



Comissão
Europeia

Prestação de cuidados a animais na perspetiva de uma ciência melhor

DIRETIVA 2010/63/UE
RELATIVA À PROTEÇÃO DOS ANIMAIS
UTILIZADOS PARA FINS CIENTÍFICOS



**QUADRO DE AVALIAÇÃO
DA SEVERIDADE**

A Comissão Europeia, ou qualquer pessoa agindo em seu nome, não pode ser responsabilizada pela utilização que possa ser dada às informações abaixo apresentadas.

Luxemburgo: Serviço das Publicações da União Europeia, 2018

© União Europeia, 2018

Reutilização autorizada mediante indicação da fonte.

A política de reutilização de documentos da Comissão Europeia é regulamentada pela Decisão 2011/833/UE (JO L 330 de 14.12.2011, p. 39).

É necessário obter autorização junto dos detentores dos direitos de autor para a utilização ou reprodução de fotografias ou outro material que não esteja protegido pelos direitos de autor da UE.

Print ISBN 978-92-79-80565-3 doi:10.2779/06721 KH-01-18-213-PT-C

PDF ISBN 978-92-79-80579-0 doi:10.2779/729403 KH-01-18-213-PT-N

Índice:

Documento de trabalho sobre um quadro de avaliação da severidade 1-21

Exemplos que ilustram o processo de classificação da severidade, de avaliação 23-92
quotidiana e de avaliação da severidade efetiva

Autoridades nacionais competentes para a aplicação da Diretiva 2010/63/UE relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos

Documento de trabalho sobre um quadro de avaliação da severidade

Bruxelas, 11-12 de julho de 2012

A Comissão criou um grupo de trabalho de peritos (GTP) para a avaliação da severidade dos procedimentos, destinado a facilitar a aplicação da Diretiva 2010/63/UE relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos. Todos os Estados-Membros e as principais organizações de partes interessadas foram convidados a nomear peritos para participar no trabalho.

O GTP para a avaliação da severidade reuniu duas vezes: em dezembro de 2011, com o foco nos animais geneticamente modificados, e em maio de 2012, para um debate sobre um quadro geral para avaliação da severidade efetiva experienciada pelos animais durante os procedimentos.

O presente documento resulta do trabalho das duas reuniões do GTP, das discussões com os Estados-Membros e de esclarecimentos jurídicos da Comissão no que respeita ao quadro para a avaliação da severidade, aos seus componentes, participantes e instrumentos e métodos de trabalho. Foi aprovado pelas autoridades nacionais competentes para a aplicação da Diretiva 2010/63/UE na sua reunião de 11-12 de julho de 2012.

Declaração de exoneração de responsabilidade:

O texto que se segue visa orientar os Estados-Membros e outras partes afetadas pela presente diretiva para chegarem a um consenso sobre as disposições contidas na diretiva. Todos os comentários devem ser considerados no contexto da Diretiva 2010/63/UE relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos.

Apenas o Tribunal de Justiça da União Europeia tem o direito de interpretar o direito da UE com autoridade juridicamente vinculativa.

Índice:

Artigos pertinentes da Diretiva 2010/63/UE.....	3
Contexto geral.....	3
Considerações gerais para uma avaliação da severidade.....	4
Considerações pré-estudo	6
Indicadores de severidade	6
<i>Categorias de alto nível</i>	7
<i>Fatores que devem ser considerados na avaliação da severidade efetiva</i>	8
Como garantir consistência na avaliação e na atribuição da severidade efetiva.....	10
<i>Desenvolvimento de uma ficha de avaliação específica de procedimento</i>	11
<i>Consistência na avaliação da severidade efetiva</i>	11
Quem deve dar contributos para a avaliação da severidade efetiva?.....	13
Ferramentas e meios de monitorização e outras considerações.....	13
Apêndice I - Glossário de observações clínicas.....	15
Apêndice II - Leituras de apoio, orientações e recursos <i>online</i> para a avaliação do bem-estar dos animais sujeitos a procedimentos científicos	18

Artigos pertinentes da Diretiva 2010/63/UE

- **Artigo 4.º, n.º 3** «Os Estados-Membros asseguram o refinamento da criação animal, do alojamento e dos cuidados a prestar aos animais, bem como dos métodos utilizados nos procedimentos, a fim de eliminar ou de reduzir ao mínimo qualquer possibilidade de dor, sofrimento, angústia ou dano duradouro infligidos aos animais.»
- **Artigo 15.º, n.º 1** «Os Estados-Membros asseguram que todos os procedimentos sejam classificados como de «não recuperação», «ligeiro», «moderado» ou «severo», caso a caso, utilizando os critérios de atribuição que constam do anexo VIII.»
- **Artigo 16.º, n.º 1, alínea d)** «O novo procedimento está de acordo com o parecer veterinário, tendo em conta a totalidade da vida do animal.»
- **Artigo 54.º, n.º 2** «Os Estados-Membros recolhem e tornam públicos, anualmente, dados estatísticos sobre a utilização de animais em procedimentos, incluindo informações sobre a severidade efetiva dos procedimentos e sobre a origem e as espécies de primatas não humanos utilizados em procedimentos. ...»

Contexto geral

A Diretiva 2010/63/UE relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos exige que seja realizada uma avaliação prospetiva da severidade de cada procedimento de um Projeto (artigo 15.º), sendo-lhes atribuída uma classificação de severidade, que pode ser «não recuperação», «ligeiro», «moderado» ou «severo». O Anexo VIII fornece orientações sobre os fatores a ter em conta aquando da consideração da severidade prospetiva e apresenta alguns exemplos em cada categoria de severidade.

