa qualidade dos estudos científicos, com maior reprodutibilidade e validade de seus resultados.

**Quadro 3 - Condições de alojamento e o enriquecimento ambiental no biotério.**

Indivíduos	Objetivo	Intervenção	Metodologia	Resultados	CEUA/Guias e país(es) pesquisador(es)	Referência
Ratos machos Wistar (4 grupos, n=18 animais). 6 semanas de experimento.	Investigar os efeitos a longo-prazo do enriquecimento ambiental de gaiolas em relação aos indicadores comportamentais de bem-estar em ratos de laboratório.	Gaiolas-padrão e gaiolas-enriquecidas (com blocos e bolas de madeira, brinquedos de nylon, abrigos, ninhos, teias, dispositivos para subir - escadas e cordas, papel picado e outros objetos para estimular a atividade geral e atividade de roer, como esferas de madeira para rastejar).	Observação de comportamento por (a) análise digital (gravações) e (b) observação direta. Parâmetros observados: (a) atividade, ingestão de alimento e água, amontoamento, abaixamento em comedouro/bebedouro, animais abaixo e ao topo da gaiola, animais interagindo com objetos; e (b) atividade geral, manipulação do material da cama, estação, sono, interação social não agressiva, agonismo, entre outros comportamentos.	A presença de objetos de enriquecimento ambiental nas gaiolas foi associada a uma série de mudanças positivas no comportamento dos ratos, indicando bem-estar animal favorável e reduzindo níveis de agressividade.	HOAPC (Home Office Animal Procedures Committee). Cooperação internacional: Reino Unido e Egito.	ABOU-ISMAIL et al., 2010.
Camundongos linhagem BALB/c (6 grupos, n= 20 animais). 310 dias de experimento.	Avaliar a eficiência reprodutiva de camundongos endogâmicos BALB/c em diferentes idades de acasalamento, com ou sem enriquecimento ambiental.	Grupo não enriquecido (animais acasalados aos 28 dias de idade e sem canudo de papelão), grupo enriquecido (animais acasalados aos 28 dias de idade e com um canudo a cada troca de gaiola), grupo não enriquecido (animais acasalados com 45 dias de idade e sem canudo), grupo enriquecido (animais acasalados aos 45 dias de idade e com um canudo a cada troca de gaiola), grupo não enriquecido (animais acasalados aos 60 dias de idade e sem canudo), grupo enriquecido (animais acasalados aos 60 dias de idade e com canudo a cada troca de gaiola).	Avaliar três idades de acasalamento (28, 45 e 60 dias) para animais alojados em gaiolas enriquecidas ou não e suas influencias no desempenho produtivo.	Os resultados sugeriram que a implantação de um programa de enriquecimento ambiental para camundongos poderá melhorar os índices produtivos, na medida em que diminuirá, consideravelmente, a mortalidade pré-desmame, além de proporcionar a manifestação de comportamentos característicos da espécie e contribuir para o bem-estar.	Comissão de Ética e Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu. Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience (2003). Brasil.	MOREIRA, 2011.

Ratos machos Sprague-Dawley (2 grupos, n=20). 40 dias de experimento.	Efeito do uso de um divisor de gaiola que permite estímulo social sobre o estresse e o consumo alimentar em ratos.	Gaiolas convencionais com ratos isolados e gaiolas enriquecidas com uma barreira divisória metálica separando as duplas de ratos.	Análises de corticosterona fecal, consumo de alimento, peso corporal, corticosterona plasmática e níveis de catecolamina adrenal.	Um dispositivo, como a barreira divisória, pode melhorar o bem-estar animal permitindo estímulo social sem comprometer a integridade das manipulações experimentais em protocolos que tradicionalmente requerem ratos alojados individualmente.	The University of Alabama at Birmingham Institutional Animal Care and Use Committee. Estados Unidos.	BOGGIANO et al., 2008.
Ratos machos Wistar (2 grupos, n=12 animais). 7 semanas de experimento.	Investigar os efeitos do enriquecimento ambiental utilizando várias estruturas físicas na mensuração do bem-estar animal em ratos alojados em gaiolas isoladamente.	Gaiolas-padrão e gaiolas enriquecidas (com blocos e bolas de madeira, brinquedos de nylon, abrigos, ninhos, dispositivos para subir - escadas e cordas).	Utilizaram-se três métodos para amostragem de comportamento: análise digital (gravações de atividades gerais, sono, posicionamento na gaiola, entre outros comportamentos), teste de labirinto ( <i>plus-maze</i> ) elevado, e, análise de desempenho de órgãos (pesagem e exame patológico de timo, baço e glândulas adrenais).	Ratos alojados individualmente em gaiolas enriquecidas demonstraram maior bem-estar e melhor capacidade de lidar com o estresse ambiental do isolamento.	HOAPC (Home Office Animal Procedures Committee). Egito.	ABOU-ISMAIL e MAHBOUB, 2011.
Ratos machos Sprague-Dawley (2 grupos, n= 10 animais; e, 10 grupos, n=2 animais). 10 semanas de experimento.	Investigar a influência de alojar grandes grupos de ratos machos em gaiolas ambientalmente enriquecidas com maior espaço de piso por animal <i>versus</i> alojá-los individualmente em gaiolas convencionais e estudar as interações humano-animais.	Gaiolas convencionais para duplas e gaiolas grandes enriquecidas (com feno, blocos de palha, rede, escada, tubo plástico) para grupos.	Utilizaram-se três métodos para avaliar os diferentes aspectos das interações humano-animais: reação antecipatória ao manejo manual, teste de cooperação ao amordaçamento bucal e teste de aproximação humana (labirinto em Y). Também foram avaliados ganho de peso corporal e análises bioquímicas (relação corticosterona/creatinina urinárias, corticosterona plasmática, colesterol plasmático total e HDL).	O estudo não conclui que ratos alojados em grandes grupos tenham maior/menor bem-estar que ratos alojados em pares; porém sugere que ratos alojados em grupos em gaiolas maiores desenvolvam mais atividade física, levando-os a um menor ganho de peso.	The Swedish National Board for Laboratory Animals. Suécia.	AUGUSTSSON et al., 2002.
Ratos machos Wistar (2 grupos, n= 24 animais). 6 semanas de experimento.	Investigar os efeitos do enriquecimento ambiental sobre o comportamento agonístico e a dominância em ratos machos de laboratório.	Gaiolas-padrão e gaiolas enriquecidas (com blocos e bolas de madeira, brinquedos de nylon, abrigos, ninhos, teias, dispositivos para subir - escadas e cordas, papel picado e outros objetos para estimular a atividade geral e atividade de roer, como esferas de madeira para rastejas).	Observação de lutas agressivo-defensivas entre as duplas de ratos e registro do animal dominante/submisso.	O alojamento prolongado de ratos em gaiolas enriquecidas reduziu a interação agonística entre eles e não alterou a ordem de dominância.	HOAPC (Home Office Animal Procedures Committee). Egito.	ABOU-ISMAIL, 2011.

Ratos machos Wistar (4 grupos, n=6-8 animais). 40 dias de experimento.	Determinar o efeito do enriquecimento ambiental sobre o consumo alimentar, o peso corporal, o comportamento, as fezes e os hormônios plasmáticos de estresse em ratos de laboratório.	Gaiola-controle, gaiola enriquecida com palitos de madeira para roer, gaiola enriquecida com tubo plástico e gaiola enriquecida com ambos os objetos descritos.	Mensuração da ingestão de alimentos e do peso corporal, observação de comportamento diário, mensuração de realimentação pós-jejum, análises de IgA fecal, corticosterona plasmática e ACTH.	O enriquecimento ambiental não influenciou o peso corporal e o consumo alimentar e pode ser aplicado para refinar as condições de vida dos animais utilizados em estudos de homeostase energética sem comprometer os resultados experimentais.	British Home Office Animals (Scientific Procedures) Act 1986. Reino Unido.	BEALE et al., 2011.
Ratos machos e fêmeas Sprague-Dawley (2 grupos, n= 16 animais). 4 semanas de experimento.	Investigar as preferências por contato limitado entre os animais <i>versus</i> isolamento em ratos, avaliando a importância do contato não tátil com um parceiro social.	Gaiolas isoladas (separadas apenas por barreira perfurada) e gaiolas conectadas por túnel.	Os animais foram expostos por 48 horas nos dois tipos de compartimentos testados e realizaram-se as observações de comportamento.	Os resultados indicaram efeito significativo em relação ao gênero, pois as fêmeas passaram mais tempo próximas ao seu parceiro, enquanto os machos preferiram permanecer próximos do compartimento solitário das gaiolas. Além disso, as fêmeas foram significativamente mais ativas, devido a seu comportamento exploratório e de fuga.	Não cita. Dinamarca.	SØRENSEN, et al., 2010.
Ratos machos Wistar (2 grupos, n=24-36 animais).	Investigar os efeitos das condições de alojamento padrão potencialmente estressantes para ratos de laboratório em relação à sensibilidade para o ganho de recompensas	Gaiolas-padrão e gaiolas enriquecidas (com abrigo, túnel com passagens laterais e superior, comedouro baixo, pedaços de madeira).	Os animais passaram por condicionamento através de seu comportamento antecipatório para ganhar recompensas de sacarose. Posteriormente, realizaram-se observações de comportamento.	Os resultados demonstraram que os ratos alojados em gaiolas-padrão são mais sensíveis a recompensas que aqueles alojados em gaiolas enriquecidas, conforme refletido por seu comportamento antecipatório. Assim, os ratos alojados em gaiolas-padrão seriam mais estressados provavelmente pela maior privação da capacidade de satisfazer suas necessidades comportamentais.	Ethical Committee of the Utrecht University. Legal requirements of The Netherlands concerning research on laboratory animals. Holanda.	VAN DER HARST et al., 2003.



Ratos machos Sprague-Dawley (2 grupos, n= 16 animais). 4 semanas de experimento.	Investigar como as condições de alojamento afetam a atividade física em ratos.	Gaiolas individuais enriquecidas com tubo plástico preto, e, gaiolas grandes alojando grupos de oito ratos e enriquecidas com rede atalhada, caixa plástica invertida para abrigo e placa de plástico dividindo parcialmente o espaço.	Análise de comportamento, ganho de peso, níveis de corticosterona urinária (taxa de corticosterona/creatinina), propriedades musculares (força muscular em plano inclinado) e de desempenho (atividades enzimáticas e de glicogênio no músculo tríceps braquial).	Concluiu-se que o grupo de ratos alojados em grandes gaiolas enriquecidas resultou em menor ganho de peso corporal, aumento da atividade locomotora, maior capacidade de desempenho muscular, aumento atividade de enzimas musculares e de conteúdo de glicogênio, quando comparado aos ratos isolados.	The Uppsala committee for ethical review of animal studies. Suécia.	SPANGENBERG et al., 2005.
Ratos machos e fêmeas Wistar (4 grupos, n=5). 20 dias de experimento.	Investigar as preferências dos ratos em relação ao material da cama utilizada nas gaiolas.	Camas oriundas de subprodutos do milho – sabugo e palha, de madeira e de papel picado.	Gravações em vídeos sobre tempo de permanência dos animais e em labirinto “T”.	Os resultados demonstram que o sabugo de milho não é recomendado para ser utilizado como cama, exceto em situações em que a qualidade do ar e/ou a umidade são problemas significativos.	Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. Canadá.	RAS et al., 2002.
Ratos machos Sprague-Dawley (2 grupos, n= 32 animais). 15 semanas de experimento.	Investigar os efeitos do tipo de piso da gaiola sobre o bem-estar de ratos de laboratório.	Gaiola com piso sólido e cama e gaiola com piso gradil.	Mensuração do consumo de alimento e água, gravações em vídeo do comportamento no interior das gaiolas, análise da resposta dos animais à manipulação do técnico, teste de preferência.	Os resultados demonstraram que os ratos possuem preferências por pisos sólidos em detrimento das grades.	Home Office (1989). Code of Practice for the housing and care of animals used in scientific procedures. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986. Reino Unido.	MANSER et al., 1995.
Ratos machos Wistar (4 grupos, n= 1-9 animais). 7 semanas de experimento.	Analisar as estimativas do número apropriado de ratos nas gaiolas sobre a interação com o ambiente do alojamento.	Gaiolas com 1, 2, 3 e 4 animais; gaiolas com pisos sólidos e gradis, gaiolas com blocos de madeira para roer.	Análise dos seguintes parâmetros fisiológicos: peso corpóreo final, crescimento, níveis de corticosterona sérica, pesagem de órgãos e tecidos (timo, glândulas adrenais, baço, tecido adiposo marrom interescapular e tecido adiposo epididimal) para avaliação dos efeitos de enriquecimento ambiental, do tipo de gaiola e do tamanho do grupo.	Os resultados indicam que alguns dos parâmetros fisiológicos são susceptíveis à variabilidade atribuída às modificações ambientais. Além disso, eles sugerem que a variação dos diferentes parâmetros pode alterar de uma experiência para outra e entre diferentes ambientes atrapalhando assim as estimativas do número adequado de animais.	Não cita. Revisão literária de três experimentos. Finlândia.	MERING et al., 2001.

Ratos machos Sprague-Dawley (2 grupos, n=22-23 animais). 4 semanas de experimento.	Analisar os valores laboratoriais de patologia clínica em ratos alojados em gaiolas com piso de gradil em comparação com aqueles alojados em gaiolas com piso sólido.	Gaiolas com piso sólido de policarbonato e cama, e, gaiolas com piso de grade metálica.	Avaliação do animal nos dias 0, 14 e 28, através de exame físico, mensuração de ganho de peso, análise bioquímica sérica (ALT, AST), análise hematológica, coagulação sanguínea, mensuração de corticosterona urinária, urinalise e creatinina urinária e expressão gênica de isoenzimas hepáticas CYP450.	Não foram encontradas diferenças clinicamente relevantes entre os dois grupos para qualquer dado laboratorial.	Institutional animal care and use committee (Princeton). Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, International (AAALAC). Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Estados Unidos.	SAUER et al., 2006.
Ratos machos Fisher-344 (2 grupos, n= 5 animais). 1 semana de experimento.	Investigar a expressão gênica em ratos alojados em gaiolas com piso sólido <i>versus</i> com piso gradil.	Gaiolas com piso sólido de policarbonato e cama de papel picado, e, gaiolas com piso de grade metálica.	Coleta de sangue e extração do RNA <sub>total</sub> dos glóbulos brancos para, então, estudar as respostas transcricionais através de método de análise de microarranjos de DNA.	Os resultados demonstraram elevada expressão de alguns genes quando os animais permaneceram em pisos de grades induzindo o estresse em curto prazo. Logo, sugeriu-se que a saúde e o bem-estar de ratos de laboratório são passíveis de serem melhorados através do alojamento em pisos sólidos.	Regulamentos de experimentação animal de Shinshu University e Seiko Epson Corporation. Japão.	UEHARA et al., 2012.
Ratos machos Lister-Hooded, Lewis, Fischer-344 e Wistar (4 grupos, n=12 animais). 24 semanas de experimento.	Comparar o comportamento de estirpes comuns dos ratos de laboratório Lister Hooded, Lewis, Fisher-344 e Wistar no sistema automatizado de gaiolas.	Exposição ao sistema automático de gaiolas ( <i>PhenoMaster</i> ) aos 2, 4 e 6 meses de idade, durante 70 horas cada.	Ganho de peso semanal, peso e comprimento corporal na 10ª. semana de idade, atividade geral, comportamento exploratório, consumo de água e alimento, e mensuração da calorimetria indireta.	O sistema automatizado de gaiolas é de particular interesse para a fenotipagem comportamental de animais de laboratório uma vez que fornece medidas de comportamento mais robustas e válidas quando comparado aos testes clássicos, possibilitando maior reprodutibilidade e validade dos resultados.	Commission for Animal Experiments at the Regierungspräsidium Tübingen. Guideline of the German Animal Welfare Act. Alemanha.	CLEMENS et al., 2014.

Ratos machos Fischer-344 (3 grupos, n= 12-7 animais). 49 dias de experimento	Investigar como o enriquecimento ambiental modifica componentes específicos da atividade sensorial na barreira do córtex de ratos.	Gaiola convencional, gaiola minimamente enriquecida (plástica de tamanho 76x60x30 cm <sup>3</sup> ) e gaiola maximamente enriquecida (de madeira/metal com tamanho de 90x60x60 cm <sup>3</sup> ).	Os registros foram realizados através de gravações de eletrofisiologia simultânea (ECG e EEG) e imagem óptica <i>in vivo</i> .	As alterações permanentes e abrangentes nas condições de abrigo conferiram nenhuma elevação na função sensorial quando comparadas às produzidas pelo enriquecimento mais brando durante o manejo regular dos ratos e os testes comportamentais, sendo um achado com implicações para melhorias no bem-estar animal através mudanças práticas para a criação desses.	Local University Ethical Committee (Oxford). Home Office approval under the Animals (Scientific Procedures) Act, 1986. Code of Practice for the Housing and Care of Animals in Designated Breeding and Supplying Establishments. Reino Unido.	DEVONSHIRE et al., 2010.
Ratos machos e fêmeas Lister-Hooded (2 grupos, n= 3-9 animais). 18 dias de experimento.	Investigar os efeitos de um novo sistema de enriquecimento ambiental, de alta complexidade espacial, sobre o desenvolvimento comportamental e o desempenho de tarefas em ratos Lister-Hooded.	Gaiola convencional e gaiola enriquecida (transparente e com dois andares).	Análise das diferenças de comportamentos e desempenho cognitivo. Observações de comportamento materno, teste de labirinto em "T", teste de reconhecimento de novo objeto.	Os resultados demonstram que o aumento da complexidade espacial não afeta significativamente o desenvolvimento e o desempenho materno, mas pode melhorar a aprendizagem das fêmeas em tarefa não espacial.	University of Manchester Ethical Committee. UK Home Office Guidance Regulations. Reino Unido.	LYST et al., 2012.
Ratos machos e fêmeas Hooded Norway (5 grupos, N=12). Não cita tempo de experimento.	Avaliar as preferências por tipos de gaiolas em ratos de laboratório.	I. Gaiola com espaço maior (de tamanho duplo), gaiola com grupo social maior (três ratos), gaiola contendo quatro pilares fixos de madeira e gaiola com novos objetos (brinquedos como uma placa grande de mármore, um bloco de madeira, uma bola de arame, etc.), e gaiola semi-enriquecida (com ambas as quatro modificações ambientais). II. Gaiolas contendo quatro folhas de papel de seda, papel desfiado, plataforma de madeira, túnel de PVC, três túneis colados (pirâmide), base cilíndrica de plástico, lata grande de café, duas varas de madeira, quatro nozes.	Gravações e observações de comportamento e testes de preferência através de labirinto "T" e em caixa de acesso contínuo.	Os resultados demonstram que os ratos não mostraram preferências significativas para a maioria das opções de objetos, exceto para papel picado, caixa assentada (abrigo) e gaiola semi-enriquecida que incorpora as diversas modificações.	Não cita. Cooperação internacional: Canadá e Nova Zelândia.	PATTERSON-KANE et al., 2001.

Fonte: Elaboração própria.

## 4.2 Ruídos

O elevado nível de ruídos pode causar consequências mensuráveis em diferentes órgãos e sistemas orgânicos, provocando sintomas como hipertensão arterial, taquipneia e hiperatividade hormonal. Ademais, tais ruídos no biotério ou no laboratório podem levar a comportamento anormal e reações no organismo que mascaram e falseiam os resultados experimentais esperados. Os ruídos abruptos e irregulares, oriundos da execução de tarefas humanas no manejo dos ratos, são igualmente estressantes aos ruídos constantes produzidos por aparelhos e equipamentos instalados para funcionamento permanente, como geradores e geladeiras. Ademais, ressalta-se que muitas espécies de animais podem distinguir ultrassons; entre estas, estão os ratos que possuem amplo alcance auditivo entre 200 Hz a 80 kHz (DAMY et al., 2010).

Cabe aqui uma observação sobre a importância do estudo dos ruídos em relação a inúmeras patologias estudadas na contemporaneidade, sendo este um assunto de extrema relevância na área da medicina do trabalho. Alguns autores sugerem que o nível de ruídos deve estar abaixo de 60 dB quando se trata da experimentação animal (DAMY et al., 2010). Porém, ao pesquisar dados sobre a avaliação da acústica para humanos em áreas habitadas, visando o conforto da comunidade, encontram-se níveis mais restritivos que devem ser adotados para o homem (ASSOCIAÇÃO..., 2000). Tal fato gera certa estranheza ao constatar que, tendo os roedores uma sensibilidade audível maior que os seres humanos, os parâmetros adotados para tolerância de ruídos dentro do laboratório deveriam ser ainda mais limitantes.

Também é certo que os ruídos no interior das gaiolas ou externamente na sala de criação não devem perturbar os sons emitidos pelos próprios animais para se comunicarem como em caso de cortejo, cuidado materno, agressão e defesa. Então, foram selecionados estudos *in vivo* que abordam os ruídos nos ambientes de criação de roedores e suas implicações ao bem-estar animal, descritos no quadro 4.

De acordo com Ávila (2012), os animais de laboratório estão sujeitos a uma variedade de ruídos diários que podem afetar seu bem-estar, apontando o trabalho humano nas salas de animais como uma importante fonte de ruídos com intensidades e frequências variáveis capazes de causar alterações comportamentais

e fisiológicas nesses animais. Quando os ratos são expostos a elevado nível de ruídos durante o período gestacional e de desenvolvimento ponderal dos neonatos, além de aumentar a casuística de filhotes natimortos, interfere-se no comportamento materno, o que conseqüentemente diminui o ganho de peso do filhote a partir do quarto dia na primeira semana de vida.

Diante disso, Baldwin et al. (2006) sugere o monitoramento permanente dos ruídos através até mesmo da instalação de detector de ultrassons na sala criação de ratos. De fato, o reconhecimento dos efeitos sonoros, audíveis e não audíveis por parte do pesquisador, é complicado, pois se está trabalhando com espécie com audição bastante sensível, especialmente numa escala de 20 kHz a 30 kHz – sendo esta faixa de frequência já inaudível aos humanos.

Por fim, Voipio et al. (2006) ao comparar diferentes estilos de trabalho humano com animais (calmo e apressado) nas tarefas de retirada da gaiola do rack, colocação da gaiola na mesa e recolocação da mesma no rack, verificam que embora os valores dos manejos variem numa intensidade de ruído entre 70 dB a 90 dB, o modo apressado gera de 10 dB a 15 dB a mais que o modo calmo. Nesse contexto, afirma-se a necessidade de adoção de métodos de trabalho corretos e tranquilos dentro do biotério ou do laboratório, sendo que os níveis elevados de ruídos não só podem, como devem ser eficientemente evitados na maioria dos casos.

Assim, verifica-se que os pesquisadores devem sempre levar em consideração o nível de ruídos ao criar e manter um ambiente para animais de laboratório, especialmente atentos às respostas fisiológicas causadas pelo estresse sonoro e sua relação com os parâmetros reprodutivos, o comportamento maternal e o desenvolvimento da prole.

**Quadro 4 – Condições sonoras e ruídos presentes no ambiente de criação e de experimentação animal.**

Indivíduos	Objetivo	Intervenção	Metodologia	Resultados	CEUA/Guias e país(es) pesquisador(es)	Referência
Ratos fêmeas e machos Wistar (2 grupos, n= 41 animais). 1 mês de experimento.	Analisar os efeitos dos ruídos gerados durante a atividade humana na gestação de ratas e no crescimento ponderal dos neonatos.	Grupo controle (sem ruídos) e grupo submetido aos de ruídos selecionados gravados (arrastar banco, arrastar caixa, bater porta, colocar caixa na mesa, chave caindo da prateleira, colocar tampa da gaiola e ruído de fundo).	Após o acasalamento, houve a exposição aos ruídos em duas sessões de 20 min/dia com intervalo de 15 s entre cada sessão durante toda a gestação e na primeira semana de vida dos filhotes. Procedeu-se a contagem do número geral de partos, de partos com filhotes vivos, de natimortos, de filhotes vivos, e, o acompanhamento do desenvolvimento ponderal dos filhotes (ganho de peso corpóreo).	Os resultados demonstraram que os ruídos gerados pela atividade humana no biotério ou laboratório podem gerar filhotes de ratos natimortos e interferir no comportamento materno, diminuindo o peso dos filhotes.	CEUA da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Brasil.	ÁVILA, 2012.
Ratos machos Sprague-Dawley (3 grupos, n=8 animais). 6 semanas de experimento.	Determinar o efeito de ruídos sonoros na morfologia da mucosa intestinal de ratos de laboratório.	Grupo alojado em sala com acústica similar ao natural (sem qualquer ruído adicional) por 3 semanas, grupo com ratos expostos aos ruídos sonoros por 3 semanas, e grupo com ratos expostos aos ruídos sonoros durante 3 semanas seguidas de alojamento em sala silenciosa para recuperação por mais 3 semanas.	Observação do comportamento animal (duração da auto-limpeza, frequência de levantamentos e frequência de bocejos) e análise microscópica (óptica e eletrônica) da mucosa do intestino delgado.	Os resultados demonstraram que as alterações histopatológicas achadas nos íleos dos ratos que passaram por condição de ruídos sonoros foram significativamente maiores que as de ratos de ambientes silenciosos bem como os indicadores comportamentais revelaram as mesmas variações.	University of Arizona Institucional Animal Care and Use Committee. Estados Unidos.	BALDWIN et al., 2006.
Ratos, não cita linhagem. (4 grupos, n= não cita). Não cita tempo de experimento.	Investigar os efeitos do material da gaiola e do estilo de manejo no laboratório sobre a sensibilidade auditiva dos animais na percepção de ruídos.	(a) Gaiola de policarbonato e procedimentos de trabalho calmo, (b) gaiola de aço inoxidável e procedimento de trabalho calmo, (c) gaiola de policarbonato e procedimento de trabalho apressado, (d) gaiola de aço inoxidável e procedimento de trabalho apressado.	Avaliaram-se os níveis de exposição sonora através de gravações por microfonia dos seguintes sons gerados pelos cuidados diários com os animais: I) Adição de alimento e troca da água dos bebedouros, II) Movimentos das prateleiras de gaiolas durante a limpeza da sala, III) Limpeza da sala com água corrente.	Os resultados demonstraram que o material da gaiola, o estilo de trabalho e a sensibilidade auditiva têm um impacto sobre o nível de exposição sonora dentro da gaiola do roedor.	Practical care procedures of University of Kuopio. Finlândia.	VOIPIO et al., 2006.

Fonte: Elaboração própria.

### 4.3 Ventilação

A ventilação é de suma importância para o bem-estar animal, pois além de fornecer suprimento de oxigênio e remover ar quente controlando a temperatura ambiente, também dilui e diminui o nível de contaminantes gasosos. A falta de ventilação adequada, aliada à alta densidade demográfica de animais e à falta de higienização das gaiolas, levam ao aumento das concentrações de amônia no ar respirado, causando irritação no epitélio de revestimento das vias aéreas superiores e aumento da suscetibilidade a doenças infecciosas. Além disso, o aumento da concentração de dióxido de carbono, superior a 8%, pode resultar em inconsciência e morte dos animais (DAMY et al., 2010).

Assim, a ventilação é um parâmetro essencial a ser analisado dentro do biotério uma vez que sua ausência ou simplesmente sua inadequação pode não somente prejudicar o bem-estar dos animais de experimentação como também levá-los a óbito (consequentemente, havendo prejuízo do número de indivíduos e interferência na significância estatística dos resultados). O quadro 5 mostra estudos *in vivo* que abordam o método de ventilação empregado na manutenção de roedores.

Como um aprimoramento tecnológico específico para ventilação e climatização de biotérios, relata-se o sistema de ventilação microambiental. Nesse sistema, o ar filtrado é insuflado, com temperatura e umidade constantes, diretamente no interior de cada gaiola ou caixa sem causar turbulência e proporcionando um microambiente livre de contaminação exterior, além de menor concentração de gases, devido à exaustão apropriada. Com isso, tem-se que as trocas de ar representam uma condição importante para melhorar parâmetros reprodutivos e de saúde em geral. Logo, tal sistema representa um avanço quando comparado ao sistema de ventilação diluidora em que a distribuição do ar na sala muitas vezes não é uniforme dentro das caixas abertas (KROHN et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2006).

Krohn et al. (2003) afirmam que no sistema de ventilação microambiental, para manter uma adequada qualidade do ar dentro das gaiolas e garantir altos padrões de bem-estar animal, o número de trocas de ar deve ser mantido em cerca de 50 vezes por hora, sendo que uma frequência acima de 80 trocas aéreas por hora poderia causar impacto negativo sobre os ratos.

De acordo com Teixeira et al. (2006), esse sistema individualizado de ventilação direta no interior da gaiola influencia positivamente o desempenho reprodutivo dos roedores através do controle do estresse microambiental com repercussão no sistema neuroendócrino. Também diminui a incidência de pneumonia em ratos (principalmente, micoplasmose murina) uma vez que evita a injúria na atividade das células ciliares do trato respiratório e o acúmulo de partículas na traqueia que seriam causados pelo alto nível de amônia presente no ar não controlado.

Ainda, em relação aos parâmetros reprodutivos, as vantagens da utilização de um sistema de ventilação microambiental estão relacionadas à possibilidade de alojamento com maior densidade de animais nas caixas, situação comum na toxicologia da reprodução e do desenvolvimento onde se faz necessário o acompanhamento conjunto da mãe com sua extensa prole. Do mesmo modo, possibilita intervalos um pouco maiores para troca das camas já que a amônia estará sendo diluída. Além disso, recomenda-se o controle atmosférico em instalações para animais de laboratório, especialmente, nas regiões do mundo onde a qualidade do ar nesses ambientes é susceptível de ser um problema à experimentação (TEIXEIRA et al., 2006).