O artigo 54.º sobre a comunicação de informações exige que sejam transmitidos dados estatísticos sobre a severidade efetiva da dor, do sofrimento, da angústia ou do dano duradouro experienciados pelos animais (em contraste com a avaliação prospetiva, ou previsão, da severidade efetuada no momento da avaliação do projeto). Além disso, a severidade efetiva de quaisquer procedimentos anteriores é fundamental para determinar se um animal pode ou não ser reutilizado em novos procedimentos (artigo 16.º).

Estas medidas proporcionam oportunidades para melhorar a qualidade da ciência e do bem-estar através de uma revisão prospetiva das propostas de projetos e, com a inclusão do sofrimento efetivo experienciado pelo animal, deverão proporcionar uma maior transparência e compreensão do impacto dos procedimentos científicos no bem-estar dos animais.

Alguns dos principais benefícios da avaliação prospetiva, da monitorização, da avaliação e do registo da severidade real são os seguintes:

- Oportunidades para aplicar o Refinamento e reduzir o sofrimento, apesar de os debates sobre a avaliação prospetiva serem, também, geralmente, uma oportunidade para considerar se a utilização do animal é, ou não, necessária (Replacemnet/Substituição) e se a conceção do estudo é apropriada para minimizar a utilização de animais (Redução);

- Reforço do bem-estar dos animais, por exemplo, se o sofrimento é detetado e aliviado mais cedo;
- Aumento da transparência, uma vez que as estatísticas devem refletir melhor os custos efetivos para o bem-estar dos animais;
- Melhoria da comunicação entre os responsáveis pela utilização, pela prestação de cuidados e pela monitorização dos animais;
- Contribuição para a avaliação retrospectiva do projeto, quando esta é realizada (artigo 39.º);
- Melhoria da qualidade dos dados científicos resultante de um melhor bem-estar;
- Aumento do conhecimento sobre a avaliação da severidade e dos sinais clínicos, que promoverá uma maior consistência nas avaliações – desde que as abordagens e os resultados sejam divulgados, por exemplo através de revistas científicas, grupos de discussão e reuniões;
- Contribuição para cursos de formação para investigadores, técnicos de experimentação animal e veterinários de animais de laboratório, se os resultados forem utilizados para fornecer exemplos;
- Informações baseadas em provas que podem ser utilizadas em avaliações prospetivas dos danos e benefícios para futuros projetos semelhantes.

Considerações gerais para uma avaliação da severidade

A consideração da severidade num procedimento deve ser um **processo contínuo**, começando com a conceção inicial do estudo, passando pela monitorização diária específica do estudo dos animais durante o projeto, até à avaliação da severidade «efetiva» após a conclusão do estudo, proporcionando oportunidades para identificar novos refinamentos para estudos futuros.

fichas de avaliação diária,

AVALIAÇÃO DA SEVERIDADE – UM PROCESSO CONTÍNUO



Ao utilizar esta abordagem, há uma maior oportunidade para garantir que os três Rs (*replacement, reduction and refinement* – substituição, redução e refinamento) sejam considerados e aplicados em todo o estudo, que seja melhorada a comunicação entre todos os envolvidos e que seja reforçada a consistência.

A avaliação da severidade efetiva exige

- **Uma abordagem de «equipa»**, com contributos de pessoas com especialidades, experiência e prioridades diferentes, por exemplo investigadores, técnicos de experimentação animal, tratadores e o veterinário responsável;
- Bom planeamento;
- Educação e formação contínuas e adequadas de todo o pessoal envolvido;
- Sistemas de avaliação diária da severidade adaptados às espécies, às estirpes e ao projeto, incluindo observações informadas e estruturadas dos animais em intervalos adequados (por exemplo, aumento da frequência durante e após os procedimentos);
- Protocolos bem informados e eficazes para avaliação do comportamento e dos sinais clínicos;
- Análise das observações para fazer um julgamento informado sobre a natureza e o nível de sofrimento;
- Consciência da severidade de cada procedimento e de qual a medida a tomar se esta for alcançada ou excedida;

- Uma abordagem consistente da avaliação global do sofrimento efetivo (ligeiro, moderado, severo) para a comunicação de dados estatísticos;
- Reflexão sobre o grau de eficácia da aplicação dos três R e se poderão ser realizadas melhorias em estudos futuros.

Considerações pré-estudo

O processo que visa assegurar a minimização da severidade durante os procedimentos científicos tem início na **fase de concepção**, ao considerar se é ou não necessária, e se se justifica, a utilização de animais vivos para cumprir os objetivos científicos.

- Quando a utilização de animais vivos é necessária e se justifica, é importante assegurar que é escolhido um modelo adequado e que a concepção do estudo é sólida;
- Todos os aspetos do estudo que possam causar dor, sofrimento, angústia ou dano duradouro devem ser identificados, devendo pensar-se numa forma de minimizar os seus efeitos, por exemplo através de pesquisa bibliográfica ou consultando colegas, os técnicos de experimentação animal, o veterinário e o órgão responsável pelo bem-estar animal, se adequado;
- A classificação prospetiva da severidade recomendada atribuída aos procedimentos deve basear-se no maior grau de severidade previsto para qualquer animal do estudo;
- Deve desenvolver-se um plano de observação dos animais que seja adequado e adaptado ao estudo. Uma terminologia normalizada que possa ser compreendida por todos os envolvidos no estudo melhorará a consistência da comunicação de informações e da interpretação;
- É importante assegurar que exista pessoal em número suficiente com formação e competente para realizar o estudo, bem como para monitorizar e cuidar dos animais.

Indicadores de severidade

Existem comportamentos e sinais clínicos que podem ser utilizados para avaliar a severidade dos procedimentos durante o período de cativeiro (na jaula, tanque, gaiola, etc.). A terminologia utilizada para os descrever deve ser compreensível por todos os envolvidos na utilização, monitorização e prestação de cuidados dos animais. Para qualquer sistema de avaliação da severidade, é essencial existir uma compreensão sólida sobre a saúde, o comportamento e o estado de bem-estar normal da espécie (estirpe, quando aplicável) a observar.

Deverá ter-se por objetivo:

- alcançar a melhor qualidade de vida possível para o animal;
- garantir que qualquer sofrimento resultante dos procedimentos científicos seja detetado e
- minimizado, mas

mantendo-se consistente com os objetivos científicos.

Qualquer sistema de avaliação deve detetar eficazmente desvios de um estado normal de saúde e bem-estar, permitindo ao observador registar e transmitir uma avaliação clara e consistente de cada animal.

Pode utilizar-se uma abordagem simples e hierárquica para definir um protocolo de avaliação de severidade que seja devidamente adaptado à espécie, estirpe, indivíduo e procedimento. O processo para definir um protocolo de avaliação durante o período de cativeiro deverá identificar quaisquer efeitos adversos que possam ocorrer ao longo da experiência de vida do animal, incluindo alojamento, manejo, prestação de cuidados e manuseamento, assim como efeitos adversos resultantes dos procedimentos científicos e respetivas consequências. A análise de todos estes efeitos adversos deverá identificar indicadores que possam ser utilizados para avaliar eficazmente o bem-estar do animal durante o período de cativeiro. Estes indicadores devem ser adaptados à espécie, à estirpe e aos procedimentos experimentais utilizados. Devem, além disso, ser fáceis de compreender, de identificar e de registar consistentemente. No entanto, é importante garantir que seja fácil recolher e registar, por exemplo sob a forma de texto livre, quaisquer efeitos adversos inesperados.

Categorias de alto nível

A seguir é apresentado um conjunto de categorias globais, de «alto nível», aplicáveis a todas as espécies, como ponto de partida para a produção de uma lista abrangente de indicadores específicos para cada procedimento ou programa de prestação de cuidados aos animais. O objetivo é produzir uma lista, específica para o estudo, de indicadores suficientes com vista a minimizar o risco de ignorar determinados sinais de sofrimento, sem a necessidade de criar um sistema demasiado complexo que seja desnecessariamente burocrático e moroso.

As categorias de alto nível são:

- Aspeto
- Funções fisiológicas
- Meio ambiente
- Comportamentos
- Indicadores específicos dos procedimentos
- Observações livres (outras observações relevantes)

Os indicadores de cada uma destas categorias podem ser adaptados a qualquer espécie. Devem ser utilizados para produzir uma lista de características observáveis que possa ser avaliada por um indivíduo com formação adequada para fazer uma avaliação do estado geral de saúde e de bem-estar do animal.

Estes indicadores devem ser discutidos e selecionados em conjunto com a(s) pessoa(s) responsáveis pela supervisão do bem-estar dos animais e, se adequado, com o órgão responsável pelo bem-estar dos animais. Devem depois ser utilizados para desenvolver sistemas de manutenção de registos específicos para cada estudo, durante o período de cativeiro, para observação, monitorização e avaliação quotidianos.

O Apêndice I apresenta um exemplo da forma como estas categorias de alto nível podem ser subdivididas e utilizadas para desenvolver critérios de observação adequados, utilizando uma terminologia descritiva comum.

O Apêndice II fornece informações sobre orientações e recursos *on line* que podem ajudar a desenvolver avaliações adequadas de bem-estar dos animais sujeitos a procedimentos científicos.

Fatores a considerar na avaliação da severidade efetiva

É importante notar que, consoante a situação específica, existe uma série de elementos que podem ter impacto positivo ou negativo na severidade, e as diferenças entre espécies têm de ser tidas em consideração.

A avaliação da severidade efetiva deve ser efetuada para cada animal, caso a caso, utilizando as observações feitas dos animais durante a monitorização quotidiana. Podem ainda ser utilizados parâmetros adicionais necessários para efeitos do estudo, sempre que adequado e quando disponíveis. Por exemplo, também podem ser necessários para o estudo indicadores não-observáveis (como a temperatura corporal, o peso corporal, os parâmetros bioquímicos ou dados biotelemétricos, como a frequência cardíaca), que devem ser tidos em conta na avaliação da severidade, caso possam fornecer informações adicionais e relevantes.

A severidade efetiva a ser comunicada de cada animal deve ser a correspondente ao nível mais elevado experienciado durante o decurso do procedimento e não a baseada na severidade ocorrida no final do procedimento. A avaliação também não deve ser considerada como um simples processo aditivo (p. ex., uma série de procedimentos ligeiros = severidade moderada) devendo, antes, basear-se numa avaliação global da experiência do animal desde o início até ao fim do procedimento.

A lista que se segue apresenta exemplos do tipo de elementos a serem considerados e ponderados ao fazer-se a avaliação da severidade efetiva.

Procedimento, técnica

- Cirúrgico/não-cirúrgico;
- Nível e duração da contenção;
- Não administração de analgesia/anestesia em situações em que uma ou ambas seriam necessárias;
- Novo modelo ou procedimento;
- Elementos ambientais (incluindo restrições de alojamento ou alimentos/água);
- *Stress*/angústia;
- Procedimentos repetidos e intervalos entre os mesmos (é necessário também considerar a frequência e a combinação de intervenções «abaixo do limiar»);
- Reutilização ou utilização continuada.