**Quadro 5 – Condições de ventilação nos ambientes de criação e de experimentação animal.**

Indivíduos	Objetivos	Intervenção	Metodologia	Resultados	CEUA/Guias e país(es) pesquisador(es)	Referência
Ratos machos Sprague-Dawley (2 experimentos: I) Análise dos efeitos da velocidade do ar, 3 grupos; II) Análise dos efeitos das trocas de ar, 4 grupos; sendo que por telemetria N=8 animais e no teste de preferência N=10 animais). 1 semana de experimento.	Investigar o impacto da ventilação da gaiola em ratos alojados em sistema de ventilação individual (microambiental).	Gaiola controle sem ventilação individual, gaiola com velocidade do ar abaixo de 0,2 m/s e gaiola com velocidade do ar um pouco acima de 0,5 m/s. Gaiola controle sem ventilação individual, gaiola com trocas de ar de 50x/h, gaiola com trocas de ar de 80x/h e gaiola com trocas de ar de 120x/h.	Procedeu-se a monitoração das preferências através de duas gaiolas interconectadas com um tubo. E, através de implantes de telemetria, analisaram-se os parâmetros fisiológicos de frequência cardíaca e pressão arterial.	Os resultados demonstraram que a velocidade do ar no interior da gaiola de até 0,5 m/s não parece afetar os ratos, enquanto o número de trocas de ar em cada gaiola deve ser mantido abaixo de 80 vezes por hora para evitar impactos na fisiologia e no bem-estar animal.	Não cita. Dinamarca.	KROHN et al., 2003.
Ratos machos e fêmeas Wistar Han (3 grupos, n= 20 animais)	Investigar os efeitos do sistema de ventilação microambiental individualizado sobre a integridade das vias respiratórias em ratos de laboratório.	Gaiola controle com sistema de ventilação de diluição geral, grupo com sistema de ventilação microambiental com velocidade do ar entre 0,03-0,26 m/s (167 trocas de ar por hora), grupo com sistema de ventilação microambiental com velocidade do ar entre 0,27-0,80 m/s (615 trocas de ar por hora).	Foram analisadas as características do muco respiratório no epitélio nasal (conforme mensurado por morfometria quantitativa) e nos pulmões (conforme determinado pela composição celular obtida através de lavagem broncoalveolar). Avaliou-se o muco do trato respiratório através das seguintes técnicas: reologia (utilizando um microreômetro), transportabilidade mucociliar <i>in vitro</i> (em palato de rã), ângulo de contato (indicador de adesividade), diferença de potencial da membrana transepitelial como um biomarcador da integridade das vias aéreas e concentração de amônia (um dos poluentes que mais pode contribuir para ocorrência de doenças respiratórias).	Os resultados demonstraram que ratos mantidos sob ventilação de diluição geral em condições irregulares de higienização das gaiolas estão expostos a fatores que podem levar a efeitos deletérios no epitélio ciliado das vias aéreas, o que pode ser evitado através da utilização de sistema de ventilação microambiental.	ILAR – Institute for Laboratory Animal Resources – National Research Council (1996) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Cooperação internacional: Brasil e Canadá.	TEIXEIRA et al., 2006.

Fonte: Elaboração própria.

#### 4.4 Condições higiênico-sanitárias

A qualidade microbiológica dos ratos experimentais pode influenciar criticamente o bem-estar animal bem como a validade e a reprodutibilidade dos resultados da pesquisa. Especialmente na área da toxicologia, os animais devem atender a parâmetros de qualidade genética e sanitária, uma vez que são aí considerados reagentes biológicos. A padronização sanitária do modelo biológico está, então, relacionada com as condições higiênico-sanitárias do biotério ou do laboratório no sentido de que boas práticas de laboratório e de biossegurança previnem o desenvolvimento de infecções (muitas vezes assintomáticas). Portanto, é de suma importância o estabelecimento de um programa de monitoramento da saúde de animais de laboratório, sendo este parte integrante da garantia qualitativa de qualquer experimentação animal (CASTELHANO-CARLOS; BAUMANS, 2009; DAMY et al., 2010; FORBES, 1994; MÄLER et al., 2014; NICKLAS, 2008).

O quadro 6 mostra estudos *in vivo* a respeito das condições higiênico-sanitárias na experimentação animal. Assim, tem-se que a frequência de limpeza das gaiolas, a densidade populacional e os cuidados com a cama são fundamentais para assegurar a padronização sanitária do modelo biológico selecionado, evitando interferências de microrganismos patológicos externos.

Burn et al. (2006) descrevem que a manutenção das condições higiênico-sanitárias em gaiolas é necessária tanto para manter os roedores saudáveis como à biossegurança dos seres humanos que os manipulam, sendo que a preocupação mais comum decorrente de gaiolas sujas é com o excesso de amônia. Esta se torna tóxica aos animais em concentrações maiores que 25 ppm, acarretando danos respiratórios e oculares, além da possibilidade de dermatopatias devido ao prolongado contato direto dos animais com a cama suja.

No entanto, quando a limpeza das gaiolas é realizada de maneira excessiva pode causar estresse nos roedores já que eles se intercomunicam também através de seus odores. Dessa maneira, os sinais olfativos são importantes para identificação, reconhecimento e reprodução dos animais. Para Burn et al. (2006), a longo prazo, uma frequência de limpeza de gaiolas exagerada pode levar ao estresse crônico, tanto por inibir qualquer memória olfativa como por aumentar a manipulação dos animais durante as trocas das gaiolas. Tal exagero acarreta em

redução do ganho de peso, modificações no comportamento materno (canibalismo) e aumento da natimortalidade.

Horn et al. (2012) informam que o guia norte-americano de cuidado e uso de animais de laboratório publica normativas a respeito da densidade populacional nas gaiolas e do saneamento ou higienização destas. Em detalhes, as diretrizes de densidade, baseando-se no peso individual do animal e na reavaliação semanal do ganho de peso, incluem desde recomendações apropriadas para o tamanho do espaço para cada espécie animal, a fim de permitir os ajustes posturais normais, até o espaço do piso a ser ocupado por resíduos e um local em que o animal possa descansar. Já as diretrizes de saneamento sugerem que a higienização seja realizada uma vez por semana em gaiolas com piso sólido (maciço), através de desinfecção com produtos domissanitários, água quente ou ambos.

Do mesmo modo, as condições higiênico-sanitárias da cama representam uma preocupação ambiental importante que pode influenciar o bem-estar animal, subsequentemente, os resultados experimentais. A raspa de madeira, popularmente conhecida como maravalha, é o material mais comumente empregado, havendo atenção a sua granulometria a fim de garantir boa absorção dos excrementos. Recomenda-se sua esterilização com a finalidade de destruir a urease (através de alta temperatura e pressão), eliminar microrganismos e parasitas, além da remoção de componentes orgânicos oriundos de resinas e óleos voláteis da madeira (hidrocarbonetos aromáticos que podem afetar o metabolismo murino) (MIYAMOTO et al., 2008).

**Quadro 6** - Condições higiênico-sanitárias na criação de animais em biotérios.

Indivíduos	Objetivo	Intervenção	Metodologia	Resultados	CEUA/Guias e país(es) pesquisador(es)	Referência
Ratos machos Wistar e Sprague-Dawley (5 grupos, n= 64 animais). 5 meses de experimento.	Investigar os efeitos a longo prazo da frequência de limpeza das gaiolas e do tipo de cama nelas utilizadas sobre a saúde, o bem-estar e a manejo de ratos de laboratório.	(a) Grupo com limpeza de gaiola 2x/semana e com cama de maravalha (lascas de madeira aspen); (b) grupo com limpeza de gaiola 2x/semana e com cama de papel absorvente; (c) grupo com limpeza de gaiola semanal e com cama de maravalha (lascas de madeira aspen); (d) grupo com limpeza de gaiola semanal e com cama de papel absorvente; (e) grupo com limpeza de gaiola quinzenal com cama de papel absorvente.	Procederam-se a mensuração de peso corporal, a análise de condição corporal (feridas, letargia, diarreia), a observação de comportamento, a avaliação de cromodacrioreia (secreção da glândula da terceira pálpebra ocular ou de Harder - relacionada ao estresse), a mensuração de amônia ambiental, a manipulação dos animais e as análises histopatológicas (crânio, esôfago, estômago, traqueia, pulmões).	Os resultados demonstraram que a frequência de limpeza não teve impacto claro sobre o bem-estar animal, embora tenham reduzido as concentrações de amônia e a manipulação dos animais, e lutas não agressivas foram maiores entre ratos com limpeza semanal da gaiola. Os ratos alojados com maravalha apresentaram mais espirros e patologias pulmonares, além de maior ganho de peso. A cama de maravalha, que é relativamente inerte perante outras camas de madeira, apresentou ser mais prejudicial que a de papel.	Animal Procedures Committees of the Home Office. Cooperação internacional: Reino Unido e Canadá.	BURN et al., 2006.

<p>Ratos machos e fêmeas Sprague-Dawley e camundongos machos e fêmeas C57BL/6NHsd (12 grupos, n= 104 animais). 8 semanas de experimento.</p>	<p>Avaliar as práticas internas adotadas num laboratório (efeitos de densidade da gaiola, frequência de saneamento e tipo de cama utilizada) sobre o bem-estar animal, a saúde e o ambiente em camundongos e ratos, validando as normas de cuidados com animais de laboratório adotadas pela instituição pesquisadora uma vez que estas diferem das recomendadas pelo guia.</p>	<p>(a) Sexo: (a<sub>1</sub>) machos, (a<sub>2</sub>) fêmeas. (b) Tipo de cama: (b<sub>1</sub>) maravalha, (b<sub>2</sub>) celulose, (b<sub>3</sub>) misturados 50% de cada. (c) Densidades da gaiola: (c<sub>1</sub>) padrão do laboratório (maior densidade animal), (c<sub>2</sub>) recomendada pelo guia. (d) Frequência de higienização da gaiola: (d<sub>1</sub>) padrão do laboratório (menos frequente), (d<sub>2</sub>) recomendada pelo guia (1x/semana para gaiolas de piso sólido, através de produtos químicos, água quente ou ambos).</p>	<p>Foi avaliado semanalmente o ganho de peso corporal, a perda do apetite, o nível de amônia na gaiola, a concentração de ATP, o comportamento, a morbidade e a mortalidade; ao final do experimento foram avaliadas a corticosterona fecal, as análises microbiológica e histopatológica dos pulmões (somente em ratos).</p>	<p>Os resultados demonstraram que em ambas as espécies, os parâmetros indicativos de saúde e bem-estar animal não foram significativamente afetados pela densidade da gaiola e pela frequência de higienização adotada ou pelo tipo de cama. Os desvios brandos encontrados nos padrões de densidade da gaiola e frequência de higienização dos valores recomendados pelo guia não afetam negativamente a saúde, o bem-estar animal ou os índices produtivos na instituição norte-americana autora deste artigo.</p>	<p>Harlan Laboratories' Institutional Animal Care and Use Committee (IUACUC). Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC). Guide for the Care and Use of laboratory Animals, Institute for Laboratory Animal Research, 2011. Estados Unidos.</p>	<p>HORN et al., 2012.</p>
<p>Ratos e camundongos (não cita sexo nem linhagem) foram utilizados apenas para gerar a cama "usada", n= 5-8 camundongos em caixas de 225x338x140 mm, n= 3-4 ratos em caixas de 345x403x177 mm, durante 7 dias. 4 grupos experimentais.</p>	<p>Desenvolver um sistema inovador para melhorar a cama fresca e reciclar a cama usada através de aplicação de um processo hidrotérmico suave com alta temperatura e alta pressão de vapor seco.</p>	<p>(a) cama fresca, (b) cama usada, (c) cama melhorada, (d) cama reciclada.</p>	<p>Realizou-se o processamento das camas utilizando aparatos de pequena e larga escala. Determinaram-se as características físicas e químicas das camas. Habilidade da cama melhorada em absorver amônia análise da superfície estrutural da cama avaliação toxicológica da cama</p>	<p>Os resultados demonstraram que a melhoria e a reciclagem da cama torna-a mais segura aos animais, melhorando as condições de gaiolas e salas de biotérios.</p>	<p>Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of Tohoku University. Japão.</p>	<p>MIYAMOTO et al., 2008.</p>

Fonte: Elaboração própria.

## 4.5 Fisiologia animal

A importância de se estudar a fisiologia dos roedores de laboratório está diretamente relacionada ao conceito de *senciência*. Apesar de suas limitações, os modelos animais podem contribuir para avançar o conhecimento da fisiopatologia da dor e ainda ajudar a prever a relação de utilidade terapêutica *versus* risco toxicológico de novos medicamentos para uso humano e veterinário. Alguns autores defendem a experimentação animal para o estudo da dor neuropática, apoiando a ideia de que “o modelo mais válido de uma enfermidade é a própria enfermidade”, ou seja, que “nenhuma simulação experimental poderá ser idêntica à própria realidade por mais que se reproduzam detalhadamente todas as circunstâncias que concorrem a uma determinada situação clínica”; porém, enfatizam, obviamente, que somente os ensaios clínicos bem desenhados permitirão conhecer sua real eficácia no âmbito clínico (BAÑOS; RUIZ-BARRÍA, 2006, p. 542).

A fisiologia constitui um assunto complexo, mas cabe aqui destacar alguns pontos a serem aplicados no estudo do bem-estar animal, para que os mecanismos de estresse, dor e medo sejam cada vez melhor diagnosticados. O quadro 7 mostra estudos *in vivo* sobre algumas alterações ocorridas no ambiente e no organismo animal provocando a quebra do equilíbrio orgânico e a ativação da capacidade adaptativa sob estas alterações.

Verificando que o estresse é um fator de risco ao equilíbrio fisiológico durante o período gestacional, Liberati et al. (2004) relatam que existem diferenças significativas nos valores hematológicos e bioquímicos de ratas gestantes quando comparadas a ratas não prenhes. Tais divergências nos achados laboratoriais devem ser consideradas na interpretação de resultados após a exposição durante a fase de gestação a fármacos eleitos nos estudos toxicológicos. Também afirmam que os ratos Wistar Hannover podem ser um modelo animal alternativo ao uso dos ratos Sprague-Dawley na avaliação da segurança de potenciais fármacos candidatos à toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento.

Para estudar a resposta fisiológica ao estresse, relata-se a atividade física aplicada por meio de corridas (YANO; NAGAO, 1995) e natação (DE ARAÚJO et al., 2013). Também se avaliam a perda da homeostase e o metabolismo de estresse através da interação social sob diferentes condições de alojamento (GUHAD; HAU,

1996) e da injúria física direta pelo garroteamento dos membros com elásticos (MATSUURA et al., 2012). Logo, a fim de mensurar tais respostas fisiológicas, aborda-se, a seguir, a aplicação de diferentes biomarcadores de estresse.

Yano e Nagao (1995) avaliam o consumo de oxigênio em ratos durante o período de desenvolvimento enquanto De Araújo et al. (2013) estudam a enzima creatinoquinase (CK) verificando que, como consequência do estresse contínuo e da inadequada recuperação após treinamento físico, a CK muscular é liberada na circulação, aumentando seus níveis plasmáticos.

Já Guhad e Hau (1996) quantificam a imunoglobulina A (IgA) secretada pelas glândulas salivares coletando a saliva através de técnica não invasiva e não estressante aos animais; assim, comparam-na a diversos biomarcadores de estresse. Ressaltam que um grande número de moléculas, incluindo catecolaminas, corticosteroides, opiáceos endógenos e alguns hormônios hipofisários estão envolvidos em efeitos do estresse nas respostas imunes. Porém, quando tais moléculas são utilizadas como indicadores de estresse crônico, geralmente, requerem que os animais sejam submetidos a algum tipo de agente estressante de longa duração para a obtenção de amostras ou que sejam alojados em gaiolas metabólicas para coleta de urina 24 horas por dia. Outros parâmetros das mudanças fisiológicas, tais como a frequência cardíaca ou a pressão arterial acabam sendo transitórios e apenas podem ser aplicados de maneira complementar a outros métodos. As análises anatomopatológicas não são úteis quando se lida com o estresse pré-patológico, aquele que não resulta em alterações visíveis macro ou microscopicamente. E, por fim, as observações de comportamento podem ser utilizadas na avaliação do estresse a longo prazo, mas não são susceptíveis de serem alternativas padronizadas para a coleta, o processamento e a avaliação qualificada de um grande número de dados. Logo, uma vez que se almeje avaliar o bem-estar animal de maneira objetiva, o ideal é utilizar métodos não invasivos, em que os marcadores de estresse são razoavelmente sensíveis e as amostras são de fácil obtenção sem causar perturbação e sofrimento indesejado aos animais.

Do mesmo modo, Matsuura et al. (2012) relatam que a atividade da amilase salivar é um útil biomarcador tanto para estresse agudo como crônico em ratos; comparando-a com outros indicadores comumente utilizados na experimentação animal como, por exemplo, as alterações fisiológicas relacionadas à ingestão de

alimento e de água, à excreção fecal, ao ganho de peso corporal, bem como às alterações anatomopatológicas nos órgãos envolvidos com a resposta imune (glândulas adrenais, timo e trato gastrointestinal).



**Quadro 7 - Condições fisiológicas de animais usados com fins experimentais.**

Indivíduos	Objetivo	Intervenção	Metodologia	Resultados	CEUA/Guias e país(es) pesquisador(es)	Referência
Ratos fêmeas Wistar Hannover (2 grupos, n= 150 animais). 21 dias de experimento.	Comparar as diferenças em valores de hematologia e análise de bioquímica clínica em ratas grávidas Wistar Hanover <i>versus</i> controle (não grávidas).	Grupo de gestantes e grupo de não-gestantes.	Administrou-se água destilada V.O. SID no dia gestacional 6-17. No grupo- controle administrou-se no dia de estudo 7-18. Coletaram-se amostras de sangue nos dias 18 ou 19 (grupo de gestantes) e nos dias 19 ou 20 (grupo de não-gestantes) para hematologia de rotina (RBC, Hb, HCT, MCV, MCH, MCHC, WBC, SEG, LYMP, MONO, EOSI, BASO, PLT, RTIC%, RTIC CT) e testes de bioquímica clínica (ALT, AST, ALP, GGT, CK, Bilirrubina total, PTT, ALB, GLOB, colesterol total, triglicérides, glicose, ureia, creatinina, Na, K, Cl, Ca, P). Assim, foram estabelecidos intervalos de referência para gestantes e não-gestantes.	Os resultados demonstraram que as diferenças nos valores de hematologia e análise bioquímica em ratas Wistar Hannover grávidas são semelhantes aos encontrados em ratas Sprague-Dawley. Logo, isso apoia a utilização da linhagem Wistar Hannover como modelo animal na avaliação da toxicidade materna.	Institutional Animal Care and Use Committee. Good Laboratory Practice Regulations (Good laboratory practice for nonclinical laboratory studies. Code of Federal Regulations, Washington-DC, 2001). Guidelines for developmental toxicity studies (International Conference on Harmonization (ICH), Guideline on Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products, 1994), Estados Unidos.	LIBERATI et al., 2004.
Ratos machos Fischer-344 (4 grupos, n= 5 animais). 7 semanas de experimento.	Determinar a relação entre o consumo máximo de oxigênio e o desempenho de trabalho em ratos durante a fase de desenvolvimento.	Grupos de animais jovens sedentários expostos ao exercício físico e eutanasiados com 4, 5, 8 e 11 semanas de idade.	Os ratos foram exercitados em esteira para caminhadas e corridas durante um período de aclimação de 2 dias. Depois, foram expostos à diferentes velocidades na esteira (m/min) e diferentes VO <sub>2</sub> máx (ml/min/kg). Após eutanásia, avaliou-se o desenvolvimento de órgãos através de pesagem (peso corpóreo, coração, musculatura – músculo sóleo e extensor digital músculo extensor dos dedos, tecido adiposo do epidídimo).	Os resultados demonstraram que a velocidade da corrida para atingir o consumo máximo de O <sub>2</sub> aumentou de 4-8 semanas de idade e posteriormente teve um declínio. O desempenho de trabalho durante a fase de desenvolvimento, quando o rápido crescimento corporal ocorre, parece estar pouco relacionado com a redução do consumo máximo de O <sub>2</sub> relativo.	Não cita. Japão.	YANO; NAGAO, 1995.

<p>Ratos machos Wistar (3 grupos, n= 10 animais). 12 semanas de experimento.</p>	<p>Monitorar o estresse físico crônico usando biomarcadores, protocolos de desempenho e funções matemáticas para identificar as adaptações fisiológicas em ratos.</p>	<p>Grupo com metabolismo basal (eutanasiado 24h após adaptação), grupo sedentário (LM mensurado após 24h de adaptação, após 6 semanas e após 12 semanas do período experimental) e grupo exposto ao treinamento (LM mensurado após 24h de adaptação, após 6 semanas e após 12 semanas do período de treinamento).</p>	<p>Os ratos foram adaptados à água para natação por duas semanas, em tanques cilíndricos individuais profundos (120 x 60cm) com a finalidade de reduzir o estresse sem promover adaptações fisiológicas ao treinamento físico. O teste de lactato mínimo (LM) foi aplicado para determinação do desempenho aeróbico e anaeróbico durante o período experimental. O programa de treinamento teve duração de 12 semanas (6 dias/semana) e as sessões foram de 60 min/dia, utilizou-se função matemática para quantificar o volume do treinamento. Procedeu-se a mensuração da concentração de glicogênio nos músculos sóleo, gastrocnêmio e no fígado, além das mensurações de CK, ácidos graxos livres e glicose.</p>	<p>O treinamento monótono sobre lactato mínimo aumentou os níveis de substrato de energia, inalterou o desempenho aeróbico, reduziu a capacidade anaeróbica e elevou a concentração de creatinoquinase sérica.</p>	<p>Brazilian Resolutions on Bioethics in Experiments with Animals (PLC 93/08 – “Lei Arouca”). Guidelines of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals. Brasil.</p>	<p>DE ARAÚJO et al., 2013.</p>
<p>Ratos machos e fêmeas Wistar (3 grupos, n=6-12 animais). 9 dias de experimento.</p>	<p>Desenvolver uma técnica de coleta de saliva não invasiva e não estressante, e um ensaio quantitativo para IgA secretória em rato; elucidar quão a IgA secretada na saliva pode ser usada para uma avaliação sensível e confiável de estresse a médio prazo em ratos de laboratório.</p>	<p>Gaiolas somente com machos isolados, gaiolas com machos e fêmeas em pares monogâmicos e com substrato de cama, e gaiola grande com grupo de machos e sem cama.</p>	<p>Condicionamento animal para a coleta através da apresentação de uma recompensa de chocolate após cada sessão, sendo a saliva coletada por discos de papel filtro (5 mm de diâmetro) imersos diretamente na cavidade oral dos ratos. Análise dos níveis de IgA salivar através de imunoeletoforese.</p>	<p>O estudo indicou que os níveis de IgA secretória são reduzidos pelo estresse social, sendo esta molécula um marcador útil de bem-estar em ratos.</p>	<p>Laboratory Animal Science Association (LASA). Suécia.</p>	<p>GUHAD e HAU, 1996.</p>
<p>Ratos machos Fischer-344 (N = 24, experimentação individualizada). 13 semanas de experimento.</p>	<p>Estimar a utilidade da atividade da amilase salivar como biomarcador de estresse em ratos.</p>	<p>Identificação de diferenças individuais em resposta ao estresse.</p>	<p>Os animais foram expostos ao estresse através da restrição das patas levemente presas por tiras de elásticos. Foram avaliadas as alterações fisiológicas (ingestão de alimento e de água, excreção fecal, ganho de peso corporal e atividade da enzima amilase salivar) e variações anatomopatológicas (glândulas adrenais, timo e trato gastrointestinal).</p>	<p>Os resultados indicaram que a atividade da amilase salivar é aumentada pelo estresse agudo e reduzida pelo estresse crônico, sendo um biomarcador útil para estresse em ratos.</p>	<p>Animal Care and Use Committee of Iwate University. Guidelines of the Physiological Society of Japan. Japão.</p>	<p>MATSUURA et al., 2012.</p>

Fonte: Elaboração própria.

## 4.6 Etologia

Definida como o estudo biológico do comportamento, a etologia está, historicamente, associada com o trabalho do neerlandês Nikolaas Tinbergen e do austríaco Konrad Lorenz, que, ao lado do alemão Karl Von Frisch, foram agraciados com o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1973 por sua pesquisa sobre o comportamento animal (KIRK, 2009). Na experimentação animal, os princípios e estratégias da etologia devem ser cuidadosamente considerados, de modo a projetar experiências apropriadas e interpretar corretamente os resultados (BRANCHI; RICCERI, 2004).

Sob esta perspectiva, o estudo da etologia é aqui inseparável da ciência do bem-estar animal, pois analisa a evolução do comportamento dos ratos de laboratório. Para melhorar o bem-estar dos animais e, conseqüentemente, a qualidade final dos resultados das experimentações, faz-se necessário considerar os repertórios comportamentais das espécies – no caso, roedoras, conforme os estudos *in vivo* mostrados no quadro 8.

Arndt et al. (2010) destacam a importância do conhecimento da espécie a ser adotada como modelo de pesquisa uma vez que, embora ambos sejam roedores, os ratos (*Rattus norvegicus*) são predadores dos camundongos (*Mus musculus*) no ambiente natural e o contato físico entre eles, quando numa mesma gaiola, pode causar inúmeras situações estressantes. Já Burman et al. (2008), ao analisarem o comportamento social inato aos roedores, revelam que, uma vez que eles interagem e vivem em sociedade, o ato de remover indivíduos do grupo é uma experiência bastante estressante aos demais dentro da gaiola, tendo efeitos sobre o comportamento, a psicologia e o bem-estar animal.

A utilização de resultados da experimentação animal para o avanço de pesquisas sobre o comportamento humano é também uma aplicação da etologia sobre o campo behaviorista da psicologia. Assim, a teoria do foco regulatório diz respeito à percepção da realidade e o processo de tomada de decisão, afirmando que os objetivos individuais são definidos como estruturas representativas que guiam o sistema na busca por uma referência ou por um estado final. Os estudos demonstram a diferença entre duas orientações regulatórias: promoção e prevenção. E, embora tal teoria tenha sido desenvolvida a partir da hipótese humana para experimentação, alguns autores acreditam que ela muito possa contribuir para

pesquisas futuras sobre a personalidade, a motivação e o bem-estar animal (FRANKS et al., 2012; FRANKS et al., 2014).

Ainda sobre a etologia cognitiva, Cordero et al. (2012) relatam a evidência de raízes biológicas em ratos para a transmissão da violência contra a parceira de geração para geração, avaliando o impacto da dominância do macho no grupo (teoria cultural) e o aprendizado de agressividade que o restante da prole adquire ao entrar muito cedo em contato com figuras adultas violentas relevantes dentro do grupo (teoria da aprendizagem social).

Já Uchida et al. (2012) abordam a termorregulação comportamental, analisando o comportamento murino de esconder a cauda como um simples indicador de bem-estar animal consoante quando os ratos precisam poupar energia em ambientes com baixas temperaturas.

Por fim, Coutellier et al. (2008), ao estudarem a relação etológica de parturientes com suas proles, indicam que roedores fêmeas ajustam aspectos específicos do comportamento materno em resposta às diferentes propriedades do seu ambiente, como os efeitos do odor murino dissipado e da construção de ninhos. Logo, a falta de cuidado ativo com filhotes e a ausência de assistência ao local do ninho são dois aspectos do comportamento materno pós-natal que podem afetar sobremaneira toda a prole, gerando estresse e medo.

**Quadro 8 - Condições etológicas e comportamentais de animais usados com fins experimentais.**

Indivíduos	Objetivo	Intervenção	Metodologia	Resultados	CEUA/Guias e país(es) pesquisador(es)	Referência
Ratos machos Sprague-Dawley e camundongos machos Balb/c (3 grupos, n=15-30 animais). 3 semanas de experimento.	Investigar os aspectos fisiológicos e a responsividade ao estresse comportamental em ratos e camundongos alojados juntos (co-alojamento de espécies).	Gaiola somente com camundongos, gaiola somente com ratos e gaiolas com camundongos e ratos juntamente alojados.	Investigação comportamental através do teste de natação forçada, mensuração de peso corpóreo total, ganho diário de peso corpóreo e parâmetros endocrinológicos (corticosterona, atividade da enzima tirosina hidroxilase, concentração proteica em glândulas adrenais e timo).	Os resultados indicaram que as espécies co-alojadas sofrem estresse, logo se deve evitar alojar camundongos e ratos conjuntamente.	Animal Experiments Committee of the Academic Biomedical Centre, Utrecht. Principles of laboratory animal care. Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research, 2003. Cooperação internacional: Holanda e Tailândia.	ARNDT et al., 2010.
Ratos machos Wistar Hannover (6 repetições, 3 grupos, n= 13-25). 12 meses de experimento.	Investigar os efeitos da remoção de indivíduos de grupos de ratos jovens de laboratório sobre o comportamento, a fisiologia e o bem-estar dos animais restantes do grupo.	Gaiola pequena (1600 cm <sup>2</sup> ) com baixa densidade animal, gaiola grande (2500 cm <sup>2</sup> ) com baixa densidade animal e gaiola grande (2500 cm <sup>2</sup> ) com alta densidade animal.	Procedeu-se duas remoções de indivíduos dos grupos, após a primeira e após a segunda semana de experimento. Gravação e observação do comportamento e coleta de amostras de fezes para análise do nível de metabólitos de corticosterona fecal.	Os resultados demonstraram o ato de remoção de indivíduos foi, independentemente da condição da gaiola e do tempo, uma experiência estressante para os demais ratos, prejudicando o bem-estar animal; tais resultados comportamentais também refletiram nos parâmetros fisiológicos aumentando os níveis de metabólitos de corticosterona fecal.	UK Home Office Animal Procedures Committee. Cooperação internacional: Reino Unido e Egito.	BURMAN et al., 2008.
Ratos machos e fêmeas Long-Evans (N= 23 animais, experimentação individualizada). 4 dias de experimento.	Investigar as evidências para diferenças individuais no foco regulatório de ratos.	Identificação de diferenças individuais entre duas orientações regulatórias: promoção e prevenção.	Teste em conjunto de 6 gaiolas interconectadas (3 contendo recompensas de água e alimento, 2 com escuridão e 1 novo objeto nocivo – bola metálica infusora de chá contendo chumaço de algodão embebido em alvejante) e teste em gaiola solitária.	Os resultados classificaram os indivíduos como baixo, médio e alto comportamento aos testes. A teoria do foco regulatório foi capaz de prever o padrão global, podendo ser utilizada como um indicador que contribua à pesquisa futura sobre personalidade, motivação e bem-estar animal.	Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) at Columbia University. Estados Unidos.	FRANKS et al., 2012.