Espécie, estirpe, fase do desenvolvimento, experiência prévia

- **Esta deve ser uma das principais considerações – é necessário compreender a biologia e o comportamento da espécie e da estirpe (e por vezes do indivíduo), a fim de se poder prever e avaliar a severidade de forma efetiva;**
- **Espécie e estirpe;**
- Origem do animal, por exemplo criado para fins científicos, assilvestrado ou selvagem;
- Proveniência (incluindo condições anteriores de alojamento) e transporte;
- Genótipo, fenótipo, sexo, idade e estatuto imunológico;
- Comportamento natural e biologia (por exemplo, a importância relativa dos diferentes sentidos, como a visão para os primatas e o olfato para os roedores, bem como a forma como podem ser afetados num ambiente de laboratório);
- Alojamento individual/em grupo – justificação para fazer o alojamento individual de animais sociais ou para afastá-los de grupos estabelecidos, seja a curto ou a longo prazo;
- Ritmos diurnos, por exemplo, o impacto de realizar procedimentos científicos ou de maneio em animais noturnos durante a fase de luz;
- Separação materna em todas as espécies, incluindo roedores;
- Capacidade cognitiva, consciência, memória, percepção dos efeitos dos procedimentos.

Frequência, intensidade

- Não existe uma correlação direta entre frequência e severidade, isto é, uma maior frequência não resulta necessariamente numa maior severidade. Isto deve-se ao facto de o efeito, para a severidade, da repetição de procedimentos ou técnicas depender de uma série de fatores, tais como a intensidade de cada intervenção, a sua duração, a espécie e a experiência do indivíduo;
- Quando as intervenções são repetidas, existe um potencial de aclimatização que pode reduzir a severidade, por exemplo, num primata não humano sujeito a procedimentos ligeiros. Por outro lado, a repetição pode aumentar a severidade, por exemplo, devido à antecipação de um procedimento causador de *stress* ou início de hiperalgesia em caso de cirurgia;
- Potencial para treino de reforço positivo, ou «recompensas» após os procedimentos;
- Deve ser registado o nível de severidade mais elevado e não o «nível de recuperação» de severidade.

Duração do efeito

- A duração está *ligada* à intensidade (*e conseqüentemente à severidade*);
- Possibilidade de utilizar limites críticos humanos ou científicos precoces.

Eficácia dos refinamentos

- Analgesia, anestesia e cuidados pós-operatórios adequados;
- Enriquecimento – tanto enriquecimento ambiental como alojamento em grupo de animais sociais;
- Alojamento, manejo e prestação de cuidados – se é possível refiná-los em conformidade com as melhores práticas atuais ou se o procedimento requer restrições, tais como, confinamento em compartimentos de menores dimensões (por exemplo, gaiolas ou jaulas metabólicas), pavimento de grade ou exposição a condições ambientais passíveis de causar *stress*;
- Treino do animal para cooperar ou promoção da habituação aos procedimentos;
- Eficácia dos protocolos de avaliação durante o período de cativeiro.

Severidade cumulativa

- A experiência de vida de cada animal, na qual as restrições à capacidade de refinar o alojamento, ou a necessidade de captura, manuseamento e contenção frequentes, etc., podem afetar a severidade, tem que ser tida em conta no âmbito de um procedimento que envolva uma série de passos/intervenções;
- Procedimentos anteriores, em caso de reutilização.
- É necessário ter em conta a experiência de vida, incluindo elementos como a proveniência (por exemplo, desmame precoce) e o transporte, quando se considera fazer reutilização.

Como garantir consistência na avaliação e na atribuição de uma categoria de severidade efetiva

Geralmente, é necessária a contribuição, na fase da conceção do estudo, de cientistas relevantes, técnicos de experimentação animal, veterinários e de pessoal que presta cuidados aos animais, a fim de assegurar que existem disponíveis dados apropriados para permitir realizar uma decisão informada sobre a severidade efetiva no final do procedimento. A atribuição final de uma categoria de severidade efetiva será o resultado de uma análise de registos de observações, durante o período de cativeiro, do comportamento, de sinais clínicos e de outros parâmetros relevantes.

Os elementos que contribuem para haver consistência são, entre outros:

- Incorporação de perícia, experiência e prioridades múltiplas – uma «abordagem de equipa»;
- Formação na utilização do protocolo de avaliação quotidiano (incluindo a terminologia comum utilizada para descrever as observações);
- Perícia em saúde, bem-estar e comportamento animal;
- Revisão regular dos resultados;

- Comunicação entre todos os responsáveis pela realização do estudo e pela monitorização dos animais (do topo para a base, da base para o topo, entre si e a nível interno);
- Supervisão (a nível local – por exemplo, o órgão responsável pelo bem-estar dos animais – regional, nacional e da UE).

Os seguintes assuntos-chave devem ser tidas em conta para assegurar consistência na avaliação da severidade efetiva:

Desenvolvimento de uma ficha de avaliação específica para o procedimento

- Devem desenvolver-se fichas de avaliação previamente acordadas antes do início do projeto, e que sejam adaptadas às espécies, às estirpes e ao estudo;
- Todas as informações disponíveis e relevantes devem ser utilizadas efetivamente no desenvolvimento de fichas de avaliação específicas para o estudo, por exemplo experiência prévia, resultados de estudos *in vitro* ou *in silico*, pesquisas bibliográficas, informações provenientes de estudos-piloto e de sinais clínicos observados em humanos ou noutros animais;
- Devem estar disponíveis informações sobre quais os parâmetros que são necessários observar e sobre a forma como a monitorização deve ser realizada durante o período de cativeiro;
- A classificação prospetiva do nível de severidade «ditará», em parte, o nível de envolvimento necessário a nível operacional, se é necessária uma abordagem de equipa durante a monitorização e quem deve ser envolvido nas observações efetivas e no processo de registo. As pessoas que desenvolveram o protocolo de avaliação específico para o estudo devem realizar e/ou confirmar a atribuição final da categoria de severidade efetiva;
- Consoante a complexidade do estudo, poderá ser útil elaborar fichas de avaliação separadas para componentes separados, por exemplo uma ficha-padrão de prestação de cuidados cirúrgicos/peri-operatórios utilizada em combinação com uma avaliação adaptada ao protocolo do estudo;
- Em certos casos, as fichas de avaliação específicas para o estudo poderão também ter de incluir informações relevantes para a gestão da colónia, por exemplo, dados relativos à criação e ao crescimento de animais GA.

Consistência na avaliação da severidade efetiva

A avaliação da severidade efetiva é realizada no final do procedimento e requer que seja feito um julgamento sobre a severidade global efetivamente experienciada pelo animal, com base em avaliações quotidianas e tendo em conta os procedimentos que foram realizados.

- Uma abordagem frequentemente utilizada é definir os níveis «ligeiro», «moderado» e «severo» para cada um dos indicadores utilizados nas

avaliações diárias, fazendo-se depois um julgamento sobre a severidade dos mesmos caso a caso;

- **Tal como acontece com a monitorização quotidiana, é fundamental que os critérios de avaliação efetiva sejam adaptados ao procedimento, à espécie e à estirpe;** por exemplo, uma perda de 10% no peso corporal terá implicações muito diferentes para a saúde e o bem-estar de um rato jovem em crescimento, de um murganho adulto com um tumor de rápido crescimento ou de um cão adulto.
- A consideração sobre o período de tempo durante o qual alguns destes indicadores ocorrem é, também, um fator essencial, particularmente no que diz respeito à perda de peso e ao consumo de alimentos/água.

A avaliação será realizada utilizando os registos da avaliação diária, tendo em conta o procedimento realizado no animal, a duração dos efeitos adversos e se o animal foi ou não reutilizado. Apesar de isto envolver, inevitavelmente, um determinado grau de subjetividade, a formação adequada do observador deve visar a redução da subjetividade.

Atribuição da severidade efetiva caso os animais sejam encontrados mortos

- Se um animal for encontrado morto, isto é, se não tiver sido eutanasiado, tal pode ser consequência do procedimento experimental ou de outras causas não relacionadas¹;
- A severidade efetiva a atribuir aos animais encontrados mortos deve ser comunicada como «severa», salvo se se puder tomar uma decisão informada de que o animal não experienciou sofrimento severo antes de morrer;
- Caso seja pouco provável que a morte tenha sido precedida de sofrimento severo, a classificação da severidade efetiva deve refletir a experiência conhecida antes da morte. Fatores como a frequência da monitorização, a utilização de analgesia, etc., têm de ser tidos devidamente em conta;
- Um «dano (duradouro)» apenas pode ser sentido por um animal vivo.

Devem desenvolver-se e disponibilizar-se à comunidade científica exemplos que ilustrem o processo de classificação da severidade, da avaliação quotidiana e final e da avaliação da severidade efetiva.

¹ Para efeitos de comunicação de dados estatísticos, a severidade efetiva deve estar principalmente relacionada com a severidade dos procedimentos experimentais e não com incidentes não relacionados, tais como, surtos de doenças ou inundação das gaiolas. Estes tipos de incidentes estão relacionados com problemas de saúde ou com práticas de manejo e de prestação de cuidados, e não com danos resultantes dos procedimentos, devendo, contudo, ser registados, investigados e acompanhados a fim de prevenir a sua recorrência.

Quem deve contribuir para a avaliação da severidade efetiva?

- A observação e o registo dos efeitos são, frequentemente, processos separados da atribuição da severidade efetiva;
- Devem ser definidas responsabilidades claras, a fim de garantir a monitorização diária efetiva dos animais, com o apoio e a supervisão adequados;
- Deve dispor-se de um processo de verificação para promover a consistência, isto é, comparando as pontuações das avaliações feitas por pessoas diferentes;
- Os papéis relativos à observação e à monitorização dos animais e à realização das avaliações da severidade efetiva devem ser flexíveis e ajustáveis com base na complexidade e na severidade do estudo em questão – ainda que a responsabilidade legal por assegurar que o sofrimento é detetado e minimizado seja da pessoa indicada na autorização do projeto;
- Os órgãos responsáveis pelo bem-estar dos animais também devem desempenhar um papel, a nível dos estabelecimentos, para assegurar a consistência;
- As comissões nacionais e as autoridades competentes também podem contribuir para promover a consistência.

Ferramentas e meios de monitorização e outras considerações

- A utilização de fichas de pontuação deve ser considerada na fase de planeamento do projeto;
- As fichas de pontuação devem ser tão simples quanto possível, mas tão detalhadas quanto necessário e adaptadas ao tipo de estudo;
- Podem ser utilizadas fichas de avaliação previamente elaboradas, caso sejam adequadas para o estudo, para a espécie e para a estirpe;
- A manutenção de registos eletrónicos pode ajudar a garantir a consistência e facilitar o acesso a todas as informações relevantes;
- Recomenda-se a utilização de linguagem e terminologia normalizadas;
- Os dados registados devem ser tão objetivos quanto possível;
- As vantagens e desvantagens dos sistemas de observação com (i) pontuação numérica e (ii) «binária» (onde os indicadores são marcados como «presente» ou «ausente») devem ser consideradas caso a caso;
- Todos os tipos de registo de observação devem incluir a possibilidade de acrescentar texto livre, assim como indicadores predeterminados, para permitir o registo de observações inesperadas;
- É essencial que a formação eficaz do pessoal relevante abranja especificamente a avaliação da severidade e do bem-estar, assim como técnicas de monitorização;

- Deve ser criado um plano de comunicação que englobe todo o pessoal relevante. Este plano deve incluir um mecanismo que permita a comunicação rápida de resultados inesperados a todos os indivíduos adequados e, se aplicável, à autoridade competente;
- A monitorização deve ser proporcional aos efeitos previstos – procedimentos que possam causar sofrimento «severo» requerem, geralmente, um acompanhamento mais frequente e pormenorizado;
- Devem existir critérios claros para intervenção, por exemplo, se se observarem determinados parâmetros ou em caso de aproximação de um nível de sofrimento predeterminado. Todo o pessoal relevante deve conhecer estes critérios, assim como saber o que fazer e quem contactar caso eles surjam.