<p>Ratas fêmeas Long-Evans (N= 60 animais, experimentação individualizada). 3 dias de experimento.</p>	<p>Investigar um modelo teórico com implicações no bem-estar animal baseado na personalidade de ratos, estendendo a “teoria do foco regulatório” para indivíduos não humanos.</p>	<p>Identificação de diferenças individuais entre duas orientações regulatórias: promoção e prevenção.</p>	<p>Testes realizados em labirinto radial. 4 dos 8 braços do labirinto radial encontravam-se acessíveis, tendo 2 deles a presença de estímulos de sucesso (petiscos para avaliar promoção/ganho e escuridão para avaliar prevenção/segurança), já nos outros 2 braços havia estímulos de falência (sem petiscos para avaliar ausência de promoção e iluminação para avaliar insegurança).</p>	<p>Os resultados apontam para a potencial utilidade da “teoria do foco regulatório” como um modelo para comportamento e bem-estar animal. Ela distingue 2 tipos de abordagens motivacionais: promoção (motivação de ganho) e prevenção (motivação de segurança).</p>	<p>Institutional Animal Care and Use Committee (IUACUC) at Columbia University. Guidelines of the NIH regarding the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Estados Unidos.</p>	<p>FRANKS et al., 2014.</p>
<p>Ratos machos e fêmeas Wistar (2 grupos, n= 22-44 animais). 10 semanas de experimento.</p>	<p>Demonstrar a agressividade gerada em ratos machos contra suas parceiras fêmeas após a exposição a situações estressantes na juventude e as evidências para raízes biológicas na transmissão transgeracional da violência contra a parceira.</p>	<p>Geração F0: gaiola com ratos machos isolados e gaiola de co-alojamento de ratos machos e fêmeas. Geração F1: gaiola com ratos machos isolados e gaiola de co-alojamento de ratos machos e fêmeas.</p>	<p>Os ratos machos (F0) foram expostos a estresse peripuberal e, um grupo, alojados junto com suas parceiras. Realizou-se gravações e observações de comportamento durante o co-alojamento macho-fêmea, observação de comportamento materno, caracterização comportamental da emocionalidade das fêmeas, mensuração de corticosterona plasmática, determinação da fase do ciclo estral, análise imunohistoquímica do cérebro.</p>	<p>Utilizando o rato como modelo animal desprovido dos fatores culturais humanos, demonstrou-se que os ratos machos se tornaram altamente agressivos contra suas parceiras quando adultos após serem expostos a experiências estressantes não sociais em sua juventude; seus descendentes machos também demonstraram agressividade elevada contra as fêmeas quando tiveram ausência da interação pai-filho em período pós-natal ou qualquer outro tipo de exposição à violência.</p>	<p>Swiss Cantonal Veterinary Office Committee for Animal Experimentation. Swiss National Institutional Guidelines on Animal Experimentation. Suíça.</p>	<p>CORDERO et al., 2012.</p>

<p>Ratos machos Wistar (2 grupos, N=80 animais). Não cita tempo de experimento.</p>	<p>Determinar se o comportamento de esconder a cauda durante o frio (estado de baixa energia) em ratos é necessário para manter a temperatura corporal.</p>	<p>Grupo de animais alimentados e grupo de animais em jejum de 42h.</p>	<p>Foram acoplados externamente dois tipos diferentes de suporte de cauda feitos a partir de folha fina de cobre (espessura 0,5 mm) e revestidos com tecido (a) constituído por três partes de 28 mm que permitem esconder a cauda e (b) constituído por uma única parte de 84 mm que impede tal comportamento da cauda. Os animais foram expostos à 27°C por 180 min ou à 20°C por 90 min seguidos de 15°C por 90 min. Mensuração continua da temperatura corpórea e do consumo de O<sub>2</sub> através de dispositivo radiotransmissor implantado intraperitonealmente.</p>	<p>Os resultados mostram que o comportamento de esconder a cauda está envolvido na regulação térmica contra o frio nos ratos em jejum.</p>	<p>The Institutional Animal Care and Use Committee of Waseda University. Japão.</p>	<p>UCHIDA et al., 2012.</p>
<p>Camundongos fêmeas e seus filhotes C57BL/6 (4 grupos, n=10 animais). 13 semanas de experimento.</p>	<p>Examinar os efeitos de odor e abrigo sobre o comportamento materno e sobre as respostas de medo e estresse em sua prole adulta.</p>	<p>(a) Gaiola de forrageamento sem odor de rato e sem abrigo, (b) gaiola de forrageamento sem odor de rato mas com abrigo, (c) gaiola de forrageamento com odor de rato mas sem abrigo, (d) gaiola de forrageamento com odor de rato e abrigo presentes.</p>	<p>O sistema de alojamento experimental consistiu numa gaiola-ninho com piso sólido e cama acoplada a uma gaiola de forrageamento com piso de gradil por meio de um túnel. Procedeu-se a avaliação dos parâmetros maternos ( gravações do comportamento materno, corticosterona plasmática responsiva ao estresse) e dos parâmetros da prole (peso corporal ao desmame, testes em labirinto circular elevado, em campo aberto, de comportamento exploratório livre, mensuração de corticosterona plasmática responsiva ao estresse).</p>	<p>Os resultados demonstraram que o fenótipo de camundongos é afetado pela variação no ambiente dependente do comportamento materno; dois aspectos do comportamento materno (cuidado materno ativo e atenção ao local do ninho) interagem na plasticidade do desenvolvimento de respostas de medo e estresse nos filhotes.</p>	<p>Não cita. Cooperação internacional: Alemanha e Áustria.</p>	<p>COUTELLIER et al., 2008.</p>

Fonte: Elaboração própria.

## 4.7 Manejo

O manejo adequado assegura o bem-estar animal, a segurança do pessoal envolvido e a confiança nos resultados obtidos. Num esforço para refinar as condutas procedimentais com animais de laboratório, um interesse recente tem-se gerado sobre a avaliação de quão tais procedimentos de rotina são angustiantes aos roedores. Aqui, trata-se como manejo as questões relacionadas ao transporte e a aclimatação, a coleta de sangue, a gavagem e ao treinamento de técnicos na experimentação animal.

O transporte entre o criador (empresas criadoras, biotérios) e o experimentador (instituições de pesquisa, laboratórios) deve ser feito de maneira que a saúde e o bem-estar dos animais sejam preservados. Prevê-se que cada transporte deva ser cuidadosamente planejado, de modo a evitar temperaturas desagradáveis e congestionamentos de trânsito, escolhendo sempre rotas menos distantes. Ainda, dentro da própria instituição de pesquisa, este deve ser feito em gaiolas protegidas por filtros, dentro de contêineres apropriados, de modo a evitar que pessoas tenham contato com alérgenos presentes em urina, saliva, pelos e cama, assim como microrganismos, substâncias químicas ou radiológicas inoculadas, ou mesmo o escape de algum animal. Sendo assim, enfatiza-se a observação do período de aclimatação do roedor na área de experimentação, sugerindo que este seja de, pelo menos, três dias para uma adequada adaptação ao novo ambiente (DAMY et al., 2010).

O principal objetivo no transporte de roedores é movê-los de uma maneira que não comprometa o seu bem-estar e garanta a sua chegada segura no destino, em boas condições de saúde e mínimo desconforto. Dessa maneira, quaisquer fatores que possam influenciar negativamente os animais durante a jornada devem ser reconhecidos e minimizados. Para isso, a atenção deve ser direcionada para:

- a) Saúde e bem-estar dos animais;
- b) Projeto dos containers; incluindo a provisão de carregamento e remoção de animais com o mínimo de desconforto;
- c) Condições ambientais adequadas dentro dos containers de animais;
- d) Qualidade e quantidade de cama, alimento e água;
- e) Duração e tipo de transporte;
- f) Experiência e treinamento da equipe técnica para manipulação e transporte de animais;
- g) Número de animais em cada container e espaço dado a cada animal (GUIDELINES..., 1993, p. 94).



Já a respeito das coletas de sangue, sabe-se que as amostragens sanguíneas são muitas vezes limitantes em roedores (sendo que um rato que pesa em torno de 200 g tem, aproximadamente, 19 ml de volume total de sangue), pois somente o volume de até 10% do sangue total pode ser coletado de um animal sem que este sofra qualquer efeito negativo sobre a sua condição. Diante disso, uma única coleta de 30% a 40% do volume sanguíneo corporal, certamente, pode levar a um choque hipovolêmico (com 50% de mortalidade), sendo observados os sintomas de pulso filiforme, mucosas secas e hipocoradas, ansiedade, taquipneia e hipotermia (GÓRSKA, 2000).

Diante disso, o quadro 9 mostra estudos *in vivo* que tratam de medidas de manejo que fazem parte das atividades de rotina.

Arts et al. (2012) analisam que o transporte de roedores de laboratório, inevitavelmente, causa estresse. Atentam-se para o fato que os pesquisadores devem estar conscientes deste impacto e proporcionar, de modo obrigatório, um período de aclimação suficiente para permitir a (re)estabilização dos parâmetros fisiológicos. Caso contrário, períodos de aclimação insuficientes põem em risco não só o bem-estar dos animais utilizados, mas também a confiabilidade dos resultados da experimentação.

Também Tabata et al. (1998), ao investigar o transporte de roedores a curtas distâncias (entre salas) e as coletas de amostras de sangue (por venosecção da cauda e por decapitação), ratificam a importância do período de aclimação dos animais como manejo apropriado antes do procedimento de obtenção das amostragens sanguíneas. Ademais, relatam a mensuração da glicose plasmática como um importante biomarcador de estresse em roedores.

Todavia, sendo as repetidas coletas de amostragens sanguíneas comuns em diversos protocolos experimentais, deve-se sempre adotar manejo rápido e com laboratoristas experientes, sendo avaliadas por diversos autores as punções por diferentes vias, a saber: veia jugular, veia coccígea da cauda, plexo retrobulbar e veia sublingual (FITZNER TOFT et al., 2006; HAEMISCH et al., 1999; MAHL et al., 2000).

Outro procedimento bastante utilizado nos estudos de toxicologia e farmacologia é a administração de substâncias pela via intragástrica, visto as dificuldades encontradas para administrá-las via oral a roedores. Apesar da ingestão

voluntária de substâncias *per os* nas experimentações ser sempre o manejo preferido, nem sempre é possível de ser realizada. Entre as limitações da via oral, estão quando todos os animais devem receber a mesma dose exata, precisamente num mesmo intervalo de tempo, ou quando a substância não pode ser administrada diretamente na boca devido a sua desfavorável palatabilidade. Nestes casos, Turner et al. (2012) ao investigarem os impactos da gavagem orogástrica sobre o bem-estar animal, relatam que tal procedimento não induz estresse crônico quando for realizado de forma correta por técnicos capacitados e aplicado a ratos que passaram por manejo de aclimação.

Finalmente, acredita-se ser essencial, ao abordar o manejo, também estudar as interações humano-animais. Van Driel e Talling (2005) apontam de maneira clara que, para minimizar os efeitos do estresse, consequentemente melhorando a consistência dos resultados experimentais, faz-se imprescindível a “familiaridade” dos pesquisadores ou laboratoristas com os roedores de experimentos. Esta se dá através do reconhecimento, por parte dos ratos, dos odores naturais emitidos pelos técnicos acostumados ao manejo diário na experimentação animal.

**Quadro 9** - Condições de manejo e cuidados com animais usados para fins experimentais.

Indivíduos	Objetivo	Intervenção	Metodologia	Resultados	CEUA/Guias e país(es) pesquisador(es)	Referência
<p>Ratos machos Wistar Unilever (4 grupos, n= 27 animais). 21 dias de experimento.</p>	<p>Investigar o impacto do transporte nos parâmetros fisiológicos e comportamentais em ratos Wistar e suas implicações durante os períodos de aclimatização.</p>	<p>(a) Grupo sem telemetria, não acondicionado e não transmovido; (b) grupo sem telemetria, somente acondicionado em caixa de transporte, mas não transmovido; (c) grupo com telemetria, não acondicionado e não transmovido; (d) grupo com telemetria, acondicionado em caixa de transporte e transmovido numa jornada de 3 h.</p>	<p>Através de cirurgia, transmissores foram implantados na artéria aorta abdominal em determinados grupos. Coletaram-se amostras de sangue para análise de corticosterona plasmática e creatinoquinase, foram feitas gravações e observações de comportamento, e mensurações fisiológicas através de telemetria (frequência cardíaca, pressão arterial, atividade muscular abdominal).</p>	<p>Os resultados demonstraram que o impacto estressante do transporte abrange todas as fases do experimento, incluindo, por exemplo, o condicionamento dos animais em caixas de transporte.</p>	<p>Animal Experiments Committee of the Academic Biomedical Centre, Utrecht. The scientific committee of the Department of Animals in Science and Society, Utrecht University.  “De Wet op de Dierproeven” (The Dutch “Experiments on Animals Act”, 1996).  “Dierproevenbesluit” (the Dutch “Experiments on Animals Decision,” 1996).  “Principles of Laboratory Animal Care”.  Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research (NRC 2003).  Holanda.</p>	<p>ARTS et al., 2012.</p>

<p>Camundongos machos e fêmeas B6C3F1 e ICR, e ratos machos e fêmeas Fischer-344 e Sprague-Dawley. (6-10 animais). Não cita tempo de experimento.</p>	<p>Comparar os efeitos de manejo, transporte da gaiola, anestesia e coleta de sangue repetida sobre os níveis de glicose plasmática entre camundongos e ratos.</p>	<p>Grupos de cada uma das diferentes linhagens de roedores foram: (a) aclimatizados à manipulação, (b) não aclimatizados à manipulação, (c) transmovidos por uma jornada de 1 min, (d) decapitados sem anestesia, (e) anestesiados com pentobarbital para coletas repetidas por venosecção.</p>	<p>Após anestesia com pentobarbital, coletou-se amostragens sanguíneas através de venosecção da cauda às 0 h, 1-2 min, 3-4 min, 5-6 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 24 h; e procedeu-se a mensuração da glicose plasmática. Outro grupo não passou por anestesia e a coleta foi realizada por decapitação dos animais.</p>	<p>Os resultados demonstraram que camundongos são mais sensíveis do que os ratos ao aumento da glicose plasmática como um indicador de estresse.</p>	<p>Não cita. Japão.</p>	<p>TABATA et al., 1998.</p>
<p>Ratos machos Sprague-Dawley (4 tratamentos, n=2 animais). 12 dias de experimento.</p>	<p>Avaliar o impacto de diferentes métodos de coleta de sangue em ratos de laboratório sob diferentes protocolos anestésicos.</p>	<p>(a) Coleta de sangue por punção jugular, (b) coleta de sangue por punção de veia da cauda, (c) coleta de sangue por punção periorbital, (d) Grupo-controle (sem punção).</p>	<p>Através de diferentes protocolos (anestesia com isofluorano, com dióxido de carbono e sem anestesia), realizaram-se as amostragens sanguíneas. Pelos implantes de transmissores de telemetria, foram analisados os seguintes parâmetros: frequência cardíaca, pressão arterial e temperatura corporal.</p>	<p>A coleta de sangue em ratos através de punção jugular parece ser o método em que os animais se recuperaram mais rapidamente quando comparado à punção periorbital e punção da veia da cauda; e, para anestesia, o isofluorano é preferencialmente recomendado quando comparado ao CO<sub>2</sub>.</p>	<p>Não cita. Dinamarca.</p>	<p>FITZNER TOFT et al., 2006.</p>

<p>Ratos machos Wistar (N= 10 animais, experimentação individualizada). Não cita tempo de experimento.</p>	<p>Verificar as consequências de coletas de amostras de sangue repetidas a curto-prazo sobre a consciência de ratos e os níveis circulatórios de corticosterona e de beta-endorfina.</p>	<p>Coletas de sangue individuais pela veia coccígea da cauda.</p>	<p>Em cada sessão, amostras de sangue foram coletadas por quatro vezes dentro de um período de 2 h (nos minutos 0, 20, 60 e 120). Cada rato foi submetido a duas dessas sessões e cada procedimento de coleta demorou 3-5 min. Mensuraram-se os níveis de corticosterona e de beta-endorfina plasmática imunorreativa.</p>	<p>Os resultados demonstraram que a inibição do feedback da secreção de corticosterona com a sustentada elevação de beta-endorfina sugerem uma intensidade de estresse moderada causada pela coleta sanguínea repetida. Em geral, a beta-endorfina parece melhor refletir os efeitos da exposição repetida a agentes estressores que a corticosterona.</p>	<p>Não cita. Alemanha.</p>	<p>HAEMISCH et al., 1999.</p>
<p>Ratos machos Wistar (2 grupos, n= 15). 24 dias de experimento.</p>	<p>Comparar os parâmetros de patologia clínica em 2 diferentes técnicas de coleta de sangue em ratos.</p>	<p>Coletas de sangue pelo plexo retrobulbar (veia do canto medial do olho direito) e coleta de sangue pela veia sublingual.</p>	<p>Após anestesia inalatória (isoflurano), coletou-se 8 amostragens sanguíneas nos dias 1 (às 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 7 h), 2, 3 e 23. Realizaram-se observações de comportamento, mensurações de ganho de peso corpóreo e consumo alimentar. Os parâmetros analisados foram hematológicos (contagem eritrocitária, hematócrito, CHCM, VCM, HCM, porcentagem de reticulócitos, contagem total de leucócitos, contagem diferencial de leucócitos e contagem plaquetária), bioquímica clínica (glicose, proteína total, albumina, ureia, colesterol, triglicérides, bilirrubina total,</p>	<p>Os resultados sugeriram um maior grau de dano tecidual em amostras coletadas do plexo retrobulbar do que a partir da veia sublingual. Apesar da grande variância inter-individual encontrada, valores médios mais elevados de prolactina em cada ocasião e de corticosterona após uma única amostra em animais em jejum indicaram estresse mais elevado associado com a amostragem de sangue a partir do plexo retrobulbar.</p>	<p>Cantonal Veterinary Office (Kantonales Veterinäramt). Swiss animal welfare regulations. Suíça.</p>	<p>MAHL et al., 2000.</p>

			creatinina, creatinoquinase, AST, ALT, alfa-amilase, lipase, Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Cl <sup>-</sup> , P <sup>3-</sup> , eletroforese proteica), endocrinológicos (corticoesterona e prolactina).			
Ratos machos Sprague–Dawley (5 grupos, 9-18 animais). 4 semanas de experimento.	Avaliação do procedimento de gavagem oral sobre o bem-estar animal em ratos.	(a) Grupo controle com animais não manipulados, (b) grupos com animais contidos para gavagem, (c) grupo para gavagem seca, (d) grupo de animais alojados individualmente para gavagem com 5 mL/Kg de água, (e) grupo de animais alojados em pares.	Os procedimentos de gavagem foram realizados através de sonda orogástrica. Realizaram-se observações de comportamento, além da mensuração de ganho de peso corpóreo e da concentração de corticoide fecal. Para o enriquecimento ambiental, ossinhos de nylon para mastigar foram utilizados com sucesso.	Os resultados demonstraram que a administração de soluções aquosas de 5 mL/Kg através de gavagem orogástrica não afetou negativamente o bem-estar animal, não sendo cronicamente estressante quando realizada por pessoal qualificado e em ratos que foram aclimatizados à manipulação.	The University of Guelph Animal Care Committee. Animals for Research Act of Ontario. Guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Canadá.	TURNER et al., 2012
Ratos machos Wistar (5 grupos, n=34-37 animais). Não cita tempo de experimento.	Investigar o efeito da identidade do experimentador e da sua familiaridade com os animais de experimentos nos resultados obtidos a partir de um teste de ansiedade padronizado.	Habituação com/sem 5 diferentes laboratoristas (mulheres, todas experientes no manejo de ratos).	Avaliaram-se os níveis de ansiedade em labirinto em cruz elevado.	Os resultados demonstraram que o grau de familiaridade dos ratos com suas laboratoristas (ou seja, o reconhecimento do odor dos jalecos utilizados por elas) teve efeito importante sobre os resultados obtidos em teste de ansiedade padrão.	Laboratory Animal science Association (LASA). Reino Unido.	VAN DRIEL e TALLING, 2005.

Fonte: Elaboração própria.

#### 4.8 Dieta

A dieta apresenta um profundo impacto sobre os resultados experimentais e, aqui, refere-se tanto em relação às formulações (concentrações nutricionais) quanto em relação a sua restrição ou abstenção nos protocolos que necessitam de jejum.

Sobre a formulação dietética, os ingredientes de origem vegetal bem como os de origem animal podem conter uma variedade de substâncias fisiologicamente ativas, naturais ou como resultado de contaminação. Algumas com importância nas rações peletizadas são: micotoxinas, nitrosaminas, pesticidas, formas orgânicas de metais pesados, saponinas, fitoestrógenos, etc. Por isso, é importante que a composição da dieta sempre seja verificada quanto ao seu efetivo potencial de absorção pelos roedores, ainda mais nos estudos toxicológicos onde o pesquisador deve estar atento a quaisquer contaminações no alimento ou na água (DAMY et al., 2010).

Já sobre o jejum, quando for requerido no protocolo experimental, deve-se encontrar um equilíbrio entre a concretização dos objetivos de pesquisa e a garantia do bem-estar animal. Existe relato que após 12 a 24 horas de jejum, os animais reduzem eficazmente as perdas de fluidos ou de energia, por uma combinação de ajustes comportamentais e fisiológicos, a fim de minimizar o estresse da privação. Mas, embora os roedores possuam ritmos nictemerais endógenos que os tornam particularmente adaptáveis à possível carência de alimentação ou de acesso à água uma vez ao dia, períodos mais longos de privação aguda ou restrição crônica são aceitáveis apenas em protocolos adequados de controle com avaliação diária de ganho/perda de peso corporal (ROWLAND, 2007).

O quadro 10 mostra estudos *in vivo* que abordam a continência da dieta alimentar e hídrica.

Molina-Hernández e Téllez-Alcántara (2004), investigando a aprendizagem de tarefas instrumentais, verificam que, quando os ratos são testados em jejum (e alojados isoladamente), efeitos colaterais indesejáveis ao bem-estar animal podem ocorrer como um maior comportamento de medo frente à ameaça.

Assim, Nowland et al. (2011) enfatizam que embora a privação dietética seja um procedimento científico muitas vezes necessário, deveria ser minimizada. Diante disso, verificam que um jejum de até 16 horas apresenta menos efeitos negativos em ratos quando comparado a um jejum de 24 horas. Portanto, sugerem que um

período de jejum de 24 horas ou mais deva receber a devida (re)consideração por parte dos pesquisadores no delineamento experimental.

Enfim, Kasanen et al. (2009) desenvolveram uma placa perfurada a ser usada como comedouro, sendo um importante refinamento experimental quando comparado a outros métodos tradicionais de controle da ingestão de ração. E, logicamente, embora a restrição alimentar cause maior estresse que a *ad libitum*, tal placa perfurada também funciona como um item de mobiliário, dividindo a gaiola em compartimentos e, por conseguinte, aumentando a complexidade estrutural do ambiente.



**Quadro 10** - Condições dietéticas (alimentar e hídrica) de animais usados com fins experimentais.

Indivíduos	Objetivo	Intervenção	Metodologia	Resultados	CEUA/Guias e país(es) pesquisador(es)	Referência
Ratos machos e fêmeas Wistar (12 grupos, n= 10 animais). 4 dias de experimento.	Investigar se ratos sem jejum e alojados em grupos desenvolvem o mesmo aprendizado de tarefas que ratos comumente testados em jejum e alojados isoladamente.	Grupos separados por gênero: machos e fêmeas. Grupos separados por alojamento: em conjuntos e isolados. Grupos separados por dieta: jejum por 12h, alimentados, peso corporal b/w.	Procederam-se testes comportamentais em labirinto em cruz elevado além da quantificação do volume fecal.	Os resultados mostraram que os animais alimentados e alojados em grupos aprenderam as tarefas da mesma forma que os do grupo controle, independentemente da condição de alojamento ou de gênero. No entanto, o jejum ou o alojamento isolado produziu comportamento de medo.	Strict animal care principles (National Institutes of Health, 1986 - Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington, DC). México.	MOLINA-HERNÁNDEZ e TÉLLEZ-ALCÁNTARA, 2004.
Ratos machos Wistar (2 grupos, n= 30 animais). 10 semanas de experimento.	Investigar um método de restrição alimentar a ratos de laboratório.	Grupo com dieta <i>ad libitum</i> e grupo com restrição alimentar moderada (usando um comedouro de placa perfurada).	Procederam-se as dosagens de corticosterona sérica e IgA fecal; após eutanásia com CO <sub>2</sub> , realizou-se o exame macroscópico interno (estômago para verificar a presença de úlceras gástricas), pesagem das glândulas adrenais e mensuração de adrenalina e noradrenalina nelas contida.	Os resultados demonstraram que o grupo com restrição alimentar moderada apresentou maiores níveis de corticosterona plasmática e menor secreção de IgA fecal, sugerindo que tal restrição cause estresse. No entanto, o grupo alimentado <i>ad libitum</i> apresentou maior tamanho das glândulas adrenais e maiores concentrações de adrenalina e noradrenalina. Nenhuma úlcera gástrica foi encontrada.	Finnish National Ethics Committee. Cooperação internacional: Finlândia e Dinamarca.	KASANEN et al., 2009.
Ratos machos Sprague-Dawley (7 grupos, n= 6 animais). 2 dias de experimento.	Investigar os efeitos do jejum a curto-prazo em ratos.	Grupo controle (sem jejum) e grupos em jejum de 2h, 4h,6h, 12h, 16h e 24h.	Os animais receberam um cateter na veia jugular (que permite a coleta de amostras de sangue sem manipulá-los) e foram alojados em gaiolas metabólicas. Procederam-se as análises hematológicas (hematócrito) e as de bioquímica sérica (ALT, FA, nitrogênio ureico sanguíneo, creatinina, glicose, PPT, CK e corticosterona).	Os resultados demonstraram que os ratos em jejum de 6h e 16h tiveram menor nível de glicose sérica que os ratos sem jejum e, somente os ratos em jejum por 24h tiveram níveis elevados de corticosterona sérica.	University (of Michigan) Committee on the Care and Use of Animals. Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, International (AAALAC). Institute for Laboratory Animal Research. Guide for the care and use of laboratory animals (Washington-DC). Estados Unidos.	NOWLAND et al., 2011.

Fonte: Elaboração própria.

#### 4.9 Identificação individual

Identificar individualmente os animais ou as colônias é importante ao delineamento experimental, porém não existe um método padrão-ouro para identificação, pois cada situação de pesquisa é única. Deve-se levar sempre em consideração o bem-estar animal e o tipo de experimentação a qual os roedores serão submetidos (DAHLBORN et al., 2013).

Para a *Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA)*, os métodos de identificação podem ser classificados em: a) temporários não invasivos (raspagem de certa região da pelagem com barbeador, marcação da pele através de canetas para tingimento com tinta a base de álcool); b) temporários invasivos (injeção subcutânea de tinta, aplicação de crachá na orelha); c) permanentes invasivos sem produção de amostra tecidual para análise de DNA (tatuagem na orelha, tatuagem na cauda, tatuagem no dedo, microchipagem); d) permanentes invasivos que possibilitam a coleta de amostra de tecido para análise de DNA (chanfradura da orelha, remoção da falange distal); e, finalmente, e) novos métodos (aplicação de mini-crachá na orelha - modificação do crachá clássico para orelha, microtransmissor de radiofrequência para telemetria, biometria através da distribuição dos pequenos vasos sanguíneos na pina auricular, microtatuagem com pigmentos luminescentes) (DAHLBORN et al., 2013).

O quadro 11 mostra estudos *in vivo* que abordam os métodos para identificação individual de ratos de laboratório.

Kasanen et al. (2011) citam que a identificação individual de animais de experimentação é uma prática comum e, muitas vezes, essencial à experimentação. Contudo, Iwaki et al. (1989) relatam que o método escolhido deve obedecer a quatro princípios fundamentais: ser simples para nomear (identificar), ser fácil de aplicar, não ser prejudicial aos animais e permanecer legível durante o tempo de vida do animal.

Para Kasanen et al. (2011), a tatuagem auricular e a chanfradura auricular devem ser substituídas pela microtatuagem dos coxins sempre que possível. Do mesmo modo, para Iwaki et al. (1989), a clipagem falangeana (remoção da falange distal) não é recomendada pelo ponto de vista do bem-estar animal.