Se o processo de avaliação da severidade for eficazmente aplicado, os animais e todo o pessoal envolvido na prestação de cuidados e na sua utilização beneficiarão de um melhor bem-estar animal, bem como, de validade científica e transparência.

A boa comunicação interna e externa sobre o processo de avaliação da severidade e sobre a aplicação dos Três Rs trarão ainda maiores benefícios.

Apêndice I

Glossário de observações clínicas

O êxito de um esquema de avaliação da severidade depende da seleção de indicadores de bem-estar que:

- sejam pronta e fiavelmente reconhecíveis;
- sejam eficazes na realização de boas mensurações do bem-estar;
- sejam relevantes para o estudo científico, para a espécie e para a estirpe (quando adequado);
- sejam práticos de realizar e não perturbem excessivamente o animal; e
- permitam uma mensuração, interpretação e análise consistentes.

Uma abordagem comum para registar observações clínicas é, por conseguinte, um objetivo desejável, uma vez que ajuda a desenvolver abordagens consistentes de classificação da severidade. Desta forma, facilita-se a realização de comparações de descobertas clínicas entre estudos e informam-se os envolvidos na avaliação da severidade.

As observações estão estruturadas nas seguintes seis categorias de alto nível:

Aspeto/ Funções fisiológicas/ Meio ambiente/ Comportamentos/ Indicadores específicos do procedimento/ Observações livres

Categorias de alto nível	Aspetos a considerar aquando da observação dos animais	Indicadores específicos a monitorizar
Aspeto	Condição corporal	Perda/aumento de peso
		Obeso
		Magro
		Pontuação da condição corporal, se disponível

	Estado do pêlo e da pele	Piloereção
		Desgrenhado/sujo
		Pelo gorduroso
		Perda de pelo
		Desidratação – perda de elasticidade da pele
		Lesões cutâneas – inchaço; crostas; úlceras; feridas
		Manchas de urina ou fezes
	Corrimento	Ocular; nasal; urogenital; manchas de porfirina em algumas espécies, por exemplo, nos ratos
	Olhos	Encovados ou «baços»
		Fechados/semicerrados
		Lesões/ferimentos oculares (por exemplo, ulceração da córnea)
	Boca	Salivação
		Maloclusão/sobrecrescimento dentário
Outros	«Expressão de dor» – por exemplo, olhos semicerrados e nariz inchado nos murganhos	
	Constricções abdominais	
	Parte do corpo inchada, por exemplo, abdómen distendido	
Funções corporais	Respiração	Respiração acelerada (taquipneia)
		Respiração rápida e difícil (hiperpneia)
		Grave dificuldade em respirar (dispneia)
		Pieira ou outro som ao respirar
	Ingestão de alimentos/água	Superior/inferior ao normal
	Temperatura corporal	Elevada/baixa; temperatura mensurada, se disponível (por exemplo, através de um microchip ou de um dispositivo de telemetria, termometria com ou sem contacto); cor das extremidades nos roedores
Sentidos	Compromisso da visão, da audição ou do equilíbrio	
Meio ambiente	Meio ambiente do compartimento, incluindo qualquer material de cama,	Presença e consistência das fezes
		Cama molhada, por exemplo devido a poliúria

	materiais de nidificação ou elementos de enriquecimento	Presença de vômito ou sangue Se os animais estão a utilizar os elementos de enriquecimento, por exemplo, os materiais de nidificação ou os blocos para roer
Comportamentos	Interação social	Mudança em relação ao temperamento normal – interações apreensivas/agressivas com outros animais; ansiedade (por exemplo, respostas de fuga marcadas, esconder-se)
		Isolados ou afastados dos outros animais, quando alojados em grupo social
	Comportamentos indesejáveis	Comportamento repetitivo/estereotipado
		Hábito de lamber o pêlo de outros animais (roedores), tricotilomania
		Aumento da agressão contra humanos ou outros animais
	Postura e mobilidade	Postura anormal
		Marcha anormal; claudicação; ausência de movimento/letargia/relutância em mover-se se estimulado
		Movimentos descoordenados
		Abdómen encolhido; cabeça tombada
	Outros	Tremores
Convulsões/espasmos		
Vocalização; espontânea ou invocada. <i>(Nota – algumas espécies, como os roedores, vocalizam normalmente no espectro ultrassónico, pelo que, as vocalizações audíveis são especial motivo de preocupação. As vocalizações dos coelhos são geralmente inaudíveis para os humanos, a menos que o animal esteja em situação de angústia).</i>		
Indicadores específicos do procedimento	São identificados com base no projeto individual, nos possíveis efeitos adversos e nos respetivos indicadores esperados	Por exemplo, num modelo de EAE, poderiam incluir perda de tónus da cauda, fraqueza dos membros posteriores, fraqueza dos membros anteriores, paralisia, perda de função vesical
Observações livres	Um esquema de avaliação da severidade deve incluir sempre um espaço onde anotar quaisquer observações dos impactos negativos inesperados para o bem-estar dos animais.	

Apêndice II

Leituras de apoio, orientações e recursos *online* para a avaliação do bem-estar dos animais sujeitos a procedimentos científicos

American College of Laboratory Animal Medicine (ACLAM) (2006) *Guidelines for the Assessment and Management of Pain in Rodents and Rabbits*, disponível em <http://www.tinyurl.com/65ez5vh>

Assessing the Health and Welfare of Laboratory Animals (AHWLA) – recurso de formação. Ver <http://www.ahwla.org.uk/index.html>

Canadian Council on Animal Care (CCAC) *Avaliação do bem-estar*. Ver <http://www.ccac.ca/> e clicar no micro-sítio «Three Rs», depois pesquisar «welfare assessment» (em inglês ou francês)

Categorising the severity of scientific procedures on animals - Summary and reports from three round-table discussions editado por Jane A. Smith e Maggy Jennings em nome do Boyd Group e da RSPCA, julho de 2004
Publicado pelo RSPCA Research Animals Department

FELASA Working Group on the Reporting of Clinical Signs in Laboratory Animals (2012) – (a publicar)

Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) (2008) *Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals*. Washington, DC: National Academies Press

Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) (2009) *Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals*. Washington, DC: National Academies Press. Ver http://dels.nas.edu/animal_pain/

Johansen R, Needham JR, Colquhoun DJ, et al. (2006) Guidelines for health and welfare monitoring of fish used in research. *Laboratory Animals* **40**: 323-340

Joint Working Group on Refinement (2011) A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals. *Laboratory Animals* **45**: 1-13

Leach MC et al. (2008) Identification of appropriate measures for the assessment of laboratory mouse welfare. *Animal Welfare* **17**: 161-170

National Centre for the Three Rs (NC3Rs) *Welfare assessment*. Ver <http://www.nc3rs.org.uk/welfareassessment>

National Health and Medical Research Council (2008) *Guidelines to Promote the Wellbeing of Animals Used for Scientific Purposes: The Assessment and Alleviation of Pain and Distress in Research Animals*. Canberra: Governo australiano. Ver <http://www.nhmrc.gov.au> e pesquisar «pain and distress»

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (2000). *Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation*. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 19. Paris: OECD

Wells DJ, Playle LC, Enser WEJ, et al. Assessing the welfare of genetically altered mice. Versão completa em <http://www.nc3rs.org.uk/gamice>. Resumo em *Laboratory Animals* **40**: 111-114

Workman P et al. (2010) Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British Journal of Cancer* **102**: 1555-1577, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2883160/?tool=pubmed>

1.2 Sugestões de publicações periódicas para leitura ulterior

<i>Applied Animal Behaviour Science</i>	http://www.applied-ethology.org/applied_animal_behaviour_science.html
<i>Animal Technology and Welfare</i>	http://www.iat.org.uk/publications/atw.htm
<i>Animal Welfare</i>	http://www.ufaw.org.uk/animal.php
<i>Temas contemporâneos em Laboratory Animal Science e Journal of the American Association for Laboratory Animal Science</i>	http://www.aalas.org/publications/index.aspx#ct
<i>Lab Animal e Lab Animal Europe</i>	http://www.labanimal.com/laban/index.html http://www.labanimaleurope.eu/
<i>Laboratory Animals</i>	http://la.rsmjournals.com/

1.3 Sugestões de palavras-chave para pesquisas bibliográficas

As palavras-chave que se seguem são úteis para a pesquisa de informações sobre a avaliação da severidade:

affect (afetar)	harm benefit assessment (avaliação da relação dano-benefício)	positive indicators (indicadores positivos)	severity scale (escala de severidade)
-----------------	--	--	--

animal welfare (bem-estar dos animais)	humane endpoints (limites críticos humanos)	positive welfare (bem-estar positivo)	sickness behavio(u)r (comportamento de doença)
animal suffering (sofrimento dos animais)	Needs (necessidades)	qualitative behavio(u)r assessment (avaliação qualitativa do comportamento)	stress
assessment (avaliação)	objective assessment (avaliação objetiva)	quality of life (qualidade de vida)	suffering (sofrimento)
discomfort (desconforto)	Pain (dor)	refinement (refinamento)	welfare assessment (avaliação do bem-estar)
distress (angústia)	pain assessment (avaliação da dor)	score sheets (fichas de pontuação)	welfare indicator (indicador de bem-estar)
harm assessment (avaliação dos danos)	pain measurement (mensuração da dor)	scoring system (sistema de pontuação)	welfare outcomes (resultados em matéria de bem-estar)

Referências relacionadas com a classificação da severidade efetiva

CCAC (1998) *Guidelines on: Choosing an Appropriate Endpoint in Experiments Using Animals for Research, Teaching and Testing*. Canadian Council on Animal Care, disponível em: http://www.ccac.ca/en/_standards/guidelines (inglês) e http://www.ccac.ca/fr/_normes/lignes_directrices (francês)

FELASA Working Group on Pain and Distress (1994) Pain and distress in laboratory rodents and lagomorphs. *Laboratory Animals* **28**: 97-112

Jones HRP, Oates J e Trussell BA (1999) An applied approach to the assessment of severity. In: Hendriksen CFM. & Morton DB (eds), *Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research*. Proceedings of the International Conference, 22-25 de novembro de 1998, Zeist, Países Baixos. Royal Society for Medicine Press Ltd., Londres p. 40-47

LASA/APC (2008) *Final Report of a LASA/APC Working Group to Examine the Feasibility of Reporting Data on the Severity of Scientific Procedures on Animals*. Disponível em: <http://www.lasa.co.uk/publications.html>

Morton, DB e Hau J (2011) Capítulo 18: Welfare assessment and humane endpoints. In *Handbook of Laboratory Animal Science, 3.^a Edição, Volume 1 Essential Principles and Practices*. Hau J e Schapiro, SJ (eds), CRC Press LLC, EUA, p. 535-572

Prescott MJ, Morton DB, Anderson D, Buckwell A, Heath S, Hubrecht R, Jennings M, Robb D, Ruane B, Swallow J e Thompson P (2004) Refining dog husbandry and care, Eighth report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Laboratory Animals* **38 Supl 1**: S1:1-S1:94

Wolfensohn S e Lloyd M (2003) *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare, 3.^a Edição*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford (4.^a edição em prep)

(Última consulta de todos os URL em 24 de maio de 2012.)