Ademais, Iwaki et al. (1989) apontam que na experimentação de toxicologia da reprodução e do desenvolvimento, atenção especial é dada à identificação individual da prole. Isso ocorre porque, uma vez que os valores médios dos parâmetros das progênies são, geralmente, calculados em unidades de ninhadas, faz-se também necessário acompanhar os resultados individuais sobre crescimento e comportamento de cada filhote. Logo, a tatuagem dos coxins cumpre os requisitos fundamentais para a identificação a longo prazo em ratos, sendo uma técnica adequada para estudos que requerem uma única e permanente identificação em filhotes recém-nascidos.

**Quadro 11 - Métodos de identificação individual dos animais em biotérios.**

Indivíduos	Objetivo	Intervenção	Metodologia	Resultados	CEUA/Guias e país(es) pesquisadores	Referência
Ratos machos Sprague-Dawley e Wistar (3 grupos, N= 7 animais).	Comparar três diferentes métodos de identificação animal: tatuagem auricular, chanfradura auricular e microtatuagem em ratos sob telemetria cardiovascular.	Tatuagem nas orelhas, chanfradura nas orelhas e microtatuagem nos coxins.	Através de transmissores de telemetria, os dados cardiovasculares (pressão arterial e frequência cardíaca) foram coletados por 24 horas após os procedimentos. Os períodos de tempo de 0-1h, 1-4h, 4-16 h (escuro) e 16-24 h após a identificação foram analisados separadamente.	Os resultados demonstraram que as diferenças mais pronunciadas foram observadas durante a primeira hora após a identificação. A microtatuagem dos coxins foi o método que provou menores alterações cardiovasculares.	Animal Care and Use Committee of the University of Kuopio. Finlândia.	KASANEN et al., 2011.
Ratos machos e fêmeas Sprague-Dawley (3 grupos, n= 93-113 animais).	Investigar a utilidade da tatuagem nos coxins para a identificação de ratos recém-nascidos.	Grupo controle (sem identificação), grupo identificado por tatuagem na superfície plantar/palmar das patas (entre estes tatuados nos coxins, após o período de lactação de 21 dias, alguns foram selecionados para acasalarem sendo, então, tatuados nas orelhas e observados por 14 semanas, quando a capacidade reprodutiva foi estudada obtendo a geração F2), grupo identificado por clipagem (amputação) de dedos (corte através de tesoura na primeira articulação falangeana do 2 <sup>o</sup> ao 5 <sup>o</sup> dedo dos membros direito e esquerdo).	Foram avaliados o crescimento dos filhotes, a função, a maturação e o comportamento da prole (ereção da pina auricular e abertura dos olhos, reflexo de endireitamento, geotaxia negativa, teste de suspensão, habilidade para nadar, rotação em esteira, maturação sexual – descenso escrotal e abertura da vaginal). Também se avaliaram a capacidade reprodutiva das progenitoras (número de fêmeas utilizadas, de inseminadas, de gestantes, de corpos lúteos, de locais de implantação uterina, de fetos viáveis e peso fetal).	Os resultados demonstraram que o crescimento, a maturação e a capacidade reprodutiva não foram afetados nos dois métodos identificação estudados. Entretanto, no grupo da clipagem falangeana, o tempo até a queda no teste de suspensão em gradil foi significativamente reduzido, indicando que tal método de identificação não é adequado para experimentações comportamentais bem como também limita as análises esqueléticas dos membros.	Não cita. Japão.	IWAKI et al., 1989.

Fonte: Elaboração própria.

#### 4.10 Telemetria

Os sistemas de telemetria para monitoramento animal são uma tecnologia que permite, à distância e sem uso de fios a mensuração, de diversos parâmetros como ECG, EMG, EEG, pressão arterial, temperatura corporal, etc. A comunicação desses dados ocorre através de pequenos dispositivos transmissores, implantados internamente no animal para registro constante dos resultados. Para alguns autores, também representam um refinamento ao bem-estar animal na medida em que propiciam o alojamento dos roedores em grupos convenientes, sendo pouco invasivos e não sofrendo interferências por demais membros da mesma espécie (HAWKINS et al., 2004).

O quadro 12 mostra estudos *in vivo* que abordam a telemetria aplicada à experimentação animal.

Kort et al. (1998) inferem que os sistemas telemétricos, implantados por via subcutânea ou intraperitoneal, facilitam a coleta de dados que seriam tomados através de procedimentos convencionais difíceis de serem realizados em roedores (como, por exemplo, a mensuração de temperatura retal). Ademais, estes sistemas colaboram com a redução e o refinamento no uso de animais de laboratório, uma vez que a manutenção de roedores instrumentados facilita as repetidas coletas de informações a longo prazo, promovendo, por conseguinte, maior validade dos resultados científicos.

Todavia, Shoieb et al. (2012) relatam a ocorrência de alterações neoplásicas (sarcomatose peritoneal) no foco cirúrgico dos próprios implantes e indagam sobre a viabilidade, a praticidade e a confiabilidade dos sistemas de telemetria. Por isso, sua aplicação não exime o pesquisador, de maneira alguma, da monitorização clínica pró-ativa dos animais e da atenção a algumas limitações quanto à implantação pós-cirúrgica dos transmissores (como tempo de sobrevida recomendado de, no máximo, 12 meses) para maximizar tanto o bem-estar animal como a integridade científica.

**Quadro 12 - Análise de parâmetros por intermédio da tecnologia de telemetria.**

Indivíduos	Objetivo	Intervenção	Metodologia	Resultados	CEUA/Guias e país(es) pesquisador(es)	Referência
Ratas fêmeas RP e camundongos machos NMRI (4 grupos, n=10 animais). 1 semana de experimento.	Investigar um sistema de implante de microchip como método para determinar a temperatura corporal de ratos e camundongos em fase terminal.	Transmissor implantado por via subcutânea e transmissor implantado por via intraperitoneal.	Indução de bacteremia por <i>K. pneumoniae</i> para, então, mensurar a temperatura corporal, comparando os valores fornecidos por transmissores implantados ( <i>ELAMS<sup>TM</sup></i> ) via subcutânea ou intraperitoneal com os obtidos através de mensuração retal convencional; e, determinar a temperatura limítrofe como alternativa para "morte do animal".	Os resultados demonstraram que os transmissores apresentaram benefício à acurácia dos dados e ao bem-estar animal. Uma vez que a mensuração retal da temperatura corporal demonstrou-se um procedimento laborioso e estressante para os animais, esse procedimento pode ser amenizado pela utilização de sistemas de telemetria.	Institutional Animal Care and Use Committee of the Erasmus University, Rotterdam. The Dutch Animal Experimentation Act, 1977. Guidelines on the Protection of Experimental Animals, Council of the EC, 1986. Holanda.	KORT et al., 1998.
Ratos machos Sprague Dawley (2 grupos, n= 12-43 animais). Não cita duração do experimento.	Relatar a ocorrência de casos de sarcomas peritoneais associados aos implantes de transmissores de telemetria em ratos.	Implante de transmissores radiotelemétricos para análises de eletroencefalograma e eletromiograma e transmissores radiotelemétricos para análise de eletrocardiograma e pressão sanguínea.	Os animais que receberam os implantes foram eutanasiados e passaram por necropsia completa, análise histopatológica e imunohistoquímica.	Os resultados demonstraram incidência próxima de 15% de sarcomas peritoneais associados aos dispositivos de telemetria nos ratos estudados. Logo, isto apresentaria uma complicação significativa para a integridade dos dados e o bem-estar animal.	British Animals (Scientific Procedures) Act 1986. Cooperação internacional: Reino Unido e Austrália.	SHOIEB et al., 2012.

Fonte: Elaboração própria

#### 4.11 Anestesia e Analgesia

Os protocolos anestésicos e analgésicos são fundamentais na experimentação animal para suprimir a dor. Infelizmente, ainda existem resquícios do pensamento filosófico de René Descartes (século XVII), que propôs que a reação dos animais a um estímulo doloroso seria apenas mecânica, por um reflexo de proteção sem consciência da dor. No entanto, graças à teoria da evolução, proposta por Charles Darwin (século XX), o “colocar-se no lugar do animal” levantou uma boa forma de avaliar o sofrimento alheio. Sendo assim, a evidência de que os animais sentem dor se confirma pelo fato que estes evitam ou tentam escapar de um estímulo doloroso (LUNA, 2008).

Neste contexto, dor, sensibilidade e bem-estar animal, estão intrinsecamente ligados. Por certo, não é possível haver bem-estar favorável onde houver dor (ALVES, 2008).

Os cuidados pré-anestésicos com roedores devem incluir uma revisão do histórico sanitário da colônia e aspecto físico do animal. Entre os medicamentos usados na pré-anestesia, estão os benzodiazepínicos (diazepam, midazolam), os tranquilizantes fenotiazínicos como a acepromazina e o alcaloide atropina. A administração parenteral de agentes anestésicos, principalmente por via intraperitoneal e intramuscular, constitui o método mais comum em roedores. O volume da droga, o local da administração e suas propriedades farmacológicas irritantes devem ser considerados, pois a supressão do sofrimento é uma das prioridades da experimentação para não comprometer o bem-estar animal (DAMY et al., 2010).

Atualmente, os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) são amplamente empregados como analgésicos em ratos, pois, além de controlar a dor, também inibem a reação inflamatória pós-operatória e têm ação antipirética. Entre os AINEs, o carprofeno, o cetoprofeno, o ácido acetilsalicílico e o acetaminofenol (paracetamol) são bastante utilizados (DAMY et al., 2010; GÓRSKA, 2000; LILES; FLECKNELL, 1992).

O quadro 13 mostra estudos *in vivo* a respeito de anestésicos e analgésicos aplicados na experimentação animal.

Em relação aos anestésicos, Hayton et al. (1999) relatam o uso de associação medicamentosa dissociativa (quetamina-xilazina), de sedativo

(medetomidina), de anestésico inalatório (isofluorano) e demais associações farmacológicas (fentanil/fluanizona-midazolam). Já Baxter et al. (2008), citam o uso de anestésico exclusivamente endovenoso (propofol) e inalatório (isofluorano). Enquanto isso, Hampshire et al. (2001) apontam o uso de anestésico inalatório (isofluorano) e barbitúrico (pentobarbital sódico). Ademais, Kohler et al. (1999) relatam o uso até mesmo do controverso dióxido de carbono na anestesia de pequenos animais de laboratório.

Já em relação aos analgésicos, Jessen et al. (2007) e Foley et al. (2011) relatam o uso do hipnoanalgésico buprenorfina como sendo um opiáceo comumente administrado a roedores. Para ratos, é empregado usualmente na dose de 0,02 a 0,5 mg/kg por via subcutânea, intraperitoneal ou intramuscular.



**Quadro 13 - Protocolos analgésicos e anestésicos administrados a animais de laboratório.**

Indivíduos	Objetivo	Intervenção	Metodologia	Resultados	CEUA/Guias e país(es) pesquisador(es)	Referência
Ratos machos Wistar (4 tratamentos, n=8 animais). 5 dias de experimento.	Comparar os efeitos de quatro agentes anestésicos sobre os potenciais evocados somatossensitivos em ratos.	(a) Grupo anestesiado com uma combinação de quetamina (90 mg/Kg, I.P.) e xilazina (10 mg/Kg, I.P.); (b) grupo anestesiado com medetomidina (0,3 mg/Kg, I.M.) e atipamezol (1 mg/Kg, I.P. - efeito reversor da anestesia), (c) grupo anestesiado com isoflurano em fluxo contínuo (2 L/min) junto com O <sub>2</sub> em câmara para anestesia inalatória (administrando 5% para indução e 2% para manutenção); (d) grupo anestesiado com uma combinação de fentanil/fluanizona (0,315 mg/mL e 10 mg/mL, I.P.) e midazolam (5 mg/mL, I.P.), além de buprenorfina (0,1 mg/Kg, I.M.) como analgésico.	Durante 20 min de exposição anestésica, forneceram-se estímulos elétricos no nervo tibial do tarso direito. Através de eletrofisiografia, registraram-se os potenciais evocados somatossensitivos (PESS), avaliando a transmissão nervosa dos impulsos nas vias somatossensitivas dos membros (torácicos e pélvicos) ao cérebro.	Os resultados demonstraram que a associação fentanil/fluanizona-midazolam teve menor efeitos sobre o potencial evocado somatossensitivo que os outros anestésicos testados, sendo recomendada como protocolo anestésico de eleição para esse tipo de estudos em ratos.	Home Office Animal Procedures Committee (HOAPC) Reino Unido.	HAYTON et al., 1999.
Ratos machos Fischer-344 (4 grupos, n=6-8 animais). 21 dias de experimento.	Investigar efeitos comportamentais (pós-operatórios) e histopatológicos provocados por dois diferentes protocolos anestésicos administrados em ratos com lesões neurotóxicas no hipocampo dorsal.	(a) Grupo de animais lesionados anestesiados com propofol (0,6-0,9 mg/Kg/min), (b) Grupo de animais sem lesão anestesiados com propofol (0,6-0,9 mg/Kg/min), (c) Grupo de animais lesionados anestesiados com isoflurano (contínuo), (d) grupo de animais sem lesão anestesiados com isoflurano (contínuo).	Através de cirurgia estereotáxica, sob os dois diferentes protocolos anestésicos (intravenoso e inalatório), os animais sofreram lesões neurotóxicas geradas com de múltiplas aplicações de uma excitocina no SNC. Procederam-se, observações de comportamento durante o período pós-operatório em labirinto radial de 12 braços e análise histopatológica de cortes do SNC.	Os resultados demonstraram que embora os parâmetros fisiológicos intra-operatórios tenham sido similares nos grupos cirúrgicos, o perfil do comportamento pós-operatório em tarefas de aprendizagem espacial diferiram entre os grupos estudados.	Harvard Medical Area Standing Committee on Animals. Estados Unidos.	BAXTER et al., 2008.

<p>Ratos machos Sprague-Dewey (3 grupos, n= 6-8 animas). 7 dias de experimento</p>	<p>Comparação retrospectiva da recuperação de peso de ratos em neurocirurgia usando anestésias inalatória e injetável, suplementação nutricional e de fluido.</p>	<p>Grupo tratado sob indução com isoflurano e manutenção com fluidoterapia e analgésicos, grupo tratado sob anestesia com pentobarbital sódico (55 mg/Kg I.P.) seguido por fluidoterapia e analgésicos, grupo tratado sob anestesia com pentobarbital sódico (55 mg/Kg I.P.) mas sem fluidoterapia ou analgésicos até a manhã seguinte de observação.</p>	<p>Os animais receberam fatias de laranja como maneira de enriquecimento nutricional. Através de cirurgia estereotáxica, produziu-se lesão unilateral na substância negra do SNC dos animais pela aplicação de 6-hidroxidopamina. Procederam-se observações de comportamento como atitude, modo de andar, apetite, além de, avaliação de peso corpóreo e de coloração por porfíria.</p>	<p>Os resultados demonstraram que retorno anestésico mais rápido obtido pela administração de anestesia inalatória ao invés de barbitúricos nesse tipo de modelo experimental. Além disso, a homeostase foi alcançada mais rapidamente instituindo fluidos e analgésicos logo após o término dos procedimentos cirúrgicos.</p>	<p>Institutional Animal Care and Use Committee (IUACUC). Estados Unidos.</p>	<p>HAMPSHIRE et al., 2001.</p>
<p>Ratos machos e fêmeas TIF-RAI, camundongos machos e fêmeas TIF-MAG e porquinhos da Índia machos e fêmeas TIF-DHP (6 grupos, n= 14-71 animais). Não cita tempo de experimento.</p>	<p>Determinar se o CO<sub>2</sub> é um útil para anestesia rápida em animais de laboratório, investigando o quanto as concentrações de 80% CO<sub>2</sub>/20% O<sub>2</sub> em ratos, camundongos e porquinhos da Índia e 80% CO<sub>2</sub>/ar ambiental em ratos, pode induzir anestesia a curto-prazo e avaliar quais desses métodos vai de encontro aos requerimentos de bem-estar animal.</p>	<p>(a) Ratos expostos a concentração de 80% CO<sub>2</sub>/20% O<sub>2</sub> por 60 s, (b) ratos expostos a concentração de 80% CO<sub>2</sub>/20% O<sub>2</sub> por 120 s, (c) ratos expostos a concentração de 80% CO<sub>2</sub>/ar ambiental por 60 s, (d) ratos expostos a concentração de 80% CO<sub>2</sub>/ar ambiental por 120 s, (e) camundongos expostos a concentração de 80% CO<sub>2</sub>/20% O<sub>2</sub> por 120 s, (f) porquinhos da Índia expostos a concentração de 80% CO<sub>2</sub>/20% O<sub>2</sub> por 30 s.</p>	<p>Foram gravados e observados os seguintes comportamentos: primeiros sintomas dentro da câmara de anestesia, tempo de indução anestésica, tempo de exposição pré-determinado (30, 60 e 120 s), duração da tolerância cirúrgica, tempo de recuperação pós-cirúrgica.</p>	<p>Os resultados demonstraram que protocolos de anestesia geral utilizando dióxido de carbono parece ser adequados para procedimentos cirúrgicos rápidos e dolorosos, principalmente em ratos bem como em porquinhos da Índia.</p>	<p>Swiss 3R Research Foundation. Suíça.</p>	<p>KOHLER et al., 1999.</p>

<p>Ratos machos Wistar (4 experimentos: I) Determinação da eficácia antinociceptiva da buprenorfina via água de ingestão (2 grupos, n= 5 animais, 3 dias de experimento); II) Determinação do efeito antinociceptivo da buprenorfina S.C. (2 grupos, n= 5-6 animais, 1 dia de experimento, 465 min de experimento); III) Determinação do efeito antinociceptivo da buprenorfina em doses repetidas S.C. (2 grupos, n= 5 animais, 4 dias de experimento); IV) Determinação da eficácia antinociceptiva de uma combinação de buprenorfina S.C. e V.O. (2 grupos, n= 6 animais, 2 dias de experimento).</p>	<p>Investigar o efeito antinociceptivo da buprenorfina administrada <i>ad libitum</i> via água de ingestão em ratos.</p>	<p>I) Grupo tratado com buprenorfina (0,056 mg/mL V.O.) <i>ad libitum</i> em bebedouro com água deionizada e grupo controle somente com água deionizada.  II) Grupo tratado com injeção de buprenorfina (0,1 mg/Kg S.C.) e grupo controle tratado com injeção de volume similar de solução salina S.C.  III) Grupo tratado com 10 injeções de buprenorfina (0,1 mg/Kg S.C.) administradas com 8h de intervalo e grupo controle tratado com 10 injeções de volume similar de solução salina S.C.  IV) Grupo tratado com injeção de buprenorfina (0,1 mg/Kg S.C.) seguido por buprenorfina (0,056 mg/mL V.O.) <i>ad libitum</i> em bebedouro com água deionizada e grupo controle tratado com injeção de volume similar de solução salina seguido por água deionizada em bebedouro.</p>	<p>Avaliaram-se a nocicepção dos animais através da mensuração do tempo de latência de retirada da pata (por um aparato com foco nocivo de luz radiante) e as quantidades de água derramada e ingerida do bebedouro.</p>	<p>Os resultados demonstraram que uma única injeção S.C. de buprenorfina seguida da ingestão de buprenorfina na água potável pode ser uma opção viável para o alívio da dor em ratos de laboratório.</p>	<p>Danish Committee for Experiments on Animal. Dinamarca.</p>	<p>JESSEN et al., 2007.</p>
--	--	---	--	--	---	-----------------------------

<p>Ratos machos Sprague-Dawley (3 experimentos: I) Sensitividade a estímulo térmico, 2 grupos, n= 6 animais, 3 dias de experimento; II) Resposta a dor causada por defeito tibial, 4 grupos, n= 10 animais, 8 dias de experimento; III) Avaliação de concentrações plasmáticas de buprenorfina, 3 grupos, n= 3 animais, 3 dias de experimento).</p>	<p>Avaliar uma formulação de liberação prolongada de buprenorfina S.C. para analgesia em ratos.</p>	<p>I) Grupo tratado com formulação de cloridrato de buprenorfina de liberação prolongada (1,2 mg/Kg), grupo tratado com formulação comum de cloridrato de buprenorfina (0,2 mg/Kg).  II) Grupo tratado com formulação de cloridrato de buprenorfina de liberação prolongada (1,2 mg/Kg), grupo tratado com formulação comum de cloridrato de buprenorfina (0,2 mg/Kg), grupo tratado com anestesia e formulação de cloridrato de buprenorfina de liberação prolongada (1,2 mg/Kg), grupo tratado com anestesia e solução controle (veículo 0,2 mL).  III) Grupo tratado com formulação de cloridrato de buprenorfina de liberação prolongada (0,9 mg/Kg), grupo tratado com formulação de cloridrato de buprenorfina de liberação prolongada (1,2 mg/Kg), grupo tratado com formulação comum de cloridrato de buprenorfina (0,1 mg/Kg).</p>	<p>Procedeu-se a elaboração de um etograma a partir de observações de comportamento como atividade geral, apoio da pata afetada (dor local), número de posicionamentos em vertical num período de 2 min (apoando apenas membros pélvicos), consumo de água e alimento e mensuração de peso corporal, além das mensurações plasmáticas de buprenorfina.</p>	<p>Os resultados indicaram que a formulação de buprenorfina estudada (liberação prolongada) pode ser uma opção viável para o tratamento pós-cirúrgico da dor em ratos de laboratório.</p>	<p>The University of Virginia Animal Care and Use Committee.  Association for Assessment and Accreditation of laboratory Animal Care International (AAALAC).  Estados Unidos.</p>	<p>FOLEY et al., 2011.</p>
---	---	---	--	---	---	----------------------------

Fonte: Elaboração própria.

#### 4.12 Eutanásia

Eutanásia (do grego *eu* – bom, e *thanatos* – morte) constitui o modo humanitário de matar um animal com mínimo desconforto. Em 2013, o CONCEA, órgão do MCTI, divulgou diretrizes brasileiras que se referem exclusivamente aos procedimentos de eutanásia realizados com fins científicos ou didáticos sob o propósito de estabelecer procedimentos que provoquem o mínimo de dor e de sofrimento aos animais de laboratório. Sendo a eutanásia um procedimento que envolve considerações científicas e filosóficas, o método adotado para tal deve, prioritariamente, garantir a inconsciência antes da possibilidade de qualquer sofrimento físico ou mental. Inclusive, determina-se que os animais devem ser mortos em ambiente silencioso, limpo e afastado de outros animais. Também se orienta que ocorra sempre sob supervisão do responsável técnico pelo biotério (o qual deve ter o título de Médico Veterinário com registro ativo no CRMV da Unidade Federativa em que o estabelecimento esteja localizado) (DIRETRIZES..., 2013).

Por isso, no mesmo ano, o CFMV publicou o Guia Brasileiro de Boas Práticas para a Eutanásia que contempla condutas profissionais frente aos métodos químicos e físicos (mecânicos) para morte animal. Sugere-se uma exaustiva discussão a respeito dos princípios básicos de bem-estar norteadores dos métodos de eutanásia, pois são eles que orientarão a abordagem do subtema sob todos os aspectos técnicos e desafios éticos. Assim, no caso da experimentação animal, o método para eutanásia necessita ser aprovado institucionalmente pela CEUA (GUIA..., 2013).

Desse modo, os princípios de bem-estar animal, relevantes para a eutanásia, têm como objetivo a garantia de:

- a) Elevado grau de respeito aos animais;
- b) Ausência ou redução máxima de desconforto e dor;
- c) Inconsciência imediata seguida de morte;
- d) Ausência ou redução máxima do medo e da ansiedade;
- e) Segurança e irreversibilidade;
- f) Ser apropriado para a espécie, idade e estado fisiológico do animal ou animais em questão;
- g) Ausência ou mínimo impacto ambiental;
- h) Ausência ou redução máxima de riscos aos presentes durante o ato;
- i) Treinamento e habilitação dos responsáveis por executar o procedimento de eutanásia para agir de forma humanitária, sabendo reconhecer o sofrimento, grau de consciência e morte do animal;
- j) Ausência ou redução máxima de impactos emocional e psicológico negativos em operadores e observadores (GUIA..., 2013, p. 16-17).

Verifica-se que o agente eutanasiante inalatório mais utilizado em roedores é o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), sendo aceitável (jamais recomendável) apenas quando outros métodos não puderem ser utilizados na experimentação. A concentração desse gás a fim de induzir eutanásia varia sobremaneira na literatura científica. Frequentemente, é empregado em câmaras na concentração de 30% a 40% para a eutanásia da maioria dos animais de laboratório. E, apesar de apresentar efeito analgésico e anestésico geral quando em altas concentrações, acredita-se que não deva ser considerado um método humanitário, uma vez que existem diversos relatos sobre sua aversão pelos ratos (CONLEE et al., 2005; KIRKDEN et al., 2005; LEACH et al., 2005; WOOD, 2005).

Enfatizando o estudo da eutanásia sobre a toxicologia da reprodução e do desenvolvimento, infere-se que tal procedimento em embriões, fetos e neonatos de roedores também mereça devida atenção.

Para embriões e fetos, destaca-se que:

O reconhecimento da maturidade do sistema nervoso (SN) é o balizador para a escolha do método adequado de eutanásia a ser empregado quando o trabalho envolva embriões e fetos de animais. Os conceitos que se encontram na fase de desenvolvimento do seu SN, na qual sejam capazes de processar estímulos dolorosos, necessitam de tratamento ético e técnico-científico adequado para minimizar tais estímulos.

Em fetos de camundongo, rato e hamster até o 14º dia de gestação - nos quais a percepção da dor é improvável devido ao mínimo desenvolvimento neuronal neste estágio - a eutanásia da mãe ou a remoção do feto assegura morte rápida do mesmo, por meio da perda do suprimento sanguíneo. (...) A partir desta fase (15º dia de gestação) (...) até o nascimento, o nível de desenvolvimento da inervação possibilita a percepção da dor. Neste caso, recomenda-se a decapitação, sendo necessária habilidade e experiência do operador para realizar tal procedimento. Outro método que pode ser empregado com animais nesta idade é a anestesia por hipotermia, seguido pela decapitação (GUIA..., 2013, p. 47-48).

Em relação à escolha do método para eutanásia materna, infere-se que, sempre que possível, deve-se assegurar anóxia cerebral rápida para os fetos, com o mínimo distúrbio no meio uterino, sugerindo, assim, o uso de dióxido de carbono seguido de outro método, como decapitação ou pneumotórax bilateral (GUIA..., 2013). De forma geral, ao confirmar a morte da gestante, os fetos também vão apresentar óbito na sequência; entretanto, por serem mais resistentes à hipóxia podem apresentar um tempo maior de sobrevivência, não sendo aconselhável

exteriorizar os fetos e induzir a morte de forma individual, pois o início da respiração pode desencadear a consciência (DIRETRIZES..., 2013).

Para os neonatos de roedores com idade entre 1 a 6 dias, recomenda-se os seguintes métodos para realização da eutanásia:

(...) decapitação com lâminas afiadas; anestesia por hipotermia (o animal deverá ficar submerso em câmara fria por 20 minutos) seguida de decapitação; uso de CO<sub>2</sub> seguido de decapitação com lâminas afiadas; anestésico inalatório (por exemplo, isoflurano), ao qual os animais devem permanecer expostos por, no mínimo, 10 minutos após a cessação dos movimentos (GUIA..., 2013, p. 48).

Ainda, para roedores, entre 7 a 14 dias de idade:

(...) pode ser usado o CO<sub>2</sub> ou, preferencialmente, anestésico inalatório isoladamente ou seguido de decapitação com lâminas afiadas. O animal deve permanecer na câmara de gases pelo menos 2 a 10 minutos após a cessação dos movimentos (GUIA..., 2013, p. 49).

E, para os roedores neonatos com 15 dias até a idade adulta, preconiza-se:

(...) o uso de anestésico inalatório isoladamente, sendo que o animal deverá permanecer na câmara por pelo menos mais 2 minutos após a cessação dos movimentos. Após ser retirado da câmara, o animal deverá ser observado por pelo menos mais 1 minuto antes do descarte, para assegurar a morte (GUIA..., 2013, p. 49).

O quadro 14 mostra estudos *in vivo* que abordam a celeuma a respeito do uso do dióxido de carbono nos protocolos de eutanásia em âmbito da experimentação animal.

Smith e Harrap (1997) consideram como um método “satisfatório” a eutanásia de ratos através de indução gradual com CO<sub>2</sub>; porém, dão preferência ao método de “mergulho” em câmara preenchida com o gás (numa rápida exposição a uma alta concentração do agente) devido à perda de consciência mais rápida e à morte imediata. Do mesmo modo, Hackbarth et al. (2000) apoiam o uso do CO<sub>2</sub> visto que não relatam, nesse estudo, estresse comportamental ou alterações hormonais.

Por outro lado, Leach et al. (2002) apontam que a eutanásia com a inalação de CO<sub>2</sub> (tanto sozinho como combinado ao argônio) mostra-se aversiva em roedores. Tal repulsa ocorre pela perda de consciência não ser imediata, visto que agentes inalatórios demoram algum tempo para atingir uma concentração alveolar

efetiva, e pela formação de ácido carbônico, que provoca previamente lesão no trato respiratório.

Para contornar tais efeitos adversos, Wong et al. (2012) propõem a sedação prévia com isoflurano antes do CO<sub>2</sub> como um refinamento sobre este método de eutanásia. Porém, advertem que o benefício seria somente para ratos que não tenham sido anteriormente expostos ao anestésico inalatório; para ratos já expostos ao isoflurano, uma re-exposição pode ser tão aversiva quanto à exposição inicial ao CO<sub>2</sub>.

Também, Coenen et al. (1995) verificam que os efeitos negativos da eutanásia com CO<sub>2</sub>, como agitação e asfixia, podem ser minimizados através da suplementação adicional com O<sub>2</sub> dentro da câmara.



**Quadro 14 - Protocolos para eutanásia de animais de laboratório.**

Indivíduos	Objetivo	Intervenção	Metodologia	Resultados	CEUA/Guias e país(es) pesquisador(es)	Referência
<p>Ratos machos Sprague-Dawley (2 grupos, n= 5 animais).</p>	<p>Comparar o método de eutanásia com indução gradual de dióxido de carbono <i>versus</i> em câmara pré-carregada de dióxido de carbono, avaliando as respostas comportamentais e cardiovasculares de ratos.</p>	<p>Grupo eutanasiado por indução lenta (gradual, 10 l/min) de CO<sub>2</sub> e grupo eutanasiado por indução rápida (câmara pré-carregada) de CO<sub>2</sub>.</p>	<p>Procederam-se as mensurações dos níveis de gases O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> dentro da câmara de eutanásia. Através de transmissores de telemetria implantados na artéria carótida esquerda dos animais, mensuraram-se o pulso e a pressão arterial. Ademais, alguns indicadores de comportamento (estresse, dor, angústia, ansiedade e medo) foram analisados através de observações de levantamento de cabeça, vocalização, fuga, chicoteamento da cauda, marcha, andar em círculos, espasmos, decúbito, micção, defecação, respiração e tempo de morte.</p>	<p>Os resultados demonstraram quedas mais abruptas no pulso e na pressão arterial em ratos eutanasiados na câmara pré-carregada com CO<sub>2</sub>. Não houve evidência comportamental de dor ou angústia em ambos os grupos. Ataxia inicial e dispneia foram marcantes antes da morte, separando assim a eutanásia em três fases bem definidas. Todos os sinais visuais de morte precederam de colapso vascular completo por cerca de 1 minuto em ambos os grupos, por isso recomenda-se que o fluxo de gás seja mantido por pelo menos 1 minuto após a morte aparente.</p>	<p>Animal Experimentation Ethics Committee. National Health and Medical Research Council (NHMRC) /Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO)/Australian Agricultural Company (AAC) Code of Practice for the Care and Use of Animals for Experimental Purposes, 1985. Austrália.</p>	<p>SMITH e HARRAP, 1997.</p>

<p>Ratos machos Fischer-344 (12 grupos, n= 4 animais).</p>	<p>Investigar o sofrimento de ratos durante a eutanásia com dióxido de carbono e seus aspectos sobre o bem-estar animal.</p>	<p>(a) Grupos sedados com acepromazina V.O. (administrada em carne picada): decapitados aos (a<sub>1</sub>) 30 s, (a<sub>2</sub>) 75 s, (a<sub>3</sub>) 120 s. (b) Grupos controles sem acepromazina: decapitados aos (b<sub>1</sub>) 30 s, (b<sub>2</sub>) 75 s, (b<sub>3</sub>) 120 s. (c) Grupos sedados com pentobarbital (60 mg/Kg I.P.): decapitados aos (c<sub>1</sub>) 30 s, (c<sub>2</sub>) 75 s, (c<sub>3</sub>) 120 s. (d) Grupos controles sem injeção de pentobarbital: decapitados aos (d<sub>1</sub>) 30 s, (d<sub>2</sub>) 75 s, (d<sub>3</sub>) 120 s.</p>	<p>Os animais foram eutanasiados em câmaras com fluxo de 6 l/min. Assim, a concentração de CO<sub>2</sub> dentro da câmara foi de 18,2% após 30 s, 39,5% após 75 s, e 55,5% após 120 s. Procedeu-se a gravações em vídeo das alterações comportamentais durante o processo de eutanásia, avaliação de estresse através de mensurações de glicose sanguínea, e de ACTH e corticosterona por radioimunoensaio.</p>	<p>Os resultados demonstraram que não houve diferença entre os grupos, presumindo-se que o método descrito para eutanásia está em concordância com o bem-estar animal, pois leva à morte rápida, sem dor e sem sofrimento intenso.</p>	<p>Não cita. Alemanha.</p>	<p>HACKBARTH et al., 2000.</p>
<p>Camundongos fêmeas BALB/c e ratos fêmeas Wistar (12 grupos, n= 10 animais).</p>	<p>Avaliar a percepção inicial de ratos e camundongos para os seguintes agentes de eutanásia: dióxido de carbono, argônio e duas misturas de dióxido de carbono-argônio em 3 concentrações (baixa, média e alta), medindo o grau de aversão dos animais.</p>	<p>(a) Grupos eutanasiados com CO<sub>2</sub>: (a<sub>1</sub>) em baixa concentração de gás, (a<sub>2</sub>) em média concentração de gás, (a<sub>3</sub>) em alta concentração de gás. (b) Grupos eutanasiados com Ar: (b<sub>1</sub>) em baixa concentração de gás, (b<sub>2</sub>) em média concentração de gás, (b<sub>3</sub>) em alta concentração de gás. (c) Grupos eutanasiados com mistura CO<sub>2</sub>-Ar: (c<sub>1</sub>) em baixa concentração de gás, (c<sub>2</sub>) em média concentração de gás, (c<sub>3</sub>) em alta concentração de gás. (d) Grupos eutanasiados com mistura CO<sub>2</sub>-Ar: (d<sub>1</sub>) em baixa concentração de gás, (d<sub>2</sub>) em média concentração de gás, (d<sub>3</sub>) em alta concentração de gás.</p>	<p>Os animais foram testados em dois modelos de câmara para eutanásia: acoplada a uma câmara de ar e acoplada a quatro câmaras de ar. Procedeu-se a análise de quatro respostas: tempo inicial de saída da câmara de eutanásia, tempo total de permanência, tempo de reentrada, frequências de entradas e saídas da câmara. A aversão relacionada ao comportamento foi descrita através da análise de auto-limpezas, levantamentos, aspirações ou fungadas e excreção.</p>	<p>Os resultados demonstraram que o CO<sub>2</sub> e as misturas CO<sub>2</sub>-Ar causaram maior aversão que o Ar isolado.</p>	<p>Code of Practice for the Housing and Care of Animals used in Scientific Procedures. Secretary of State for the Home Office (1986) Animals (Scientific) Procedures Act. Reino Unido.</p>	<p>LEACH et al., 2002.</p>

<p>Ratos machos Sprague-Dawley (3 experimentos: I) Validação do processo de avaliação das respostas a intensidade da luz e do agente, 6 grupos, n= 6 animais; II) Análise das respostas à exposição inicial ao isofluorano e ao CO<sub>2</sub>, 4 grupos, n= 8 animais; III) Análise das respostas a exposições repetidas ao isofluorano e ao CO<sub>2</sub>, 4 tratamentos, n= 4 animais).</p>	<p>Investigar a aversão dos ratos ao isofluorano versus o dióxido de carbono.</p>	<p>I) (a) Grupos expostos ao isofluorano por (a<sub>1</sub>) 300 lx, (a<sub>2</sub>) 800 e (a<sub>3</sub>) 1600 lx; (b) Grupos expostos ao O<sub>2</sub> por (b<sub>1</sub>) 300 lx, (b<sub>2</sub>) 800 lx ou (b<sub>3</sub>) 1600 lx.  II) (a) Grupos expostos inicialmente ao isofluorano por (a<sub>1</sub>) 300 lx ou (a<sub>2</sub>) 1600 lx; (b) Grupos expostos inicialmente ao CO<sub>2</sub> por (b<sub>1</sub>) 300 lx ou (b<sub>2</sub>) 1600 lx.  III) (a) Grupos expostos repetidamente ao isofluorano por (a<sub>1</sub>) 300 lx ou (a<sub>2</sub>) 1600 lx; (b) Grupos expostos repetidamente ao CO<sub>2</sub> por (b<sub>1</sub>) 300 lx ou (b<sub>2</sub>) 1600 lx.</p>	<p>Procederam-se os testes em câmara iluminada-escura, onde os animais tinham a escolha entre permanecer no compartimento escuro, preenchimento com isofluorano ou CO<sub>2</sub>, ou escapar para o compartimento iluminado.</p>	<p>Os resultados indicaram que a exposição inicial ao CO<sub>2</sub> causa maior aversão que ao isofluorano, sendo que a re-exposição ao isofluorano é mais repugnante do que a exposição inicial.</p>	<p>The University of British Columbia Animal Care Committee. Canadá.</p>	<p>WONG et al., 2012.</p>
<p>Ratos machos Wistar (4 tratamentos, n= 7 animais).</p>	<p>Registrar os efeitos do dióxido de carbono, quando utilizado para eutanásia, sobre o comportamento, a atividade elétrica cerebral e a frequência cardíaca em ratos.</p>	<p>(a) Grupo eutanasiado em caixa completamente preenchida por CO<sub>2</sub>, (b) grupo eutanasiado em caixa com fluxo elevado de CO<sub>2</sub> (22,5 l/min), (c) grupo eutanasiado em caixa com fluxo baixo de CO<sub>2</sub> (2,5 l/min), (d) grupo eutanasiado em caixa com fluxo rápido de mistura de CO<sub>2</sub> + O<sub>2</sub> (22,5 l/min + 11,25 l/min).</p>	<p>Procedeu-se gravações dos registos elétricos das análises de EEG, ECG e frequência cardíaca e além de gravações em vídeo das alterações comportamentais durante o processo de eutanásia.</p>	<p>Os resultados demonstram que os sinais de agitação e asfixia foram quase completamente ausentes na condição CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub>.</p>	<p>Não cita. Holanda.</p>	<p>COENEN et al., 1995.</p>

Fonte: Elaboração própria.

#### 4.13 Demais aplicações dos “3Rs”

Na área educacional, observa-se que a experimentação animal está cada vez mais limitada em muitos currículos. Isto, certamente, é motivado por vários fatores como o desenvolvimento de alternativas pedagógicas que se revelam vantajosas, o alto custo para manutenção das instalações, a mobilização de alguns estudantes antiviviseccionistas, além de legislações restritivas que se pronunciam especificamente a respeito do uso de animais com finalidades de ensino (PAIXÃO; SCHRAMM, 2008). Especialmente na disciplina de técnicas cirúrgicas, o educador visa ampliar as oportunidades de formação dos estudantes e, ao mesmo tempo, limitar o número de animais, visando atender a preocupações éticas e financeiras da instituição (DUMONT et al., 2011). Diante disso, no ambiente acadêmico, tem-se revelado de grande valia os chamados “laboratórios secos” que usam “ratos virtuais” para superar os obstáculos inerentes à experimentação animal, tais como orçamentos inadequados e questões referentes aos direitos dos animais (ODENWELLER et al., 1997).

No campo da estatística, tentativas de reduções no uso de animais se fazem presentes a todo instante. São procedentes questionamentos se a significância estatística é mesmo útil na interpretação dos resultados (SAVITZ, 1993) e a elaboração de guia para tratar, especificamente, do projeto e da análise estatística dos experimentos *in vivo* (FESTING; ALTMAN, 2002). Também se enquadra como método alternativo a estatística computacional para a eleição de uma sequência de doses, como no procedimento *up-and-down*, visando uma redução no número de animais usados para testes de toxicidade aguda oral (RISPIN et al., 2002). Relata-se que, recentemente, através da RN nº 18, o CONCEA reconheceu o *up-and-down* como alternativa devidamente validada por entidades como o *Brazilian Center for Validation of Alternative Methods (BRACVAM)* e por estudos colaborativos internacionais publicados em compêndios oficiais (BRASIL, 2014).

A imaginologia também pode ser aplicada à experimentação com o objetivo de reduzir o número de animais. As técnicas de diagnóstico por imagem, como a ressonância magnética e a tomografia computadorizada, além de serem não invasivas, são capazes de aperfeiçoar os resultados, diminuindo a quantidade de

animais necessários à obtenção de significância estatística na pesquisa (CHATHAM; BLACKBAND, 2001; HEINDL et al., 2008).

Em todo caso, o estabelecimento dos *humane endpoints* deve ser considerado na experimentação animal sempre que se envolva dor e sofrimento severos. Podendo ser traduzidos como pontos de limite da atuação do homem, constituem-se no mais precoce indicador de potencial algia ou angústia nos animais utilizados em pesquisas. Não se baseando necessariamente em sinais clínicos, podem ser analisados a partir de sinais pré-clínicos ou de biomarcadores fisiológicos e moleculares preditivos de dor e desconforto, como alterações de níveis hormonais, parâmetros bioquímicos, titulações de anticorpos, etc. Dentro do contexto do bem-estar animal e dos objetivos científicos a serem cumpridos, podem ser inferidos como ações para limitar a agonia, através do tratamento com anestésicos, analgésicos e através do “sacrifício humanitário” ao encerramento da prática *in vivo*. A aplicação desses critérios deve ser categórica aos refinamentos da investigação biomédica, como nos estudos de doenças infecciosas (OLFERT; GODSON, 2000), na pesquisa sobre choque e inflamação (NEMZEK et al., 2004), na neurociência (OLSSON et al., 2008), no estudo da dor (MORTON, 2000), na oncologia (WORKMAN et al., 1988) e nos testes de toxicidade aguda (SASS, 2000).

Particularmente na toxicologia da reprodução e do desenvolvimento, a partir do reconhecimento do impacto do estresse materno sobre a gestação (GOLUB et al., 2004; MEZZACAPPA, 2004), enfatiza-se a importância da adoção das estratégias de refinamento à experimentação (AUGUSTINE-RAUCH, 2007; BARROW, 2009; BEYER et al., 2010; BRANNEN et al., 2011; KNUDSEN et al., 2011).

O quadro 15 mostra estudos *in vivo* que abordam demais aplicações dos “3Rs”.

Fornari et al. (2012) consideram a cirurgia estereotáxica como um refinamento pois é uma forma minimamente invasiva de intervenção operatória. É através de um sistema tridimensional de coordenadas que se podem localizar minúsculos alvos no interior do organismo, executando-se nestes pontos alguma atividade ou lesão experimental. Os autores demonstram, através de um vídeo, a otimização da técnica cirúrgica em ratos, o que sensibiliza o público sobre as questões de bem-estar animal e legislação protecionista rigorosa.

Num estudo brasileiro, Kinshoku et al. (2012) abordam o uso racional de modelos animais para pesquisa e ensino de microcirurgia. Ao utilizar cadáveres de ratos da raça Wistar, oriundo de descarte de outros cursos, os estudantes podem adquirir habilidades com tecido orgânico antes de operar animais vivos, corroborando com a mitigação do desperdício de corpos.

Para refinar a avaliação do estresse, através da mensuração da atividade adrenocortical, Lepschy et al. (2007) propõem um método não invasivo através de amostragens de fezes e urina, que exime os animais do sofrimento de repetidas coletas de sangue (as quais interfeririam nas funções endócrinas). Assim, abrem-se novas perspectivas para as pesquisas biomédica e farmacológica, bem como para as questões relacionadas ao bem-estar animal.

A fim de reduzir o número de animais necessários para determinar os valores de  $DL_{50}$ , sem comprometer a confiabilidade dos resultados, Lichtman (1998) expõe a metodologia *up-and-down*, já revisada anteriormente, qual utiliza a teoria dos passeios aleatórios nos estudos de toxicidade aguda. Através desse método, considerando que uma dose inicial seja aplicada num primeiro roedor, define-se que se o animal responder positivamente, para o próximo roedor a dose será diminuída, e, se a resposta for negativa, a próxima dose será aumentada.

Apesar do rato, geralmente das linhagens Wistar e Sprague-Dawley, ser o animal de escolha nos protocolos de avaliação da teratogenicidade, as agências normativas requerem a utilização também de uma espécie não roedora. Por isso, Spence (2003) relata o emprego de lagomorfos, como os coelhos das raças Holandês e Nova Zelândia, na toxicologia da reprodução e do desenvolvimento.

Ainda nessa área, Stub et al. (2002) correlacionam medidas externas da superfície da pele dos animais com a medição interna direta do esqueleto. Enquanto isso, Redfern et al. (2007) relatam que, ao adotar técnicas mais refinadas para a coloração histológica dos fetos, pode-se utilizar um menor número de gestantes para produzir resultados, já que estes se tornam mais fidedignos.

**Quadro 15 - Demais aplicações dos “3Rs” à experimentação animal.**

Indivíduos	Objetivo	Intervenção	Metodologia	Resultados	CEUA/ Guias e país(es) pesquisador(es)	Referência
<p>Ratos (não cita gênero nem linhagem), (2 grupos, n= 400-480 animais). Não citam tempo de experimento.</p>	<p>Analisar um protocolo de cirurgia esteotóxica em roedores e sua contribuição ao bem-estar animal no melhoramento dos resultados da neurociência comportamental; elaborar um vídeo representando tais modificações.</p>	<p>Grupo operado com protocolo cirúrgico padrão e grupo operado com protocolo cirúrgico modificado (com suplementação de O<sub>2</sub>, monitoramento contínuo dos níveis de oxigenação arterial e frequência cardíaca durante a cirurgia, e implantação de cuidados pós-cirúrgicos).</p>	<p>Os animais passaram por cirurgia estereotóxica para implantação de cânulas em regiões específicas do cérebro a fim de investigar os efeitos de neurotransmissores e vias de sinalizações manipuladas localmente sobre o comportamento dos animais. Elaborou-se um vídeo representativo para demonstrar as melhorias processuais recentes ao refinamento de cirurgias esterotáxicas.</p>	<p>Os resultados demonstraram que o protocolo modificado aumentou a taxa de sobrevivência e reduziu a perda de peso no período pós-operatório.</p>	<p>European Union Directive on the use of laboratory animals, 2010. Holanda.</p>	<p>FORNARI et al., 2012.</p>
<p>Ratos (não cita gênero) Wistar - cadáveres, oriundo de descarte de outros cursos .</p>	<p>Divulgar um modelo experimental de baixo custo, que respeita as normas regulamentadoras das experiências com animais, utilizando animais mortos em outros experimentos e contribuindo com a melhora do aprendizado de microcirurgia.</p>	<p>São utilizados cadáveres oriundos de descarte de outros cursos.</p>	<p>Os cadáveres dos ratos descongelados são utilizados para o treinamento básico de microcirurgia dos acadêmicos do curso de medicina da Universidade Nove de Julho, visando contribuir para o treinamento de acadêmicos, sua utilização se justifica pelo baixo custo do material empregado e muitos animais são poupados durante a fase intermediária do desenvolvimento de habilidades para realização das micro-anastomoses. Assim, os alunos, supervisionados por monitores treinados, adquirem habilidades com tecido orgânico antes de operar animais vivos.</p>	<p>Os resultados demonstraram que modelo experimental apresentados neste trabalho é de baixo custo e permite a utilização racional de animais, corroborando com as normas éticas da pesquisa experimental e contribuindo com o ensino e treinamento da microcirurgia.</p>	<p>Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho. Brasil.</p>	<p>KINSHOKU et al., 2012.</p>

<p>Ratos machos e fêmeas Fischer-344 e Sprague-Dewley (2 experimentos: I) Obtenção de informações sobre o metabolismo da corticosterona e sua excreção fecal, 2 grupos, n= 6-12 animais; II) Validação de ensaio imunoenzimático para mensuração de metabólitos fecais de corticostreona, 2 grupos, n= 6 animais). 5 dias de experimento.</p>	<p>Validar método não invasivo de mensuração da atividade adrenocortical em ratos machos e fêmeas.</p>	<p>I) Estudo de radiometabolismo: grupos que receberam 2.3 MBq de <sup>3</sup>H-corticosterona por via I.V. e V.O, ambos para posterior coleta de fezes. II) A fim de investigar a variação diurna de glicocorticoides, bem como os efeitos do próprio procedimento de injeção I.V.: grupo submetido ao teste de estimulação do hormônio adrenocorticotrófico e grupo submetido ao teste de supressão com dexametasona.</p>	<p>Procedeu-se a coleta de amostras de urina e fezes nas gaiolas metabólicas e, para caracterizar os metabólitos de corticosterona excretados (portando radioatividade), as fezes foram submetidas à HPLC e suas frações analisadas por diferentes imunoenaios para estudar o ritmo circadiano.</p>	<p>Os resultados demonstraram que a estimulação farmacológica, a supressão e a variação diurna da atividade adrenocortical se refletiram com precisão por meio da mensuração dos metabólitos de corticosterona nas fezes. Através dessa validação fisiológica, provou-se a adequação de um imunoensaio para monitoração não invasiva da atividade adrenocortical em ratos de ambos os sexos.</p>	<p>Permissão para a realização de experimentação animal obtida do Provincial Government of Lower Austria. Cooperação internacional: Áustria e Alemanha.</p>	<p>LEPSCHY et al., 2007.</p>
<p>Ratos machos Sprague-Dewley e camundongos machos ICR (2 grupos, n= 88-311 animais).</p>	<p>Avaliar se o método <i>up-and-down</i> pode ser aplicado para reduzir o número de animais necessários para obter os valores de DE<sub>50</sub> de diferentes agentes antinociceptivos.</p>	<p>Grupo submetido ao tradicional estudo de dose-resposta usando regressão linear pelo método dos quadrados mínimos e grupo submetido ao método de ajustamento de doses <i>up-and-down</i>.</p>	<p>Através de cirurgia estereotáxica, injetou-se um corante azul no ventrículo lateral direito do cérebro, para posterior análise histológica. 3 classes de drogas foram testadas para verificação da DE<sub>50</sub> - dose efetiva para 50% dos animais que receberam as drogas: (1) opioides: morfina, heroína, fantanil, codeína e meperidina; (2) canabinóides: D9-THC e CP-55,940; e (3) agentes nicotínicos: nicotina e epibatidina. Aplicou-se o teste de remoção da cauda em aparato com emissão de calor.</p>	<p>Os resultados demonstraram que a utilização do método de <i>up-and-down</i> foi eficaz para reduzir substancialmente o número de animais necessários para determinar os valores de DE<sub>50</sub> de uma variedade de drogas antinociceptivas.</p>	<p>Não cita. Estados Unidos.</p>	<p>LICHTMAN, 1998.</p>



<p>Coelhos fêmeas <i>Dutch Belted</i> e <i>New Zeland White</i> (2 grupos, n= 236-350 animais). 4 anos de experimento.</p>	<p>Investigar o uso de coelhos <i>Dutch Belted</i> como uma raça alternativa para testes de toxicidade do desenvolvimento.</p>	<p>Grupo com gestantes não tratadas da raça <i>Dutch Belted</i> e grupo com gestantes não tratadas da raça <i>New Zeland</i>.</p>	<p>Procedeu-se as mensurações de ganho de peso corporal materno e consumo de alimentos pelas gestantes, mensuração de parâmetros hematológicos e de bioquímica sérica durante a gestação, parâmetros reprodutivos maternos coletados através de cesárea (laparotomia) e incidências de alterações morfológicas fetais espontâneas.</p>	<p>Os resultados demonstraram que a raça <i>Dutch-Belted</i> é uma alternativa prática ao uso do coelho branco <i>New Zeland</i> para os estudos de toxicidade do desenvolvimento uma vez que, como para testar um composto relativamente não tóxico (dose limite de 1 g/kg de peso corporal), utilizando a raça <i>Dutch-Belted</i> pouparia cerca de 40% do custo do composto. E, devido ao seu menor tamanho, a utilização desta raça exigiria cerca de 40% menos quantidade de fármaco. Também, por ser o <i>Dutch Belted</i> pigmentado, tal raça oferece a capacidade de testar os potenciais efeitos de vários xenobióticos no desenvolvimento de melanócitos.</p>	<p>Merck Institutional Animal Care and Use Committee. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council, 1996). Estados Unidos.</p>	<p>SPENCE, 2003.</p>
--	--	---	--	---	---	----------------------

<p>Ratos fêmeas LE/Mol e camundongos machos B6D2F1 1bm/Bom (2 grupos, n= 20 animais).</p>	<p>Avaliar o método de oscilação da assimetria como indicador de estresse em camundongos e ratos.</p>	<p>Grupos de ratos e grupo de camundongos. Foram realizadas sete medidas: 1) largura dos ossos do carpo (medida na superfície da pele do animal), 2) largura da articulação entre a tibia e os ossos do tarso (medido na superfície da pele do animal), 3) largura da articulação entre o metatarso III e a falange pélvica (medida na superfície da pele do animal), 4) comprimento da ulna (medida na superfície da pele do animal e no osso real) 5) comprimento do calcâneo e do metatarso (medida na superfície da pele do animal e no o osso real), 6) comprimento do dente incisivo superior, 7) comprimento do dente incisivo inferior.</p>	<p>Procedeu-se teste para assimetria flutuante/assimetria direcional e anti-simetria, correlacionando as medidas esqueléticas com as obtidas da superfície da pele.</p>	<p>Os resultados demonstraram que apenas duas medidas (largura da articulação entre o osso metatársico III e a falange pélvica, e o comprimento do dente incisivo superior) foram correlacionadas, sendo então recomendadas para medir a oscilação de assimetria em camundongos e ratos.</p>	<p><i>FELASA</i> guidelines (Recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit breeding colonies, 1994). Cooperação internacional: Dinamarca e EUA.</p>	<p>STUB et al., 2002.</p>
<p>Ratos fêmeas Sprague-Dawley (4 grupos).</p>	<p>Analisar um corante alternativo (uma variação de Alcian Blue) para avaliação da cartilagem fetal.</p>	<p>Grupo corado com fórmula original de Alcian Blue, grupo corado com um novo Alcian Blue 8GX, grupo corado com variantes de Alcian Blue-Piridina e grupo corado com variante de Alcian Blue – Tetrakis.</p>	<p>Através de procedimentos de coloração convencionais, avaliou-se a qualidade desses corantes em relação a partir do consumo pela cartilagem, da clareza dos componentes cartilagosos, da intensidade da coloração, e legibilidade das amostras em avaliação estereomicroscópica.</p>	<p>Os resultados demonstraram que a variante Alcian Blue-Tetrakis apresentou melhor capacidade de corar a cartilagem fetal do que a fórmula nova de Alcian Blue 8GX.</p>	<p>Não cita. Estados Unidos.</p>	<p>REDFERN et al., 2007.</p>

Fonte: Elaboração própria.

#### 4.14 Métodos alternativos

A definição de métodos alternativos ainda é bastante polêmica. Por um lado, métodos alternativos seriam somente aqueles que levam à total substituição do animal, conhecidos também como métodos substitutivos. Por outro lado, quaisquer técnicas que reduzam o sofrimento e a dor do animal ou que somente substituam um modelo animal vigente no momento por outro modelo animal secundário seriam alternativas, sendo denominadas ainda como métodos complementares (CAZARIN et al., 2004).

No Brasil, a fim de incrementar o princípio dos “3Rs”, o MCTI criou a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA), por meio da portaria nº 491 (2012). A RENAMA visa estimular a adequação de infraestrutura laboratorial e de recursos humanos especializados capazes de implantar alternativas ao uso de animais, desenvolvendo e validando novos métodos no país.

Para compreender o contexto histórico, sabe-se que a experimentação animal se apresentava como um fenômeno crescente até atingir seu pico em 1976, e a partir de então, teve início uma menor aceitação do grande número de animais utilizados nas pesquisas científicas. Entre as hipóteses sugeridas para explicar este fato, estão: a substituição de alguns experimentos pelos métodos *in vitro* com o advento da biologia molecular; o desenvolvimento da “ciência dos animais de laboratório” que possibilitou uma melhor “qualidade” desses, conseqüentemente, sendo desnecessário um número tão grande de animais; o aumento dos acordos internacionais que possibilitou a aceitação de dados dos testes de toxicidade em animais e a diminuição da repetição experimental; os experimentos em animais tornaram-se bastante onerosos, principalmente em relação às instalações e infraestruturas para criá-los de forma segura; e, os protestos por grupos ativistas cresceram, especialmente, a partir da década de 70 (PAIXÃO; SCHRAMM, 2008).

Sabe-se que em estudos toxicológicos, o desenvolvimento e a utilização de metodologias alternativas à experimentação animal são metas de longa data dentro da comunidade científica (CAZARIN et al., 2004). Contudo, a corrida em busca de métodos alternativos visa sempre priorizar aqueles mais rápidos, mais baratos e mais confiáveis, contribuindo para aumentar a segurança na indústria química (ABBOTT, 2009).

Na toxicologia da reprodução e do desenvolvimento, é extremamente pertinente a demanda pelas metodologias alternativas embora o rato ainda seja o modelo animal de eleição para avaliar as respostas uterotrópicas. É certo que, desde a década de 30, são realizadas pesquisas sobre fisiologia reprodutiva e endocrinologia murina, sendo que esta espécie tem sido mais profundamente caracterizada do que qualquer outro modelo animal devido às suas inúmeras semelhanças com a função reprodutiva humana (GRAY et al., 2004). Até então, grande número de ratos é usado em estudos multigeracionais, para avaliar as respostas de diferentes gerações (F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, etc.) e estágios de desenvolvimento (SCHULZ et al., 2014).

Entre as demais áreas da toxicologia, também cresce o interesse por métodos alternativos, como nos testes de toxicidade aguda (SASS, 2000) e de carcinogenicidade (ASHBY, 2001; GOODMAN, 2001; SCHWETZ; GAYLOR, 1998; TENNANT, 1998). No Brasil, recentemente, o CONCEA publicou, através da RN nº 18, uma lista com dezessete métodos alternativos à experimentação animal que servem para avaliar o potencial de irritação e corrosão da pele, o potencial de irritação e corrosão ocular, o potencial de fototoxicidade, a absorção cutânea, o potencial de sensibilização cutânea, a toxicidade aguda e a genotoxicidade (BRASIL, 2014).

Geralmente, os métodos substitutivos envolvem o uso de organismos "inferiores" não protegidos pela legislação vigente, como espécies não mamíferas, incluindo invertebrados, plantas e microrganismos. Cita-se o emprego de espécies alternativas na experimentação tais como o peixe teleósteo *zebrafish* (*Danio rerio*) (BALLATORI; VILLALOBOS, 2002; RALDÚA et al., 2012; SCHLUESENER; SCHLUESENER, 2013; SELDERSLAGHS et al., 2009; SELDERSLAGHS et al., 2012), larvas de anfíbios (*Xenopus laevis*) (BALLATORI; VILLALOBOS, 2002; DI RENZO et al., 2011), aves (BALLATORI; VILLALOBOS, 2002), crustáceos (*Daphnia*) (SCHLUESENER; SCHLUESENER, 2013), moscas (*Drosophila melanogaster*) (BALLATORI; VILLALOBOS, 2002; SCHLUESENER; SCHLUESENER, 2013), nematoides (*Caenorhabditis elegans*) (BALLATORI; VILLALOBOS, 2002; BOYD et al., 2010; SCHLUESENER; SCHLUESENER, 2013) e, até mesmo, leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) (BALLATORI; VILLALOBOS, 2002) e bactérias (*Salmonella typhimurium*) (GATEHOUSE et al., 1994).

As características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas bem como os dados mais recentes sobre sequenciamento do genoma, indicam algumas similaridades entre seres humanos, vertebrados não primatas e invertebrados durante suas fases primárias de desenvolvimento (BALLATORI; VILLALOBOS, 2002).

Em relação aos métodos complementares, destaca-se o emprego dos *mini-pigs* como um modelo animal não roedor que bastante se aproxima dos parâmetros de referência da espécie humana. Tais suínos apresentam, inclusive, vantagens à toxicologia da reprodução e do desenvolvimento como numerosa prole, ciclo estral curto, ciclo espermatogênico breve, precocidade da maturidade sexual e período gestacional relativamente rápido (BODE et al., 2010).

Nesta área, um consórcio internacional, conhecido como projeto ReProTect, foi criado pelo *European Committee for Validation of Alternative Methods (ECVAM)*. Tal projeto assumiu a liderança para gerenciar o desenvolvimento de uma estratégia de testes sobre o ciclo reprodutivo (fertilidade masculina e feminina, implantação e desenvolvimento pré/pós-natal). A partir disso, não somente métodos *in vitro*, como também *in silico* e tecnologias de sensores devem ser implementados e divulgados para a comunidade científica (HARENG et al., 2005; PAZOS et al., 2010; SCHENK et al., 2010; WITTERS et al., 2010).

Enfim, hoje, na toxicologia da reprodução, encontram-se disponíveis os seguintes métodos alternativos: cultura de linhagens de células de Sertoli, morfologia e motilidade espermática, penetração espermática, cultura de folículos primários, e ensaios de ligação em receptores. Já na toxicologia do desenvolvimento estão: *Frog Embryo Teratogenesis Assay Xenopus (FETAX)* – qual consiste na avaliação da ocorrência de mortalidade, malformações ou retardo no crescimento de uma cultura de embrião de sapo), cultura de embriões, cultura de células embrionárias, formação dos brotos dos membros em roedores, testes em *zebrafish* e tecnologia genômica (GREEN et al., 2001).

Contudo, acredita-se que o desenvolvimento e a validação de métodos *in vitro* e *in silico* deverão, ainda, superar muitos obstáculos científicos e regulamentares. Em médio prazo, a estratégia deve ser mesmo mais direcionada para o refinamento e a redução dos testes *in vivo*, uma vez que a total substituição da experimentação

animal para avaliar parâmetros toxicológicos complexos ainda é algo distante da realidade atual (LILIENBLUM, 2008).

#### 4.14.1 Estudos *in vitro*

*In vitro* é uma expressão em latim que designa processos biológicos que ocorrem fora dos sistemas vivos, em condições laboratoriais controladas, sendo realizados comumente em recipientes de vidro. É certo que os testes de toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento envolvem a exposição de animais gestantes, principalmente, ratas, para posterior avaliação dos efeitos tóxicos em seus fetos. Por isso, nessa área, sob o conceito dos “3Rs”, os estudos *in vitro* têm sido desenvolvidos desde o início da década de 80. Historicamente, muitas alternativas *in vitro* foram desenvolvidas para melhor compreensão dos mecanismos de processos da organogênese em nível molecular, celular e tecidual. Hoje, os testes que avaliam a teratogenicidade *in vitro* são utilizados, basicamente, como *screenings*, ou seja, para avaliação do potencial teratogênico de uma determinada substância (PIERSMA, 2004; REUTER et al., 2003; SPIELMANN, 1998).

Dentre os métodos *in vitro* aplicados à toxicologia da reprodução e do desenvolvimento, tem-se, subdivididos apenas didaticamente, a cultura de células, tecidos e órgãos do sistema reprodutivo (CHAPIN et al., 2013), a cultura de células embrionárias (LUIJTEN et al., 2010; PELLIZZER et al., 2005; RAPPOLEE et al., 2012; SALINAS et al., 2005) e a cultura de embriões (THOMSON et al., 2011).

A cultura de célula pode ser aplicada para determinar a toxicidade pré-natal com o objetivo de discriminar os compostos com alta toxidez. A viabilidade celular bem como possíveis danos em sua estrutura são utilizados como parâmetros da análise toxicológica. Porém, é um modelo de função fisiológica ainda controverso, devido à perda de características que ocorre durante o cultivo, visto que a proliferação *in vitro* difere daquela *in vivo* (DELRASO, 1993; FRACZEK et al., 2012; SWIERENGA et al., 1991).

Já a cultura de órgão pouco serve para a detecção de teratógenos em etapas iniciais da organogênese, pois tecidos de palato, pulmões, rins e pâncreas são removidos do embrião durante essa fase para avaliar as possíveis alterações durante o uso de uma determinada substância. No entanto, esse método apresenta

a vantagem de avaliar os efeitos de uma determinada substância nos parâmetros de crescimento do órgão, taxa de diferenciação dos tecidos e alteração tempo-dependente na morfologia (GÓRNIAK et al., 2008).

E a cultura de embriões tem como desvantagem o pequeno intervalo de tempo disponível para a avaliação, já que a necrose se desenvolve rapidamente, uma vez que o tempo de sobrevivência do embrião é de 24 a 48 horas. No entanto, esse tipo de método é o que oferece maior potencial para o uso como adjuvante dos protocolos de teratogenicidade *in vivo* (GÓRNIAK et al., 2008).

Logo, embora tendências atuais preconizem a emancipação dos métodos *in vitro*, os modelos animais, especialmente roedores, ainda apresentam como principal vantagem o fornecimento de informações sobre o organismo como um todo, fato que não é conseguido com alternativas (CHORILLI et al., 2007).

Em vista de sua complexidade, é inoportuno sugerir que a experimentação animal em toxicologia da reprodução e do desenvolvimento possa ser totalmente substituída por estudos *in vitro*, pois a unidade integrada materno-fetal continuará a ser necessária para avaliação completa de riscos sobre as fases do desenvolvimento embrionário (PIERSMA, 2004).

Assim, é importante se posicionar que, nos dias de hoje, nenhum teste *in vitro* pode substituir por completo os testes *in vivo* (MORALES, 2008). Sugere-se que tal improbabilidade de substituição ocorra, atualmente, devido à carência da avaliação de uma determinada resposta específica, à impossibilidade de avaliar a farmacocinética e à subjetiva extrapolação dos resultados para uma determinada espécie (em geral, o ser humano); portanto, os métodos *in vitro* servem apenas como parâmetros iniciais para a avaliação da possível teratogenicidade de uma determinada substância, além de ser uma ferramenta para estudar os mecanismos de ação da dismorfogênese (GÓRNIAK et al., 2008).

No entanto, os métodos *in vitro* podem abreviar, sim, a execução de muitos testes piloto de toxicidade *in vivo*, reduzindo o número de animais na experimentação (PIERSMA, 2004).

O quadro 16 mostra estudos *in vitro* para o estudo da toxicologia da reprodução e do desenvolvimento.

Todos os autores, sem sombras de dúvidas, apontam que os testes de segurança de potenciais drogas tem sido e, continuarão sendo, um grande desafio

ao toxicologista na indústria farmacêutica. Embora existam controvérsias a respeito da adequação e da validação dos métodos *in vitro*, hoje em dia, o aumento crescente dos requerimentos de avaliação de segurança química demanda na expansão desses métodos alternativos para reduzir o recurso da experimentação animal, uma vez que ensaios que avaliam a toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento estão, reconhecidamente, entre aqueles que requerem o uso de maior número de animais. Apesar dos estudos *in vitro* revelarem resultados favoráveis, com concentração tóxica dentro da faixa esperada dos estudos *in vivo*, ilustra-se a importância de combinar ensaios que contemplem vários processos biológicos e diferentes mecanismos complementares, aumentando o valor preditivo da bateria de testes em relação aos ensaios *in vitro* individuais. Por fim, ao contribuir significativamente para o princípio dos “3Rs”, os estudos *in vitro* representam ser valiosas ferramentas para triagens, com boa sensibilidade e especificidade, importante para a não seleção de compostos com propriedades indesejáveis (AUGUSTINE-RAUCH et al., 2004; BOYD et al., 2010; CORDELLI et al., 2007; EVANS et al., 2001; HETTWER et al., 2010; HRACH et al., 2011; KOEPER; VOHR, 2009; MUELLER et al., 2007; OSMAN et al., 2010; PIERSMA et al., 2013; SCHOLZ et al., 1999; SEILER et al., 2004; VAN DEN BULCK et al., 2011; VAN DER BURG et al., 2010; VAN WOUDEMBERG, et al., 2012; WITTERS et al., 2010).



Quadro 16 - Métodos alternativos *in vitro*.

Técnica	Objetivo	Metodologia	Resultado	País(es) pesquisador(es)	Referência
Cultura de embriões de ratas Sprague-Dawley.	Investigar veículos alternativos para compostos insolúveis em água, visto a problemática da toxicidade do desenvolvimento associada aos solventes.	Os embriões foram expostos ao ácido retinoico (agente teratogênico insolúvel), utilizando-se soluções contendo albumina de soro bovino (BSA) e glicerol, e os seguintes solventes: formamida, dimetilformamida, dimetil sulfóxido (DMSO) e etanol.	Os resultados demonstraram que todos os quatro solventes/soluções podem ser úteis como veículos dependendo das propriedades químicas do composto a ser solubilizado.	Estados Unidos.	AUGUSTINE-RAUCH et al., 2004.
Cultura de nematódeos <i>Caenorhabditis elegans</i> das cepas Bristol N2 e CB5584 mls12.	Investigar um método de alto rendimento para a avaliação de toxicidade química utilizando ensaio de reprodução com o nematódeo <i>C. elegans</i> .	Através do instrumento COPAS Biosort, quantificou-se a capacidade reprodutiva de <i>C. elegans</i> expostos a produtos químicos por 48h a partir do último estágio larval (L4) para a idade adulta. Foram testados os efeitos de diferentes concentrações de DMSO, os efeitos do pH (ácido ascórbico, ácido acético), e os efeitos de toxicantes (cloreto de cádmio - modelo de toxicante, diquat, paraquat, paration, EMS, cafeína, metadona).	Os resultados demonstraram que a toxicidade dos sete compostos testados na reprodução do nematódeo foi altamente correlacionada com a letalidade de roedores sugerindo que este modelo pode ser útil para prever o potencial de toxicidade de substâncias químicas em outros organismos.	Estados Unidos.	BOYD et al., 2010.
Cultura de células HeLa a análises de espermatozoides através de citometria de fluxo.	Investigar um novo método <i>in vitro</i> para avaliar danos no DNA induzidos por potenciais mutagênes da célula germinativa em esperma de touros de práticas de reprodução assistida.	Os espermatozoides foram tratados <i>in vitro</i> com metanossulfonato de metila (MMS) ou melfalano (MLP), suplementados ou não com o extrato de proteínas de células HeLa.	Os resultados demonstraram que nenhum efeito de MMS ou MLP foi detectado sem a suplementação proteica, pelo contrário, um efeito <i>clear-cut</i> dose-dependente foi mensurado após adição do extrato celular. Portanto, representam uma prova de conceito do método <i>in vitro</i> para teste de mutagenicidade espermática que pode oferecer uma abordagem promissora para complementar os ensaios previamente validados <i>in vivo</i> de genotoxicidade celular.	Itália.	CORDELLI et al., 2007.

Cultura de células CHO (linhagem celular do ovário de hamster chinês).	Desenvolver método <i>in vitro</i> de triagem de toxicidade para compostos que apresentam elevado potencial tóxico agudo <i>in vivo</i> .	As células foram cultivadas por 24h expostas a 26 compostos (2,4-dinitrofenol, cloranfenicol, vidarabina, carmustina, dodecil sulfato de sódio, clorpromazina, dietilestilbestrol, cicloheximida, mitramicina, rotenona, doxorubicina, cromomicina, actinomicina D, podofilotoxina, melfalano, cisplatina, daunorrubicina, sulfato de vincristina, cloreto de benzetônio, tioguanina, ácido retinóico, estreptozotocina, colchicina, cloreto de mercúrio, mecloretamina, vinblastina) para determinação da citotoxicidade pela prova de redução da resazurina. Foram avaliados a DL <sub>50</sub> e os mecanismos de toxicidade aguda.	Os resultados demonstraram que a triagem estudada é altamente específica (sem falso-positivos) e possui sensibilidade de aproximadamente 80%.	Cooperação internacional: Reino Unido, Itália, Espanha e Estados Unidos.	EVANS et al., 2001.
Cultura de células-tronco embrionárias pluripotentes da linhagem celular ES-D3, células Balb/c-3T3 (clone A31), hepatócitos primários cultivados em colágeno de tendão da cauda de ratos, hepatócitos humanos.	Investigar a combinação de hepatócitos primários com cultura de células embrionárias murinas através de uma pré-incubação para melhorar a preditividade na bioativação causada pela teratogenicidade.	Foram testadas substâncias com conhecido potencial teratogênico: ciclofosfamida e valpromida.	Os resultados demonstraram o desenvolvimento de uma co-cultura para testes de embriotoxicidade, onde os compostos foram incubados com hepatócitos e o sobrenadante foi adicionado à cultura de células-tronco embrionárias para se obter uma dose-dependência das substâncias pré-incubadas.	Alemanha.	HETTWER et al., 2010.
Cultura de células hepáticas (hepatócitos primários) de ratos machos Wistar.	Desenvolver um modelo <i>in vitro</i> de predição de toxicidade hepática baseado em cultura de hepatócitos primários de ratos a longo-prazo.	Após 3 dias de pré-incubação, os hepatócitos primários foram tratados por até 9 dias com 13 compostos de toxicidade conhecida (alfa-naftil isocianato, clorpromazina, estolato de eritromicina, tetraciclina, troglitazona, clofibrato, dexametasona, 17-beta-estradiol, metiformina, naloxona, quinidina, rosiglitazona, teofilina). Avaliaram-se as mudanças no perfil global de expressão gênica, sendo estas posteriormente utilizadas para a elaboração de um modelo de classificação preditiva.	Os resultados demonstraram a possibilidade dos modelos <i>in vitro</i> de expressão gênica contribuírem para a seleção precoce na descoberta de medicamentos, melhorando a preditividade dos estudos toxicológicos e reduzindo, assim, o uso de animais em toxicologia.	Alemanha.	HRACH et al., 2011.

<p>Cultura de células esplênicas de ratos machos Wistar e de camundongos fêmeas NMRI (para culturas Mishell–Dutton).</p>	<p>Comparar os dados obtidos de experimentos de estimulação mitogênica com de experimentos de resposta imune humoral <i>in vitro</i>.</p>	<p>Estudam-se 7 compostos imunossupressores (ciclosporina A, dexametasona, rapamicina, metotrexato, uretano, benzopireno, ciclofosfamida) e 4 controles negativo (manitol, bromoclorobutano, dodecilsulfato de sódio, heptanal). Os dados obtidos a partir de experimentos de estimulação mitógena em ratos (análise de proliferação, liberação de TNFalfa e liberação de IFNgama ) com de experimentos de resposta <i>in vitro</i> de anticorpos.</p>	<p>Os resultados demonstraram que a resposta <i>in vitro</i> de anticorpos mostrou uma alta sensibilidade e especificidade. Também é um ensaio promissor para a predição de propriedades imunossupressivas uma vez que os ensaios de estimulação mitogênica estão restritos a determinados tipos de células e parâmetros escolhidos e qualquer alteração induzida por composto é susceptível de ser detectada num ensaio funcional como a resposta <i>in vitro</i> de anticorpos, quando várias células imunocompetentes têm de cooperar para resultar na resposta humoral analisada.</p>	<p>European Union animal welfare regulations. Alemanha.</p>	<p>KOEPER e VOHR, 2009.</p>
<p>Cultura de células primárias adrenais de ratos machos Wistar e de cães, cultura de células H295 derivadas de carcinoma adrenocortical humano, cultura de hepatócitos primários de ratos e humanos.</p>	<p>Investigar dois modelos alternativos baseados na cultura de células para detectar e avaliar toxicidade espécie-específica.</p>	<p>Para avaliar a inibição da esteroidogênese, utilizaram-se dois compostos: cetozonazol e metirapona.</p>	<p>Os resultados demonstraram que o modelo de hepatócitos de rato previu corretamente os efeitos observados em ratos e a comparação <i>in vitro/in vivo</i> permitiu uma extrapolação sólida das consequências em seres humanos. Estes exemplos demonstraram que uma estratégia de teste inteligente, utilizando métodos alternativos, pode possibilitar uma avaliação significativa de segurança para os seres humanos pela adoção de tecnologias feitas sob medida ao invés dos métodos toxicológicos clássicos. Ou seja, os modelos <i>in vitro</i> podem ser alternativas poderosas à experimentação animal.</p>	<p>Alemanha.</p>	<p>MUELLER et al., 2007.</p>
<p>Cultura de células-tronco embrionárias pluripotentes D3 de ratos, corpos embrioides para cultura de cardiomiócitos.</p>	<p>Investigar o perfil proteômico de células-tronco embrionárias para definir marcadores para diferenciação celular e embriotoxicidade.</p>	<p>As diferenciações de culturas celulares foram expostas ao monobutiltalato. Através de análise por Western Blot, foram quantitativamente avaliadas as proteínas afetadas pelo processo de diferenciação.</p>	<p>Foi observada uma correlação favorável entre a expressão da proteína e alterações publicadas na expressão gênica em nível transcritômico. Os resultados revelam potenciais marcadores de proteínas que podem ser utilizados como parâmetros em um teste alternativo ao uso de animais, com base na cultura de células-tronco embrionárias, para embriotoxicidade, embora mais estudos sejam necessários para confirmação.</p>	<p>Holanda.</p>	<p>OSMAN et al., 2010.</p>

<p>Ensaio de ativação transcricional 24 CALUX, cultura de células-tronco embrionárias cardíacas D3 de ratos, ensaio ReProGlo e ensaio de embriotoxicidade em ovos fertilizados de <i>zebrafish</i> e dois ensaios da atividade de CYP17 e de CYP19.</p>	<p>Avaliar uma bateria de testes alternativos <i>in vitro</i> para a detecção de toxicantes da reprodução</p>	<p>Testou-se 12 compostos (ciclosporina A, valproato de sódio, D-manitol, flusilazol, ácido metoxiacético, ácido retinoico, endossulfan, dietilestilbestrol, cloreto de metilmercúrio, monoetilhexilftalato, glufosinato de amônio, dioctyltin dichloride/dichlorodioctylstannane) com diferentes mecanismos de ação tóxica em uma bateria de diferentes ensaios.</p>	<p>Os resultados demonstraram que a bateria de testes detectou corretamente 11 dos 12 compostos testados; a ocorrência de 1 falso-negativo pode ser explicada pela falta de um mecanismo específico de ação desse composto. Também, demonstraram que as concentrações tóxicas estavam na faixa esperada dos dados de toxicidade reprodutiva <i>in vivo</i>.</p>	<p>Cooperação internacional: Holanda e Alemanha.</p>	<p>PIERSMA et al., 2013.</p>
<p>Cultura de células-tronco embrionárias da linhagem D3 de camundongos e de células BALB/c 3T3.</p>	<p>Investigar a cultura células-tronco embrionárias da linhagem D3 de camundongos em relação a sua preservada capacidade de diferenciar-se pela exposição a drogas, e comparar tais células-tronco embrionárias com células fibroblásticas diferenciadas da linhagem celular 3T3 de camundongos analisando seus efeitos na viabilidade.</p>	<p>Foi classificado o potencial embriotóxico de produtos químicos em três níveis de embriotoxicidade <i>in vitro</i>: não embriotóxico (penicilina G, isoniacida, ácido ascórbico); fracamente embriotóxico (difenilhidantoína, cafeína, dexametasona); fortemente embriotóxico (citosina arabinosídeo, ácido retinoico, hidroxíureia, 5-fluoracil).</p>	<p>Os resultados avaliaram os seguintes parâmetros: (1) a inibição da diferenciação de células-tronco embrionárias em cardiomiócitos após 10 dias de tratamento, e a diminuição da viabilidade (citotoxicidade) de (2) células 3T3 e (3) células-tronco embrionárias após 10 dias de tratamento.</p>	<p>Alemanha.</p>	<p>SCHOLZ et al., 1999.</p>
<p>Cultura de células-tronco embrionárias da linhagem D3 de camundongos e de células BALB/c 3T3.</p>	<p>Investigar a melhoria do ensaio <i>in vitro</i> com células-tronco para toxicidade do desenvolvimento e o uso de parâmetros moleculares no teste com células-tronco embrionárias.</p>	<p>Foram testados 3 drogas: 5-fluoracil, ácido retinoico (como controles positivos) e penicilina G (como controle negativo).</p>	<p>Conclui-se que a melhora do teste de células-tronco embrionárias promete ser uma triagem preditiva para avaliação de risco em relação à toxicidade do desenvolvimento utilizando a tecnologia de células-tronco e os avanços tecnológicos na área de análise da expressão gênica.</p>	<p>Alemanha.</p>	<p>SEILER et al., 2004.</p>
<p>Cultura de ovos fertilizados de <i>zebrafish</i>.</p>	<p>Investigar o ensaio de toxicidade do desenvolvimento utilizando <i>zebrafish</i> para avaliar drogas candidatas.</p>	<p>Os ovos fertilizados foram expostos a diferentes concentrações de 15 compostos (triazol, benzamida, sulfonamida, triazol b, piridazinamina, carbamato, benzotriazol, oxima, benzimidazolamina, tetrahidroimidazotiazol, benzotiazolamina, sulfamoda, benzamida, tetrahidropirimidina, acetanilida), sendo 8 deles com potencial teratogênico e 7 não teratogênicos, por até 96h pós-fertilização; foram avaliados 28 parâmetros morfológicos e o nível de absorção dos compostos.</p>	<p>Os resultados demonstraram que a maioria das drogas com testes positivos nos mamíferos também foi positiva no <i>zebrafish</i> (sensibilidade de 75%), enquanto que um grande número relativo de falso-positivos foi observado (43% de especificidade). Também, a captação do composto parece ser útil para esclarecer as classificações como teratogênicos ou potencial indutores de overdose.</p>	<p>Cooperação internacional: Bélgica e Reino Unido.</p>	<p>VAN DEN BULCK et al., 2011.</p>

Cultura de células da linhagem ER-alfa-CALUX.	Desenvolver um método para testar a atividade estrogênica e antiestrogênica de compostos <i>in vitro</i> , como uma alternativa ao uso de modelos animais tal como no ensaio uterotrópico.	Uma lista de compostos foi testada: 17beta-estradiol (E2), dibutilftalato (DBP), dietilestilbestrol (DES), n-butylparabeno, corticosterona, 17alfa-etinilestradiol (EE2), equol, genisteína, hexestrol, ICI 182/780, nonilfenol, noretinodrel, 4OH-tamoxifeno, o,p'-DDT, raloxifeno-HCl, tamoxifeno, flutamida.	Os resultados demonstraram que a linhagem celular ER-alfa-CALUX provou ser um preditor muito adequado e confiável para a estrogenicidade de produtos químicos e foi capaz de classificar prontamente uma variedade de produtos químicos com base em seus valores de EC50.	Cooperação internacional: Holanda, Alemanha, Bélgica, Japão e Itália.	VAN DER BURG et al., 2010.
Cultura de embriões bovinos a partir do complexo cumulus-oócito (COC).	Investigar a aplicabilidade dos ensaios <i>in vitro</i> de maturação de oócitos bovinos para estudo de toxicologia da reprodução em fêmeas.	Os oócitos bovinos foram expostos a: acrilamida, atrazina, cloreto de cádmio, cotinina, cicloheximina, dietilestilbestrol, 17-beta-estradiol, monoetilhexilftalato, nicotina, nocodazol, piperazina, ácido retinóico. Os parâmetros avaliados foram: maturação nuclear dos oócitos (progressão da meiose) e citotoxicidade geral.	Os resultados demonstraram que o ensaio <i>in vitro</i> de maturação de oócito bovino previu corretamente a classificação dos compostos entre dois grupos predefinidos com distintas funções biológicas: (a) que afetam a fertilidade feminina e (b) que afetam o desenvolvimento embrionário, tendo uma ampla gama de propriedades físicas e químicas. Portanto, o modelo pode ser aplicado como potencial ferramenta para a triagem de toxicologia da reprodução.	Holanda.	VAN WOUDEBERG et al., 2012.
Cultura de células MELN e de células MCF-7 (receptor de estrógeno positivo).	Avaliar a atividade estrogênica ou antiestrogênica de produtos químicos pelo cultivo celular.	Uma lista de compostos foi testada: 17beta-estradiol (E2), dibutilftalato (DBP), dietilestilbestrol (DES), n-butylparabeno, corticosterona, 17alfa-etinilestradiol (EE2), equol, genisteína, hexestrol, ICI 182/780, nonilfenol, noretinodrel, 4OH-tamoxifeno, o,p'-DDT, raloxifeno-HCl, tamoxifeno, dimetilsulfóxidos (DMSO-VITO e DMSO-BSP).	Os resultados demonstraram que, como o ensaio MELN passou com sucesso pelos primeiros módulos do procedimento de validação <i>ECVAM</i> , agora se deve considerar como futuros passos a definição de um modelo de predição e seu domínio de aplicação para ser aceito como um teste alternativo, contribuindo para os "3Rs", como redução dos experimentos com animais.	Cooperação internacional: Bélgica, Alemanha e Itália.	WITTERS et al., 2010.

Fonte: Elaboração própria.

#### 4.14.2 Estudos *in silico*

*In silico* é uma expressão derivada da palavra silício, elemento fundamental para a produção de circuitos eletrônicos e de informática. Denota simulação computacional. Os estudos *in silico* de toxicologia são considerados um avanço no contexto da avaliação e predição da toxicidade e uma alternativa à experimentação animal, baseando-se em modelos computacionais para prever eventos biológicos (SANTOS, 2013). Logo, os resultados da “toxicologia computacional” podem ser combinados aos estudos *in vitro* para aumentar a validade das metodologias alternativas nas avaliações de toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento (KNUDSEN et al., 2011; DARTEL; PIERSMA, 2011).

É importante frisar que este novo conjunto de abordagens metodológicas é baseado em modelos computacionais que incorporam dados estatísticos a conhecimentos sobre toxicidade adquiridos através de avaliações já realizadas em estudos *in vivo*. Portanto, os computadores apenas processam e armazenam conhecimentos já existentes, muitos deles adquiridos com a utilização de animais na pesquisa (MORALES, 2008).

O quadro 17 mostra estudos realizados *in silico*. Sumariamente, tratam da aplicação de modelagens computacionais que minimizam a experimentação animal e seus custos. Assim, realizam predições quanto aos riscos ao meio ambiente e à saúde, além de estimar características físico-químicas de substâncias e comportamento ambiental (HEWITT et al., 2010; SAGHIR et al., 2012).

Hewitt et al. (2010) baseiam-se em diferentes abordagens computacionais, como QSAR (*quantitative structure-activity relationship*), *expert systems* e métodos de extrapolação como *read-across* (interpolação). Já Saghir et al. (2012), através de dados dos modelos toxicocinéticos integrados, fornecem informações sobre a taxa, a extensão e a duração da exposição sistêmica através de doses, espécies, estirpes, gêneros e fases da vida dentro de um programa de toxicologia.

Portanto, os estudos *in silico* já vêm sendo incluídos nos guias de estudos toxicológicos da reprodução e do desenvolvimento, visando desselecionar compostos antes de se iniciar estudos *in vivo*, assim contribuindo para a redução do número de animais utilizados nas pesquisas. Porém, apresentam limitações uma vez

que não dispensam a realização do teste final em animais ou substituto biológico (HEWITT et al., 2010; SAGHIR et al. 2012).

Quadro 17 - Métodos alternativos *in silico*.

Objetivo	Metodologia	Resultados	Comitês e País(es) pesquisador(es)	Referência
Analisar alguns modelos computacionais e ferramentas que podem ser utilizados para auxiliar a avaliação de potencial toxicidade do desenvolvimento.	Foram testados 290 compostos químicos. Analisou-se a potencial aplicabilidade de modelos computacionais (QSAR, <i>expert systems e read-across</i> ) na avaliação toxicológica dos compostos teratogênicos.	Os resultados demonstraram o sucesso limitado dos atuais modelos computacionais quando utilizados de maneira isolada. Contudo, também indicam que estes, quando utilizados em conjunto, através de uma abordagem de balanço de evidências, permitem um melhor uso dos limitados dados disponíveis sobre toxicidade, aumentando a preditividade dos estudos.	Reino Unido.	HEWITT et al., 2010.
Descrever a implementação de TK em estudos regulatórios de toxicologia em curto, médio e longo prazo, avaliando a dose sistêmica diurna de agroquímicos em testes regulatórios de toxicidade através de uma abordagem integrada, sem o uso adicional de animais.	Foram testados três agroquímicos (X11422208, 2,4-D, X574175). As doses máximas cineticamente derivadas (KMD) de estudos em curto prazo, ao invés de, ou juntamente com, as doses máximas toleradas (MTD) foram utilizadas para a seleção das doses mais elevadas em subseqüentes estudos em longo prazo, guiando a seleção do nível das doses. O programa também foi utilizado para selecionar o método mais apropriado para administração oral (por gavagem ou através da dieta) de materiais de teste para ratos e coelhos em estudos de toxicologia do desenvolvimento.	Os resultados demonstraram que o programa TK forneceu dados fundamentais para compreender as diferenças de resposta entre doses, espécies, raças, sexos e fases de vida. Tal programa também pode ser útil nos estudos sobre modo de ação e para melhorar as avaliações de risco em humanos.	International Life Sciences Institute/Health and Environmental Sciences Institute – Agricultural Chemical Safety Assessment Technical Committee (ILSI/HESI–ACSA). Cooperação internacional: Estados Unidos e Reino Unido.	SAGHIR et al., 2012.

Fonte: Elaboração própria.



## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora a experimentação animal componha um dos pilares do conhecimento científico, é perceptível a crescente problematização que as práticas de pesquisa envolvendo animais vêm sofrendo, tanto a partir da sociedade civil como também dos setores acadêmicos. Tal fato se ancora ao avanço de ponderações filosóficas sobre o status moral dos animais.

O presente trabalho permitiu descrever os princípios que norteiam a experimentação animal, enfatizando a toxicologia da reprodução e do desenvolvimento. Apresentou-se, também, uma breve introdução a possíveis métodos alternativos que poderão ser empregados, daqui em diante, no Laboratório de Pesquisa Toxicológica (LAPETOX) da Universidade de Sorocaba. Entre tantos desafios, é importante refletir sobre a extrapolação dos resultados obtidos a partir de outras espécies para seres humanos e outros animais não alvos.

A preocupação com o bem-estar animal deve ser contínua e pertinente em todas as etapas de vida dos seres sencientes, inclusive, dos animais de laboratório. Para isso, a interpretação da legislação brasileira e da regulamentação no que tange a pesquisa científica constitui uma obrigatoriedade aos que trabalham em biotérios e laboratórios no país.

Conclui-se que a prevenção e a minimização de estresse, dor e desconforto em roedores é fundamento básico da investigação toxicológica uma vez que possuem razões éticas, argumentos legais e garantias científicas. Ressalta-se que a padronização das adequadas condições de bioterismo, aliada a projetos de pesquisa bem planejados e conscientes da incorporação (sempre que possível) de métodos alternativos são apresentados como etapas essenciais para a obtenção de resultados com alto grau de acuidade, alto nível de reprodutibilidade e precisão. Por fim, acredita-se que a boa ciência e o bem-estar animal devem caminhar continuamente de mãos dadas.



## REFERÊNCIAS

ABBOTT, A. Toxicity testing gets a makeover. **Nature**, v. 461, n. 7261, p. 158, set. 2009.

ABOU-ISMAIL, U. A et al. The effects of enhancing cage complexity on the behaviour and welfare of laboratory rats. **Behav. Processes**, v. 85, n. 2, p. 172-180, out. 2010.

ABOU-ISMAIL, U. A.; MAHBOUB, H. D. The effects of enriching laboratory cages using various physical structures on multiple measures of welfare in singly-housed rats. **Lab. Anim.**, v. 45, n. 3, p. 145-153, jul. 2011.

ABOU-ISMAIL, U. A. The effects of cage enrichment on agonistic behaviour and dominance in male laboratory rats (*Rattus norvegicus*). **Res. Vet. Sci.**, v. 90, n. 2, p. 346-351, abr. 2011.

ALVES, N. D. Pequenos animais: Dor, Senciência e bem-estar em animais. In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOÉTICA E BEM-ESTAR ANIMAL E I SEMINÁRIO NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA E BIOTECNOLOGIA ANIMAL. Recife. 2008. *Anais. Cons. Fed. Med. Vet.*, 2008.

ALVIM, M. S. Bioética e direito: uma avaliação normativa da utilização de animais não humanos e da experimentação animal. 2012. 194 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Filosofia) - Universidade Federal De Uberlândia, 1995.

ANIMAL WELFARE IN NAZI GERMANY. Disponível em: <[http://en.wikipedia.org/wiki/Animal\\_welfare\\_in\\_Nazi\\_Germany](http://en.wikipedia.org/wiki/Animal_welfare_in_Nazi_Germany)>. Acesso em 27 abr. 2014.

ARNDT, S. S. et al. Co-species housing in mice and rats: effects on physiological and behavioral stress responsivity. **Horm. Behav.**, v. 57, n. 3, p. 342-351, mar. 2010.

ARTS, J. W. et al. The impact of transportation on physiological and behavioral parameters in Wistar rats: implications for acclimatization periods. **Ilar. J.**, v. 53, n. 1, p. 82-98, 2012.

ASHBY J. Expectations for transgenic rodent cancer bioassay models. **Toxicol. Pathol.**, Suplemento, p. 177-182, 2001.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Acústica - Avaliação do ruído em áreas habitadas, visando o conforto da comunidade – Procedimento. NBR 10151. 2000.*

AUGUSTINE-RAUCH, K. Alternative experimental approaches for interpreting skeletal findings in safety studies. **Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.**, v. 80, n. 6 , p. 497-504, dez. 2007.

AUGUSTINE-RAUCH, K. A. et al. A study of vehicles for dosing rodent whole embryo culture with non aqueous soluble compounds. **Reprod. Toxicol.** , v. 18, n. 3, p. 391-398, mai. 2004.

AUGUSTSSON, H. et al. Human-animal interactions and animal welfare in conventionally and pen-housed rats. **Lab. Anim.**, v. 36, n. 3, p. 271-281, jul. 2002.

ÁVILA, V. P. F. **Efeito dos ruídos gerados por atividade humana em ratos Wistar: avaliação da natimortalidade e desenvolvimento ponderal dos neonatos.** 2012. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2012.

BACHINSKI, R. F. **Métodos alternativos ao uso de animais na toxicologia de agrotóxicos:** uma revisão sistemática e uma proposta de método para avaliação de anticolinesterásicos. 2011. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública e Meio Ambiente) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011.

BALCOMBE, J. P. Laboratory animals deserve better legal protection. **Nat. Med.**, v. 14, n. 3 , p. 239, mar. 2008.

BALCOMBE, J. P. Laboratory environments and rodents' behavioural needs: a review. **Lab. Anim.**, v. 40, n. 3 , p. 217-235, jul. 2006.

BALDWIN, A. L.; PRIMEAU, R. L.; JOHNSON, W. E. Effect of noise on the morphology of the intestinal mucosa in laboratory rats. **J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.**, v. 45, n. 1 , p. 74-82, jan. 2006.

BALLATORI, N.; VILLALOBOS, A. R. Defining the molecular and cellular basis of toxicity using comparative models. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 183, n. 3, p. 207-220, set. 2002.

BAÑOS, J. E; RUIZ-BARRÍA, G. La evaluación del dolor experimental en el laboratorio: los modelos de dolor neuropático en animales / Evaluation of experimental pain in the laboratory: models of neuropathic pain in animal's. **Rev. Soc. Esp. Dolor.**, v. 13, n. 8 , p. 542-552, nov. 2006.

BARROW, P. C. Reproductive toxicity testing for pharmaceuticals under ICH. **Reprod. Toxicol.** v. 28, n. 2 , p. 172-179, set. 2009.

BAXTER M. G. et al. Different behavioral effects of neurotoxic dorsal hippocampal lesions placed under either isoflurane or propofol anesthesia. **Hippocampus**, v. 18, n. 3, p. 245-250, 2008.

BEALE, K. E. et al. Accurate measurement of body weight and food intake in environmentally enriched male Wistar rats. **Obesity Silver Spring**, v. 19, n. 8, p. 1715-1721, ago. 2011.

BEM-ESTAR animal: demanda social tem reacendido discussões. Info CRMV-SP, São Paulo, ano 20, n. 53, p. 10-16, jul./dez. 2013.

BERNARDI, M. M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 691-699. 2002.

BEYER, B.K. et al. ILSI/HESI maternal toxicity workshop summary: maternal toxicity and its impact on study design and data interpretation. **Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.**, v. 92, n. 1, p. 36-51, fev. 2011.

BODE, G. et al. Steering Group of the RETHINK Project. The utility of the minipig as an animal model in regulatory toxicology. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**. v. 62, n. 3, p. 196-220, nov/dez. 2010.

BOGGIANO, M. M. et al. Effect of a cage divider permitting social stimuli on stress and food intake in rats. **Physiol. Behav.** v. 95, n. 1-2, p. 222-228, set. 2008.

BOYD, W. A. et al. A high-throughput method for assessing chemical toxicity using a *Caenorhabditis elegans* reproduction assay. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 245, n. 2, p. 153-159, jun. 2010.

BRAMBELL, R. W. R. **Report on the technical committee of enquiry into the welfare of animals kept under intensive livestock husbandry systems**. London: HM Stationery Office, 1965.

BRANCHI, I.; RICCERI, L. Refining learning and memory assessment in laboratory rodents. An ethological perspective. **Ann. Ist. Super. Sanita.**, v. 40, n. 2, p. 231-236, 2004.

BRANNEN, K.C. et al. Developmental toxicology: new directions workshop: refining testing strategies and study designs. **Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.**, v. 92, n. 5, p. 404-412, out. 2011.

BURMAN, O. et al. Removing individual rats affects indicators of welfare in the remaining group members. **Physiol. Behav.**, v. 93, n. 1-2, p. 89-96, jan. 2008.

BURN, C. C. et al. Long-term effects of cage-cleaning frequency and bedding type on laboratory rat health, welfare, and handleability: a cross-laboratory study. **Lab. Anim.**, v. 40, n. 4, p. 353-370, out. 2006.

BRASIL. Conselho Federal de Medicina Veterinária. Dispõe sobre o uso de animais no ensino e na pesquisa e regulamenta as Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs) no âmbito da Medicina Veterinária e da Zootecnia brasileiras e dá outras providências. Resolução nº 879, de 15 de fevereiro de 2008. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 de abr. 2008. Seção 1, p. 51.

BRASIL. Conselho Nacional de Cuidado na Experimentação Animal - CONCEA. Dispõe sobre a instalação e o funcionamento das Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs). Resolução normativa nº 1, de 9 de julho de 2010. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 12 de jul.2010. Seção 1, Nº 131, p. 10.

BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Altera dispositivos da Resolução Normativa nº 1, de 9 julho de 2010, que "Dispõem sobre a instalação e o funcionamento das Comissões de Éticas no Uso de Animais (CEUAS)". Resolução normativa nº 2, de 30 de dezembro de 2010. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 31 de dez.2010. Seção 1. Nº 251, p. 37.

BRASIL. Conselho Nacional de Cuidado na Experimentação Animal - CONCEA. Institui o Credenciamento Institucional para Atividades com Animais em Ensino ou Pesquisa - CIAEP; estabelece os critérios e procedimentos para requerimento, emissão, revisão, extensão, suspensão e cancelamento do credenciamento das instituições que criam, mantêm ou utilizam animais em ensino ou pesquisa científica; altera e revoga dispositivos da Resolução Normativa nº 1 de 9 de julho de 2010; e dá outras providências. Resolução normativa nº 3, de 14 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 15 de dez.2011. Seção 1. Nº 240, p. 47.

BRASIL. Conselho Nacional de Cuidado na Experimentação Animal - CONCEA. Dispõe sobre a utilização do formulário unificado para solicitação de autorização para uso de animais em ensino e/ou pesquisa pelas Comissões de Ética no Uso de Animais - CEUAs e dá outras providências. Resolução normativa nº 4, de 18 de abril de 2012. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19 de abr.2012. Seção 1. Nº 76, p. 7.

BRASIL. Conselho Nacional de Cuidado na Experimentação Animal - CONCEA. Baixa recomendação às agências de amparo e fomento à pesquisa científica, na forma prevista no art. 23 da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Resolução Normativa nº 5 Do Concea, de 14 de junho de 2012. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 de jun.2012. Seção 1. Nº 116, p. 62.

BRASIL. Conselho Nacional de Cuidado na Experimentação Animal - CONCEA. Altera a Resolução Normativa nº 1, de 9 de julho de 2010, que "Dispõe sobre a instalação e o funcionamento das Comissões de Éticas no Uso de Animais (CEUA's)". Resolução Normativa nº 6 Do Concea, de 10 de julho de 2012. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 de jul.2012. Seção 1. Nº 133, p. 13.

BRASIL. Conselho Nacional de Cuidado na Experimentação Animal - CONCEA. Dispõe sobre as informações relativas aos projetos submetidos às Comissões de Ética no Uso de Animais - CEUAs a serem remetidas por intermédio do Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais - CIUCA. Resolução Normativa nº 7 Do

Concea, de 13 de setembro de 2012. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 17 de set.2012. Seção 1. Nº 180, p. 9.

BRASIL. Conselho Nacional de Cuidado na Experimentação Animal - CONCEA. Dispõe sobre a prorrogação do prazo para envio do Relatório Anual de Atividades pelas Comissões de Ética no Uso de Animais - CEUAs. Resolução Normativa nº 8 Do Concea, de 27 de setembro de 2012. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 28 de set.2012. Seção 1. Nº 189, p. 24.

BRASIL. Conselho Nacional de Cuidado na Experimentação Animal - CONCEA. Prorroga o prazo para requerimento do Credenciamento Institucional para Atividades com Animais em Ensino ou Pesquisa - CIAEP. Resolução Normativa nº 9 Do Concea, de 8 de janeiro de 2013. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 9 de jan.2013. Seção 1. Nº 6, p. 2.

BRASIL. Conselho Nacional de Cuidado na Experimentação Animal - CONCEA. Altera o prazo para expedição do Credenciamento Institucional para Atividades com Animais em Ensino ou Pesquisa (CIAEP). Resolução Normativa nº 10 Do Concea, de 27 de março de 2013. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 28 de mar.2013. Seção 1. Nº 60, p. 5.

BRASIL. Conselho Nacional de Cuidado na Experimentação Animal - CONCEA. Dispõe sobre os procedimentos para abertura de processo administrativo no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA para apuração de infração administrativa. Resolução Normativa nº 11 Do Concea, de 24 de maio de 2013. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 27 de mai.2013. Seção 1. Nº 100, p. 9.

BRASIL. Conselho Nacional de Cuidado na Experimentação Animal - CONCEA. Baixa a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos - DBCA. Resolução Normativa nº 12 Do Concea, de 20 de setembro de 2013. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 de set.2013. Seção 1. Nº 186, p. 52.

BRASIL. Conselho Nacional de Cuidado na Experimentação Animal - CONCEA. Baixa as Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Resolução Normativa nº 13 Do Concea, de 20 de setembro de 2013. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 de set.2013. Seção 1. Nº 187, p. 5.

BRASIL. Conselho Nacional de Cuidado na Experimentação Animal - CONCEA. Dispõe sobre a situação das instituições que não solicitaram seu credenciamento no CONCEA, as quais utilizam animais para fins científicos ou didáticos. Resolução Normativa nº 14 Do Concea, de 2 de outubro de 2013. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 3 de out.2013. Seção 1. Nº 192, p. 29.

BRASIL. Conselho Nacional de Cuidado na Experimentação Animal - CONCEA. Baixa a Estrutura Física e Ambiente de Roedores e Lagomorfos do Guia Brasileiro de Criação e Utilização de Animais para Atividades de Ensino e Pesquisa Científica.

Resolução Normativa nº 15 Do Concea, de 16 de dezembro de 2013. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 de dez.2013. Seção 1. Nº 245, p. 9.

BRASIL. Conselho Nacional de Cuidado na Experimentação Animal - CONCEA. Altera os critérios e procedimentos para requerimento, emissão, revisão, extensão, suspensão e cancelamento do Credenciamento Institucional para Atividades com Animais em Ensino ou Pesquisa - CIAEP das instituições que produzem, mantêm ou utilizam animais para ensino ou pesquisa científica; altera e revoga dispositivos das Resoluções Normativas nº03, nº10, nº 14. Resolução Normativa nº 16 Do Concea, de 30 de abril de 2014. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2 de mai.2014. Seção 1. Nº 82, p. 8.

BRASIL. Conselho Nacional de Cuidado na Experimentação Animal - CONCEA. Dispõe sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil e dá outras providências. Resolução Normativa nº 17 Do Concea, de 3 de julho de 2014. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 4 de jul.2013. Seção 1. Nº 126, p. 51.

BRASIL. Conselho Nacional de Cuidado na Experimentação Animal - CONCEA. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil, nos termos da Resolução Normativa nº 17, de 03 de julho de 2014, e dá outras providências. Resolução Normativa nº 18 Do Concea, de 24 de setembro de 2014. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 de nov.2014. Seção 1. Nº 229, p. 31-31.

BRASIL. Conselho Nacional de Cuidado na Experimentação Animal - CONCEA. Regula a vinculação de centros públicos ou privados que realizam procedimentos em animais vivos em atividades de ensino, extensão, capacitação, treinamento, transferência de tecnologia, ou quaisquer outras com finalidade didática, ao sistema legal que regula o funcionamento do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Resolução Normativa nº 19 Do Concea, de 25 de novembro de 2014. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 de set.2014. Seção 1. Nº 185, p. 9.

BRASIL. Constituição (1998). **Constituição da República Federativa do Brasil**. Brasília: DF, Senado, 1988.

BRASIL. Decreto nº 24.645. de 10 de julho de 1934. Estabelece medidas de proteção aos animais. **Coleção de Leis do Brasil**. 1934. Vol. 4, p. 720.

BRASIL. Decreto-lei nº 5.517, de 23 de outubro de 1968. Dispõe sobre o exercício da profissão de médico-veterinário e cria os Conselhos Federal e Regionais de Medicina Veterinária. **Coletânea de Legislação**.

BRASIL. Decreto-lei nº 3.688, de 3 de outubro de 1941. Lei das Contravenções Penais. **Coletânea de Legislação**.

BRASIL. Decreto-lei nº 5.197, de 3 de janeiro de 1967. Dispõe sobre a proteção à fauna e dá outras providências **Coletânea de Legislação**.



BRASIL. Decreto-lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979. Estabelece normas para a prática didático-científica da vivissecação de animais e determina outras providências. **Coletânea de Legislação.**

BRASIL. Decreto-lei nº 6.899, de 15 de julho de 2009. Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria-Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais - CIUCA, mediante a regulamentação da Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. **Coletânea de Legislação.**

BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008/2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. **Coletânea de Legislação.**

BRASIL. Ministério de Estado da Ciência, Tecnologia e Inovação. Portaria MCTI nº 491, de 3 de julho de 2012. Institui a Rede Nacional de Métodos Alternativos - Renama e sua estrutura no âmbito do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI, que será supervisionada por um Conselho Diretor. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 5 de jul.2012. Seção 1. Nº 129, p. 19.

BRASIL. Ministério de Estado da Ciência, Tecnologia e Inovação. Portaria MCTI nº 465, de 23 de maio de 2013. Aprova a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos - DBCA. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 27 de mai.2013. Seção 1. p. 7.

BRASIL. Projeto de lei nº 1.153 da Câmara dos Deputados Federais, de 1995. Regulamenta o inciso VII, do parágrafo 1º do artigo 225, da Constituição Federal, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. **Coletânea de Legislação.**

BRASIL. Decreto-lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 13 de fev.1998. Seção 1. p. 1.

BROOM, D. M.; MOLENTO, C. F. M. Animal welfare: concept and related issues – Review. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n. 2, p. 1-11, 2004.

CAIS, A. L. **Bem-estar animal: questões éticas e legais.** 2011. 172 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Direito) - Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo, 1995.

CASTELHANO-CARLOS, M. J.; BAUMANS, V. The impact of light, noise, cage cleaning and in-house transport on welfare and stress of laboratory rats. **Lab. Anim.**, v. 43, n. 4, p. 311-327, out. 2009.

- CAVALCANTI, A. L. et al. Caracterização da pesquisa odontológica experimental em animais / Characterization of experimental dental research using animals. **R. G. O.** ; v. 57, n. 1, p. 93-98, jan/mar. 2009.
- CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 03, p. 289-299, jul./set. 2004.
- CHAPIN, R. E. et al. Assuring safety without animal testing: the case for the human testis *in vitro*. **Reprod. Toxicol.**, v. 29, p. 63-68, ago. 2013.
- CHATHAM, J.C.; BLACKBAND, S.J. Nuclear magnetic resonance spectroscopy and imaging in animal research. **ILAR J.**, v. 43, n. 3 , p. 189-208, 2001.
- CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28 n. 01, p. 11-23, 2007.
- CLEMENS, L.E. et al.. A behavioral comparison of the common laboratory rat strains Lister Hooded, Lewis, Fischer 344 and Wistar in an automated homecage system. **Genes. Brain. Behav.**, v. 13, n. 3 , p. 305-21, mar. 2014.
- COENEN, A. M. et al. Carbon dioxide euthanasia in rats: oxygen supplementation minimizes signs of agitation and asphyxia. **Lab. Anim.**, v. 29, n. 3 , p. 262-268, jul. 1995.
- CONLEE, K. M. et al. Carbon dioxide for euthanasia: concerns regarding pain and distress, with special reference to mice and rats. **Lab. Anim.**, v. 39, n. 2 , p. 137-161, abr. 2005.
- CORDELLI, E. et al. ReProComet: a new *in vitro* method to assess DNA damage in mammalian sperm. **Toxicol. Sci.**, v. 99, n. 2, p. 545-552, out. 2007.
- CORDERO, M. I. et al. Evidence for biological roots in the transgenerational transmission of intimate partner violence. **Transl. Psychiatry**, v. 24, n. 2, p. 106, jul. 2012.
- COUTELLIER, L. et al. Effects of rat odour and shelter on maternal behaviour in C57BL/6 dams and on fear and stress responses in their adult offspring. **Physiol. Behav.**, v. 94, n. 3, p. 393-404, jun. 2008.
- DAHLBORN, K. et al. Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on animal identification. **Lab. Anim.** v. 47, n. 1, p. 2-11, jan. 2013.

DAMY, S.B. et al. Fundamental aspects on animal research as applied to experimental surgery. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 56, n. 1, p. 103-111, jan./fev. 2010.

DE ARAUJO, G. G. et al. Monitoring chronic physical stress using biomarkers, performance protocols and mathematical functions to identify physiological adaptations in rats. **Lab. Anim.**, v. 47, n. 1, p. 36-42, jan. 2013.

DEAN, S. W. Environmental enrichment of laboratory animals used in regulatory toxicology studies. **Lab. Anim.**, v. 33, n. 4, p. 309-327, out. 1999.

DELRASO, N. J. *In vitro* methodologies for enhanced toxicity testing. **Toxicol Lett.** , v. 68, n. 1-2, p. 91-99, mai. 1993.

DEVONSHIRE, I. M. et al. Environmental enrichment differentially modifies specific components of sensory-evoked activity in rat barrel cortex as revealed by simultaneous electrophysiological recordings and optical imaging *in vivo*. **Neuroscience**, v. 170, n. 2, p. 662-669, out. 2010.

DI RENZO, F. et al. Is the amphibian *X. laevis* WEC a good alternative method to rodent WEC teratogenicity assay? The example of the three triazole derivative fungicides Triadimefon, Tebuconazole, Cyproconazole. **Reprod Toxicol.**, v. 32, n. 2 , p. 220-226, set. 2011.

DIRETRIZES DA PRÁTICA DE EUTANÁSIA DO CONCEA. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CONCEA. Brasília, 2013.

DUMONT, L. A. et al. The "double clock" or how to learn microsurgery without animal. **Ann. Chir. Plast. Esthet.**, v. 56, n. 6, p. 555-557, dez. 2011.

EVANS, S. M. et al.. Development of a high throughput *in vitro* toxicity screen predictive of high acute *in vivo* toxic potential. **Toxicol. In Vitro**, v. 15, n. 4-5 , p. 579-584, ago/out. 2001.

FESTING, M. F.; ALTMAN, D. G. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. **ILAR J.** , v. 43, n. 4 , p. 244-258, 2002. Erratum in: **ILAR J.**, v. 46, n. 3 , p. 320, 2005.

FELASA WORKING GROUP ON REVISION OF GUIDELINES FOR HEALTH MONITORING OF RODENTS AND RABBITS. *FELASA* recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. **Lab. Anim.**, v. 48, n. 3, p. 178-192, fev. 2014.

FILIPECKI, A. T. P. Análise do modo de Apropriação do marco regulatório do uso de animais na pesquisa científica no brasil: estudo de caso da Fundação Oswaldo Cruz.

2012. 469 f. Tese (Doutorado em Meio Ambiente) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2012.

FISHBEIN, E. A. What price mice? **JAMA**, v. 285, n. 7, p. 939-941, fev. 2001.

FITZNER, T. M. et al. The impact of different blood sampling methods on laboratory rats under different types of anaesthesia. **Lab. Anim.**, v. 40, n. 3, p. 261-274, jul. 2006.

FOLEY, P. L.; LIANG, H.; CRICHLLOW, A. R. Evaluation of a sustained-release formulation of buprenorphine for analgesia in rats. **J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.**, v. 50, n. 2, p. 198-204, mar. 2011.

FORBES, D. *FELASA* recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guineapig and rabbit breeding colonies. **Lab. Anim.**, v. 28, n. 3, p. 279-280, jul. 1994.

FORNARI, R. V. et al. Rodent stereotaxic surgery and animal welfare outcome improvements for behavioral neuroscience. **J. Vis. Exp.**, v. 30, n. 59, p. 352-258, jan. 2012.

FRACZEK, J. et al. Primary hepatocyte cultures for pharmaco-toxicological studies: at the busy crossroad of various anti-dedifferentiation strategies. **Arch. Toxicol.**, v. 87, n. 4, p. 577-610, abr. 2013.

FRANKS, B.; HIGGINS, E. T.; CHAMPAGNE, F. A. A theoretically based model of rat personality with implications for welfare. **PLoS One.**, v. 9, n. 4, p. 1-9, abr. 2014.

FRANKS, B.; HIGGINS, E. T.; CHAMPAGNE, F. A. Evidence for individual differences in regulatory focus in rats, *Rattus norvegicus*. **J. Comp. Psychol.**, v. 126, n. 4, p. 347-354, nov. 2012.

GATEHOUSE, D. et al. Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. **Mutat. Res.** v. 312, n. 3, p. 217-233, jun. 1994.

GERENUTTI, M. et al. Reproductive performance and embryotoxicity of rats exposed to carbamazepine. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v. 44, n. 3, set. 2008.

GERENUTTI, M.; SPINOSA, H. S.; BERNARDI, M. M. Algumas considerações sobre a toxicologia do desenvolvimento. COMUNICACOES CIENTIFICAS DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINARIA E ZOOTECNIA DA USP, v. 15, n. 1, p. 27-29, 1991.

GILBERT, N. Data gaps threaten chemical safety law. **Nature**, v. 475, n. 7355, p. 150-151, jul. 2011.

GIRBOVAN, C.; PLAMONDON, H. Environmental enrichment in female rodents: considerations in the effects on behavior and biochemical markers. **Behav. Brain. Res.**, v. 253, p. 178-190, set. 2013.

GLICKMAN, D. Regulations for the use of laboratory animals. **JAMA**, v. 285, n. 7, p. 941, fev. 2001.

GOLDBERG, A. M. Use of animals in research: a science--society controversy? The American perspective: animal welfare issues. **ALTEX**, v.19, n. 3, p. 137-139, 2002.

GOLUB, M. S. et al. Effects of restraint stress in gestation: implications for rodent developmental toxicology studies. **Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.**, v. 71, n. 1 , p. 26-36, fev. 2004.

GONDER, J. C.; LABER, K. A renewed look at laboratory rodent housing and management. **ILAR J.**, v. 48, n. 1, p. 29-36, 2007.

GOODMAN, J. I. A perspective on current and future uses of alternative models for carcinogenicity testing. **Toxicol. Pathol.**, v. 29, p. 173-176, 2001.

GÓRNIAK, S. L.; SPINOSA, H. S.; BERNARDI, M. M. Toxicologia do desenvolvimento. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIAK, S. L.; PALERMO-NETO. **Toxicologia aplicada à Medicina Veterinária**. Barueri: J. Manole, 2008, p. 701-731.

GÓRSKA, P. Principles in laboratory animal research for experimental purposes. **Med. Sci. Monit.**, v. 6, n. 1 , p. 171-180, jan./fev. 2000.

GRAY, L. E. et al. Use of the laboratory rat as a model in endocrine disruptor screening and testing. **ILAR J**, v. 45, n. 4, p. 425-437, 2004.

GREEN, S.; GOLDBERG, A.; ZURLO, J. TestSmart-high production volume chemicals: an approach to implementing alternatives into regulatory toxicology. **Toxicol. Sci.**, v. 63 n. 1, p. 6-14. set. 2001.

GUHAD, F. A.; HAU, J. Salivary IgA as a marker of social stress in rats. **Neurosci. Lett.**, v. 216, n. 2 , p. 137-140, set. 1996.

GUIA BRASILEIRO DE BOAS PRÁTICAS EM EUTANÁSIA EM ANIMAIS - CONCEITOS E PROCEDIMENTOS RECOMENDADOS. Conselho Federal de Medicina Veterinária. Brasília, 2012.

GUIDELINES FOR THE CARE OF LABORATORY ANIMALS IN TRANSIT. LABORATORY ANIMAL BREEDERS ASSOCIATION OF GREAT BRITAIN LIMITED (LABA) AND LABORATORY ANIMAL SCIENCE ASSOCIATION (LASA). Association of the British Pharmaceutical Industry (ABPI), British Laboratory Animal Veterinary Association (BLAVA), Institute of Animal Technology (IAT), Ministry of Agriculture,

Fisheries and Food (MAFF), Universities Federation for Animal Welfare (UFAW), and Animals (Scientific Procedures) Inspectorate. **Lab. Anim.**, v. 27, n. 2, p. 93-107, abr. 1993.

GUILLERMO, K. Animal experiments "represent outdated science". **Nat. Med.**, v. 14, n. 3, p. 239, mar. 2008.

HACKBARTH, H.; KÜPPERS, N.; BOHNET, W. Euthanasia of rats with carbon dioxide--animal welfare aspects. **Lab. Anim.**, v. 34, n. 1, p. 91-96, jan. 2000.

HAEMISCH, A.; GUERRA, G.; FURKERT, J. Adaptation of corticosterone-but not beta-endorphin-secretion to repeated blood sampling in rats. **Lab. Anim.**, v. 33, n. 2, p. 185-191, abr. 1999.

HAMPSHIRE, V. A. et al. Retrospective comparison of rat recovery weights using inhalation and injectable anaesthetics, nutritional and fluid supplementation for right unilateral neurosurgical lesioning. **Lab. Anim.** v. 35, n. 3, p. 223-229, jul. 2001.

HARENG, L. et al. The integrated project ReProTect: a novel approach in reproductive toxicity hazard assessment. **Reprod. Toxicol.**, v. 20, n. 3, p. 441-451, set. 2005.

HAWKINS, P. et al.; Joint Working Group on Refinement. Husbandry refinements for rats, mice, dogs and non-human primates used in telemetry procedures. Seventh report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement, Part B. **Lab. Anim.**, v. 38, n. 1, p. 1-10, jan. 2004.

HAYTON, S. M; KRISS, A.; MULLER, D. P. Comparison of the effects of four anaesthetic agents on somatosensory evoked potentials in the rat. **Lab. Anim.**, v. 33, n. 3, p. 243-251, jul. 1999.

HEINDL, C.; HESS, A.; BRUNE, K. Refinement and reduction in animal experimentation: options for new imaging techniques. **ALTEX**, v. 25, n. 2, p. 121-125, 2008.

HETTWER, M. et al. Metabolic activation capacity by primary hepatocytes expands the applicability of the embryonic stem cell test as alternative to experimental animal testing. **Reprod. Toxicol.**, v. 30, n. 1, p. 113-1200, ago. 2010.

HEWITT, M. et al. Integrating (Q)SAR models, expert systems and read-across approaches for the prediction of developmental toxicity. **Reprod. Toxicol.**, v. 30, n. 1, p. 147-160, ago. 2010.

HOLDEN, C. A pivotal year for lab animal welfare. **Science**, v. 232, n. 4747, p. 147-150, abr. 1986.

HORN, M. J et al. Effects of cage density, sanitation frequency, and bedding type on animal wellbeing and health and cage environment in mice and rats. **J Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.**, v. 51, n. 6, p. 781-188, nov. 2012.

HOTZEL, M. J. ; MACHADO FILHO, L. C. P. Bem-estar animal na agricultura do século XXI. **Rev. etol.** São Paulo, v. 6 n.1, pp. 3-15 jun. 2004.

HRACH, J.; MUELLER, S. O.; HEWITT, P. Development of an *in vitro* liver toxicity prediction model based on longer term primary rat hepatocyte culture. **Toxicol. Lett.**, v. 206, n. 2, p. 189-196, out. 2011.

IWAKI, S.; MATSUO, A.; KAST, A. Identification of newborn rats by tattooing. **Lab. Anim.**, v. 23, n. 4, p. 361-364, out. 1989.

JESSEN, L.; CHRISTENSEN, S.; BJERRUM, O. J. The antinociceptive efficacy of buprenorphine administered through the drinking water of rats. **Lab. Anim.**, v. 41, n. 2, p. 185-196, abr. 2007.

KASANEN, I. H. et al. The diet board: welfare impacts of a novel method of dietary restriction in laboratory rats. **Lab. Anim.**, v. 43, n. 3, p. 215-223, jul. 2009.

KASANEN, I.H. et al. Comparison of ear tattoo, ear notching and microtattoo in rats undergoing cardiovascular telemetry. **Lab. Anim.**, v. 45, n. 3, p. 154-159, jul. 2011.

KINSHOKU, M. R. et al.. Uso racional de modelos animais para pesquisa e ensino de microcirurgia / Rational use of animal models for research and microsurgery training. **Rev. Col. Bras. Cir.**; v. 39, n. 5, p. 414-417, set./out. 2012.

KIRK, R. G. Between the clinic and the laboratory: ethology and pharmacology in "the work of Michael Robin Alexander Chance, c.1946-1964. **Med. Hist.**, v. 54, n. 4, p. 513-536, out. 2009.

KIRKDEN, R. D.; NIEL, L.; WEARY, D. M. Aversion to carbon dioxide. **Lab. Anim.**, v. 39, n. 4, p. 453-455, out. 2005.

KNUDSEN, T. B. et al. Activity profiles of 309 ToxCast™ chemicals evaluated across 292 biochemical targets. **Toxicology**, v. 282, n. 1-2, p. 1-15, mar. 2011.

KNUDSEN, T. B. et al. Developmental toxicity testing for safety assessment: new approaches and technologies. **Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.**, v. 92, n. 5, p. 413-420, out. 2011.

KOEPER, L. M; VOHR, H. W. Functional assays are mandatory for a correct prediction of immunotoxic properties of compounds *in vitro*. **Food Chem. Toxicol.**, v. 47, n. 1, p. 110-118, jan. 2009.

KOHLER, I. et al.. Is carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) a useful short acting anaesthetic for small laboratory animals? **Lab. Anim.** v. 33, n. 2, p 155-161, abr. 1999.

KORT, W. J. et al. A microchip implant system as a method to determine body temperature of terminally ill rats and mice. **Lab. Anim.**, v. 32, n. 3, p. 260-269, jun. 1998.

KROHN, T. C.; HANSEN, A. K.; DRAGSTED, N. The impact of cage ventilation on rats housed in IVC systems. **Lab. Anim.**, v. 37, n. 2, p. 85-93, abr. 2003.

LEACH, M.; RAJ, M.; MORTON, D. Aversiveness of carbon dioxide. **Lab. Anim.**, v. 39, n. 4, p. 452-453, out. 2005.

LEACH, M. C. et al.. Aversion to gaseous euthanasia agents in rats and mice. **Comp. Med.**, v. 52, n. 3, p. 249-257, jun. 2002. Errata em: **Comp. Med.**, v. 52, n. 6, p. 498-572, dez. 2002.

LEMONICA, I. P. Embriofetotoxicidade. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. Sao Paulo: Atheneu Editora, 2003, p. 91-99.

LEPSCHY, M. et al.. Non-invasive measurement of adrenocortical activity in male and female rats. **Lab. Anim.**, v. 41, n. 3, p. 372-387, jul. 2007.

LIBERATI, T.A.; SANSONE, S.R.; FEUSTON, M. H. Hematology and clinical chemistry values in pregnant Wistar Hannover rats compared with nonmated controls. **Vet. Clin. Pathol.**, v. 33, n. 2, p. 68-73, 2004.

LICHTMAN, A. H. The up-and-down method substantially reduces the number of animals required to determine antinociceptive ED50 values. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods.**, v. 40, n. 2, p. 81-85, ago. 1998.

LILES, J. H.; FLECKNELL, P. A. The use of non-steroidal anti-inflammatory drugs for the relief of pain in laboratory rodents and rabbits. **Lab. Anim.**, v. 26, n. 4, p. 241-255, out.1992.

LILIENBLUM, W. et al. Alternative methods to safety studies in experimental animals: role in the risk assessment of chemicals under the new European Chemicals Legislation (*REACH*). **Arch. Toxicol.**, v. 82, n. 4, p. 211-236, abr. 2008.

LILIENBLUM, W. Alternative methods to animal experiments. What can they afford in the safety testing of chemical substances under *REACH*?. **Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz**, German, v. 51, n. 12, p. 1434-1443, dez. 2008.

LIMA, W. T. Entendimento humano da experimentação animal. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v. 60, n. 2, 2008, p. 26-27. Disponível em:



<[http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S000967252008000200013&lng=en&nrm=iso](http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000967252008000200013&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em 01 de dez. 2013.

LUIJTEN, M. et al. Transcriptomics analysis of retinoic acid embryotoxicity in rat postimplantation whole embryo culture. **Reprod. Toxicol.**, v. 30, n. 2, p. 333-340, set. 2010.

LUNA, S. P. L. Dor, senciência e bem-estar em animais. Senciência e Dor. **Suplemento Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 11, p. 17-21, abr. 2008.

LYST, S. J. et al. Effects of increased spatial complexity on behavioural development and task performance in Lister Hooded rats. **PLoS One**, v. 7, n. 10, out. 2012. <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0047640#pone-0047640-g008>> Acesso em 30 de out. de 2013.

MAHL, A. et al.. Comparison of clinical pathology parameters with two different blood sampling techniques in rats: retrobulbar plexus versus sublingual vein. **Lab. Anim.** v. 34, n. 4, p. 351-361, out. 2000.

MALAKOFF, D. Animal welfare. Research groups win delay in rules. **Science**, v. 290, n. 5490, p. 243-245, out. 2000.

MANSER, C.E.; MORRIS, T. H.; BROOM, D. M. An investigation into the effects of solid or grid cage flooring on the welfare of laboratory rats. **Lab. Anim.**, v. 29, n. 4, p. 353-363, out. 1995.

MATSUURA, T. et al.. Estimation of restraint stress in rats using salivary amylase activity. **J. Physiol. Sci.**, v. 62, n. 5, p. 421-427, set. 2012.

MERING, S.; KALISTE-KORHONEN, E.; NEVALAINEN, T. Estimates of appropriate number of rats: interaction with housing environment. **Lab. Anim.**, v. 35, v. 1, p. 80-90, jan. 2001.

MEZZACAPPA, E. S. Breastfeeding and maternal stress response and health. **Nutr. Rev.**, v. 62, n. 7, parte 1, p. 261-269, jul. 2004.

MIYAMOTO, T. et al.. Use of soft hydrothermal processing to improve and recycle bedding for laboratory animals. **Lab. Anim.**, v. 42, n. 4, p. 442-452, out. 2008.

MIZIARA, I. D. et al. Research ethics in animal models. **Braz. J. Otorhinolaryngol.**, v. 78, n. 2, p. 128-131, abr. 2012.

MOJA, L. et al. Flaws in animal studies exploring statins and impact on meta-analysis. **Eur. J. Clin. Invest.** , Ann Arbor v. 44 n. 6 , p. 597-61, jun. 2014.

MOLINA-HERNÁNDEZ, M.; TÉLLEZ-ALCÁNTARA, N. P. Rats socially-reared and full fed learned an autoshaping task, showing less levels of fear-like behaviour than fasted or singly-reared rats. **Lab Anim.**, v. 38, n. 3, p. 236-245, jul. 2004.

MORALES, Marcelo M.. Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade?. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v. 60, n. 2, 2008 .

MOREIRA, V. B. **Eficiência reprodutiva de camundongos endogâmicos balb/C em diferentes idades de acasalamento, com ou sem enriquecimento ambiental.** 2011. 42 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista Júlio De Mesquita Filho, Botucatu, 2011.

MORIN, E. **Ciência com consciência.** Portugal: Publicações Europa América, 1994.

MORTON, D. B. A systematic approach for establishing humane endpoints. **ILAR J.**, v. 41, n. 2, p. 80-86, 2000.

MUELLER, S. O.; TUSCHL, G.; KLING, M. Alternatives in pharmaceutical toxicology: global and focussed approaches--two case studies. **ALTEX**, v. 24, n. 2, p. 117-124, 2007.

NEMZEK, J. A. et al. Humane endpoints in shock research. **Shock.**, v. 21, n. 1, p. 17-25, jan. 2004.

NETO, J. J. C. **O sistema brasileiro de revisão ética de uso animal: um estudo exploratório sobre a estrutura e funcionamento.** 2012. 75 f. Dissertação. (Mestrado Acadêmico em Bioética) - Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

NICKLAS, W. International harmonization of health monitoring. **ILAR J.**, v. 49, n. 3, p. 338-346, 2008.

NOWLAND, M. H; HUGUNIN, K. M.; ROGERS, K. L. Effects of short-term fasting in male Sprague-Dawley rats. **Comp. Med.**, v. 61, n. 2, p. 138-144, abr. 2011.

ODENWELLER, C. M. et al. Laboratory exercise using "virtual rats" to teach endocrine physiology. **Am. J. Physiol.**, v. 273, n. 6, parte 3, p. 24-40, dez. 1997.

OLFERT, E. D.; GODSON, D. L. Humane endpoints for infectious disease animal models. **ILAR J.**, v. 41, n. 2, p. 99-104, 2000.

OLSSON, I. A., HANSEN, A. K.; SANDØE, P. Animal welfare and the refinement of neuroscience research methods--a case study of Huntington's disease models. **Lab. Anim.**, v. 42, n. 3, p. 277-283, jul. 2008.

OSMAN, A. M. et al. Proteome profiling of mouse embryonic stem cells to define markers for cell differentiation and embryotoxicity. **Reprod. Toxicol.**, v. 30, n. 2, p. 322-332, set. 2010.

OSORIO-DE-CASTRO, C. G. S.; PAUMGARTTEN, F. J. R.; SILVER, L. D. O uso de medicamentos na gravidez. **Ciênc. saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 4, dez. 2004 .

PAIXÃO R. L.; SCHRAMM, F. R. **Experimentação animal**: razões e emoções para uma ética. Niterói: EdUFF, 2008.

PATTERSON-KANE, E. G.; HARPER, D. N.; HUNT, M. The cage preferences of laboratory rats. **Lab. Anim.**, v. 35, n. 1, p. 74-79, jan. 2001.

PAZOS, P. et al. The test chemical selection procedure of the European Centre for the Validation of Alternative Methods for the EU Project ReProTect. **Reprod. Toxicol.**, v. 30, n. 1, p. 161-199, ago. 2010.

PELLIZZER, C.; BREMER, S.; HARTUNG, T. Developmental toxicity testing from animal towards embryonic stem cells. **ALTEX**. v. 22, n. 2, p. 47-57, 2005.

PIERSMA, A. H. et al. Evaluation of an alternative *in vitro* test battery for detecting reproductive toxicants. **Reprod. Toxicol.**, v. 38, p. 53-64, jul. 2013.

PIERSMA, A. H. Validation of alternative methods for developmental toxicity testing. **Toxicol. Lett.**, V. 149, n 1-3, p. 147-153, abr. 2004.

POLITI, F. A. S. et al. Caracterização de biotérios, legislação e padrões de biossegurança. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, São Paulo, v. 29, n.1, p. 17-28, 2008.

POMPEO, D. A.; ROSSI, L. A.; GALVÃO, C. M. Revisão integrativa: etapa inicial do processo de validação de diagnóstico de enfermagem. *Acta Paulista de Enfermagem* 2009; 22434-438. Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=307023838014>. Acesso em 4 dez. 2014.

RALDÚA, D.; THIENPONT, B.; BABIN, P. J. Zebrafish eleutheroembryos as an alternative system for screening chemicals disrupting the mammalian thyroid gland morphogenesis and function. **Reprod. Toxicol.**, v. 33, n. 2, p. 188-197, abr. 2012.

RAMSDEN, E. Model organisms and model environments: a rodent laboratory in science, medicine and society. **Med. Hist.**, v. 53, n. 3, p. 365-368, jul. 2011.

RANG, H. P. et al. Efeitos nocivos dos fármacos. In: \_\_\_\_\_. *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p.751-764.

RAPPOLEE, D. A. et al. Toxic stress prioritizes and imbalances stem cell differentiation: implications for new biomarkers and *in vitro* toxicology tests. **Syst. Biol. Reprod. Med.**, v. 58, n. 1, p. 33-40, fev. 2012.

RAS, T. et al.. Rats' preferences for corn versus wood-based bedding and nesting materials. **Lab. Anim.**, v. 36, n. 4, p. 420- 425, out. 2002.

REDFERN, B. G.; DAVID, W. L.; SPENCE, S. An alternative Alcian Blue dye variant for the evaluation of fetal cartilage. **Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.**, v. 80, n. 3, p. 171-176, jun. 2007.

REUTER, U. et al. Evaluation of *OECD* screening tests 421 (reproduction/developmental toxicity screening test) and 422 (combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test). **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 38, n. 1, p. 17-26, ago. 2003.

RISPIN, A. et al. Alternative methods for the median lethal dose (LD(50)) test: the up-and-down procedure for acute oral toxicity. **ILAR J.**, v. 43, n. 4, p. 233- 234, 2002.

ROLLIN, B. E. **An Introduction to Veterinary Medical Ethics: Theory and Cases.** Iowa: University Press, 1999.

ROVIDA, C.; HARTUNG, T. Re-evaluation of animal numbers and costs for *in vivo* tests to accomplish *REACH* legislation requirements for chemicals - a report by the transatlantic think tank for toxicology (t(4)). **ALTEX**, v. 26, n. 3, p. 187-208, 2009.

ROWLAND, N. E. Food or fluid restriction in common laboratory animals: balancing welfare considerations with scientific inquiry. **Comp. Med.**, v. 57, n. 2, p. 149-160, abr. 2007.

RUSSEL. W. M. S.; BURCH, R. L. **The principles of humane experimental technique.** England: Universities Federation for Animal Welfare, 1992.

SAGHIR, S. A. et al. Assessment of diurnal systemic dose of agrochemicals in regulatory toxicity testing--an integrated approach without additional animal use. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 63, n. 2, p. 321-332, jul. 2012.

SALINAS, P. et al. Reflexiones acerca de células troncales obtenidas mediante la utilización de embriones humanos / Reflections about stem cells obtained by means of the utilization of human embryos. **Rev. Chil. Obstet. Ginecol.**, v. 70, n. 4, p. 264-271, 2005.

SANTOS, C. E. M. **Toxicologia *in silico*: fundamentos e aplicações.** São Paulo: Plêiade, 2013.

SÃO PAULO. Lei Estadual n<sup>o</sup> 15.316, de 23 de janeiro de 2014. Proíbe a utilização de animais para desenvolvimento, experimento e teste de produtos cosméticos e de higiene pessoal, perfumes e seus componentes e dá outras providências. **Diário Oficial do Estado**, São Paulo, SP, 24 de jan.2014. Seção 1, p. 1.

SASS, N. Humane endpoints and acute toxicity testing. **ILAR J.**, v. 41, n. 2, p. 114-123, 2000.

SAUER, M. B. et al. Clinical pathology laboratory values of rats housed in wire-bottom cages compared with those of rats housed in solid-bottom cages. **J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.**, v. 45, n. 1, p. 30-35, jan. 2006.

SAUER, U. G.; KOLAR, R.; RUSCHE, B. The use of transgenic animals in biomedical research in Germany. Part 1: Status Report 2001-2003. **ALTEX**, German, v. 22, n. 4, p. 233- 257, 2005.

SAUER, U. G.; SPIELMANN, H.; RUSCHE, B. Fourth EU report on the statistics on the number of animals used for scientific purposes in 2002 -- trends, problems, conclusions. **ALTEX**, v. 22, n. 2, p. 59-67, 2005.

SAVITZ, D. A. Is statistical significance testing useful in interpreting data? **Reprod. Toxicol.**, v. 7, n. 2, p. 95-100, 1993.

SCHENK, B. et al. The ReProTect Feasibility Study, a novel comprehensive *in vitro* approach to detect reproductive toxicants. **Reprod. Toxicol.**, v. 30, n. 1, p. 200-218, ago. 2010.

SCHLUESENER, J. K.; SCHLUESENER, H. J. Nanosilver: application and novel aspects of toxicology. **Arch. Toxicol.**, v. 87, n. 4, p. 569-576, abr. 2013.

SCHOLZ, G. et al. Embryotoxicity screening using embryonic stem cells *in vitro*: correlation to *in vivo* teratogenicity. **Cells Tissues Organs.**, v. 165, n. 3-4, p. 203-211, 1999.

SCHULZ, F. et al. Sensitivity of different generations and developmental stages in studies on reproductive toxicity. **Toxicol. Lett.**, v. 226, n. 2, p. 245-255, abr. 2014.

SCHWETZ, B.; GAYLOR, D. Alternative tests: carcinogenesis as an example. **Environ Health Perspect.**, v. 106, suplemento 2, p. 467-471, abr. 1998.

SEILER, A. et al. Improvement of an *in vitro* stem cell assay for developmental toxicity: the use of molecular endpoints in the embryonic stem cell test. **Reprod. Toxicol.**, v. 18, n. 2, p. 231-240, mar./abr. 2004.

SELDERSLAGHS, I. W.; BLUST, R.; WITTERS, H. E. Feasibility study of the zebrafish assay as an alternative method to screen for developmental toxicity and

embryotoxicity using a training set of 27 compounds. **Reprod. Toxicol.**, v. 33, n. 2, p. 142-152, abr. 2012.

SELDERSLAGHS, I. W. et al. Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. **Reprod. Toxicol.**, v. 28, n. 3, p. 308- 320, nov. 2009.

SHOIEB, A. et al. Peritoneal sarcomatosis associated with telemetry implants in Sprague Dawley CD rats: a review of eight cases. **Toxicol. Pathol.**, v. 40, n. 1, p. 113-121, nov. 2011.

SIMPSON, J.; KELLY, J. P. The impact of environmental enrichment in laboratory rats - behavioural and neurochemical aspects. **Behav. Brain Res.**, v. 222, n. 1, p. 246-264, set. 2011.

SMITH, A. L.; CORROW, D. J. Modifications to husbandry and housing conditions of laboratory rodents for improved well-being. **ILAR J.**, v. 46, n. 2, p. 140-147, 2005.

SMITH, W. HARRAP, S. B. Behavioural and cardiovascular responses of rats to euthanasia using carbon dioxide gas. **Lab. Anim.**, v. 31, n. 4, p. 337-346, out. 1997.

SØRENSEN, D. et al. Preferences for limited versus no contact in SD rats. **Lab. Anim.** v. 44, n. 3, p. 274-277, jul. 2010.

SOROCABA. Lei nº 10.748, 6 de mar.2014. Dispõe sobre normas regulamentadoras para estabelecimentos que utilizam animais para práticas experimentais com finalidades pedagógicas, industriais, comerciais ou de pesquisa científica, e dá outras providências. **Documento Oficial do Município**, Sorocaba, SP. Disponível em:  
<<http://www.camarasorocaba.sp.gov.br/sitecamara/proposituras/verpropositura>>. Acesso em 5 de dez.2014.

SOROCABA. Projeto de Lei nº 441 da Câmara Municipal de Sorocaba, de 2013. Dispõe sobre normas regulamentadoras para estabelecimentos que utilizam animais para práticas experimentais com finalidades pedagógicas, industriais, comerciais ou de pesquisa científica, e dá outras providências. Disponível em:  
<[http://201.72.96.227:8080/sapl\\_site/sapl\\_skin/consultas/materia/materia\\_mostrar\\_p roc?cod\\_materia=11272](http://201.72.96.227:8080/sapl_site/sapl_skin/consultas/materia/materia_mostrar_p roc?cod_materia=11272)>. Acesso em 5 de dez.2014.

SPANGENBERG, E. M. et al. Housing-related activity in rats: effects on body weight, urinary corticosterone levels, muscle properties and performance. **Lab. Anim.**, v. 39, n. 1, p. 45-57, jan. 2005.

SPENCE, S. The Dutch-Belted rabbit: an alternative breed for developmental toxicity testing. **Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.**, v. 68, n. 5, p. 439-448, out. 2003.

SPIELMANN, H. Reproduction and development. **Environ Health Perspect.**, v. 106, suplemento 2, p. 571-576, abr. 1998.

STUB, C. et al. Fluctuating asymmetry in mice and rats: evaluation of the method. **Lab. Anim.**, v. 36, n. 2, p. 193-199, abr. 2002.

SVENDSEN, O. Ethics and animal welfare related to *in vivo* pharmacology and toxicology in laboratory animals. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 97, n. 4, p. 197-199, out. 2005.

SWIERENGA, S. H. et al. Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories: I. Unscheduled DNA synthesis assay in rat hepatocyte cultures. **Mutat. Res.**, v. 246, n. 2, p. 235-253, fev. 1991.

TABATA, H.; KITAMURA, T.; NAGAMATSU, N. Comparison of effects of restraint, cage transportation, anaesthesia and repeated bleeding on plasma glucose levels between mice and rats. **Lab. Anim.**, v. 32, n. 2, p. 143-148, abr. 1998.

TEIXEIRA, M. A. et al. Effects of an individually ventilated cage system on the airway integrity of rats (*Rattus norvegicus*) in a laboratory in Brazil. **Lab. Anim.**, v. 40, n. 4, p. 419-431, out. 2006.

TENNANT, R. W. Evaluation and validation issues in the development of transgenic mouse carcinogenicity bioassays. **Environ Health Perspect.**, v. 106, suplemento 2, p. 473-476, abr. 1998.

THOMSON, J. et al. Not a walk in the park: the *ECVAM* whole embryo culture model challenged with pharmaceuticals and attempted improvements with random forest design. **Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.**, v. 92, n. 2, p. 111-121, abr. 2011.

TRULL, F. L.; RICH, B. A. Animal research regulation at the crossroads. **Acad. Med.**, v. 76, n. 2, p. 110-111, fev. 2001.

TURNER, P. V. et al. Oral gavage in rats: animal welfare evaluation. **J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.**, v. 51, n. 1, p. 25-30, jan. 2012.

UCHIDA, Y. et al. Tail position affects the body temperature of rats during cold exposure in a low-energy state. **J. Comp. Physiol. A. Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol.**, v. 198, n. 2, p. 89-95, fev. 2012.

UEHARA, M. et al.. DNA microarray analysis of "transcriptional responses of rats housed on solid and grid cage flooring. J transcriptional responses of rats housed on solid and grid cage flooring. **J. Toxicol. Sci.**, v. 37, n. 1, p. 219-222, fev. 2012.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Papel da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Disponível em:

<[http://www3.fmvz.usp.br/index.php/site/a\\_fmvz/estrutura\\_administrativa/assistencia\\_academica/comissao\\_de\\_etica\\_no\\_uso\\_de\\_animais\\_da\\_fmvz\\_usp](http://www3.fmvz.usp.br/index.php/site/a_fmvz/estrutura_administrativa/assistencia_academica/comissao_de_etica_no_uso_de_animais_da_fmvz_usp)>. Acesso em 07 jan. 2014.

VAN DARTEL, D. A.; PIERSMA, A. H. The embryonic stem cell test combined with toxicogenomics as an alternative testing model for the assessment of developmental toxicity. **Reprod. Toxicol.** v. 32, n 2, p. 235-244, set. 2011.

VAN DEN BULCK, K. et al. Zebrafish developmental toxicity assay: A fishy solution to reproductive toxicity screening, or just a red herring? **Reprod. Toxicol.**, v. 32, n. 2, p. 213-219, set. 2011.

VAN DER BURG, B. et al. Optimization and prevalidation of the *in vitro* ERalpha CALUX method to test estrogenic and antiestrogenic activity of compounds. **Reprod. Toxicol.**, v. 30, n. 1, p. 73-80, ago. 2010.

VAN DER HARST, J. E.; BAARS, A. M.; SPRUIJT, B. M. Standard housed rats are more sensitive to rewards than enriched housed rats as reflected by their anticipatory behaviour. **Behav. Brain Res.**, v. 142, n. 1-2, p. 151-156, jun. 2003.

VAN DRIEL, K. S.; TALLING, J. C. Familiarity increases consistency in animal tests. **Behav. Brain Res.**, v. 159, n. 2, p. 243-245, abr. 2005.

VAN WOUDEBERG, A. B. et al. The bovine oocyte *in vitro* maturation model: a potential tool for reproductive toxicology screening. **Reprod. Toxicol.**, v. 34, n. 2 , p. 251-260, set. 2012.

VOIPIO, H.M. et al.. Role of cage material, working style and hearing sensitivity in perception of animal care noise. **Lab. Anim.**, v. 40, n. 4, p. 400-409, out. 2006.

WATANABE, M.; FONSECA, C. D.; VATTIMO, M. F. F. Aspectos instrumentais e éticos da pesquisa experimental com modelos animais. **Rev. Esc. Enferm. USP**, São Paulo, v. 48, n. 1, p. 181-188, fev. 2014.

WITTERS, H. et al. The assessment of estrogenic or anti-estrogenic activity of chemicals by the human stably transfected estrogen sensitive MELN cell line: results of test performance and transferability. **Reprod. Toxicol.**, v. 30, n. 1, p. 60-72, ago. 2010.

WONG, D.; MAKOWSKA, I. J.; WEARY, D. M. Rat aversion to isoflurane versus carbon dioxide. **Biol. Lett.**, v. 9, n. 1 dez. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2012.1000>> Acesso em: 04. Mar. 2013.



WOOD, R. W. Aversiveness of carbon dioxide. **Lab. Anim.**, v. 39, n. 3, p. 353-354, jul. 2005.

WORKMAN, P. et al. UKCCCR guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia. **Lab. Anim.**, v. 22, n. 3, p. 195-201, jul. 1988.

YANO, H.; NAGAO, N. Decline in maximal oxygen uptake on work performance in rats during the developmental phase. **Jpn J. Physiol.**, v. 45, n. 5, p. 889-893, 1995.