Exemplos que ilustram o processo de classificação da severidade, de avaliação quotidiana e de avaliação da severidade real

Bruxelas, 11 de janeiro de 2013

O *Documento de trabalho sobre um quadro de avaliação da severidade* elaborado pelo grupo de trabalho de peritos da Comissão Europeia e aprovado pelas autoridades nacionais competentes para a aplicação da Diretiva 2010/63/UE relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos na sua reunião de julho de 2012 recomendava o desenvolvimento de exemplos que ilustrassem o «processo de classificação da severidade, de avaliação quotidiana e de avaliação da severidade real» e que estes fossem disponibilizados à comunidade científica.

Na sequência desta recomendação, o grupo de trabalho de peritos produziu um conjunto de exemplos para demonstrar a forma como o processo descrito no *Documento de trabalho* poderia ser aplicado a diferentes procedimentos. Estes destinam-se a ajudar as autoridades competentes, os utilizadores, os técnicos de experimentação animal, os veterinários e outros funcionários relevantes a certificar-se de que a dor, o sofrimento e a angústia são efetivamente previstos, reconhecidos e melhorados sempre que possível e consistentemente avaliados durante os procedimentos. O presente documento foi aprovado pelas autoridades nacionais competentes para a aplicação da Diretiva 2010/63/UE na sua reunião de 23-24 de janeiro de 2013.

É crucial que sejam tidos em conta uma série de fatores ao utilizar estes exemplos:

- Pressupõe-se que são **aplicadas boas práticas** ao longo de todo o processo no que diz respeito a alojamento, práticas zootécnicas e cuidados; procedimentos de refinamento; educação e formação; avaliação de competências; recuperação e aplicação de informações atualizadas sobre substituição, redução e refinamento e conceção experimental.

- O tipo de fichas de pontuação incluídas nos exemplos visam **complementar, e não substituir, o julgamento de pessoal qualificado, competente e empático**. O objetivo é permitir uma observação, uma manutenção de registos e uma avaliação mais sistemáticas e objetivas do sofrimento, mas sem que estas se sobreponham ao julgamento profissional.
- Cada exemplo diz respeito a uma **situação hipotética mas realista**. Não seria adequado incluir todos os pormenores que estariam disponíveis na prática, mas são incluídos pormenores suficientes **para explicar a forma como o processo foi aplicado**.
- Tal como indicado no *Documento de trabalho*, é fundamental **pensar e adaptar a avaliação da severidade** às espécies, à estirpe e ao procedimento realizado em cada estabelecimento do utilizador. Nessa base, o grupo de peritos **desaconselha vivamente a utilização** dos quadros e dos sistemas de fichas de pontuação tal como são apresentados nos exemplos, **mesmo que sejam aplicados aos mesmos procedimentos**. Todos os protocolos de avaliação da severidade devem ser regularmente analisados em termos de eficácia e revistos sempre que necessário.
- Os **exemplos também estão sujeitos a revisão**, à medida que aumenta o conhecimento sobre os indicadores de dor, sofrimento e angústia e que as abordagens à avaliação e classificação da severidade mudam. Cada um está identificado com uma data. Consultar o sítio Web da CE, http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/interpretation_en.htm, para atualizações.
- **Agradecemos que nos envie as suas observações** sobre a utilidade dos exemplos, assim como sugestões de futuros procedimentos a incluir. Enviar os comentários para env-laboratory-animals@ec.europa.eu

Índice:

Modelo 1 – Estudos de oncologia	26
<i>Modelo 1(a) - Manutenção de linhas de células tumorais humanas em murganhos pelados imunocomprometidos</i>	<i>27</i>
<i>Modelo 1(b) Eficácia de novos agentes farmacêuticos no crescimento de tumores</i>	<i>33</i>
Modelo 2 – Encefalite autoimune experimental (EAE) em murganhos	39
Modelo 3 – Artrite	48
Modelo 4 – AVC.....	60
Modelo 5 – Produção de anticorpos policlonais em coelhos	73
Modelo 6 - Produção e manutenção de animais geneticamente modificados (GM)	80
<i>Modelo – GeneA^{tm1a(Funding)Lab}.....</i>	<i>82</i>
<i>Modelo – Tg(GeneB)^{Labcode}</i>	<i>87</i>
<i>Modelo – GeneC^{tm1a(Funding)Lab}</i>	<i>92</i>

Exemplos ilustrativos do processo de severidade

Modelo 1 – Estudos de oncologia (1a e 1b)

Última atualização: 05/02/2013

1. Modelos animais em estudos de oncologia (1a e 1b)

Contexto geral: Avaliação de novos agentes anticancerígenos *in vivo*

O cancro é uma das principais causas de morte no mundo desenvolvido e o envelhecimento da população humana irá levar, inevitavelmente, a um aumento no peso da doença. Em 2010, a probabilidade de morte relacionada com cancro na UE antes dos setenta anos era de cerca de um em sete. É, por conseguinte, necessário desenvolver fármacos novos e mais eficazes para o tratamento do cancro. Os benefícios envolverão a redução da mortalidade resultante do cancro e a melhoria da qualidade de vida daqueles que tiverem um cancro no futuro.

Os modelos animais são atualmente utilizados no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do cancro, para além da modelização informática e das metodologias *in vitro*, como os ensaios de cultura celular. Uma vez confirmada *in vitro* a seletividade e a atividade dos compostos, apenas os compostos que exibam características favoráveis são testados em animais. São realizados estudos de tolerabilidade com pequenos grupos de animais para determinar a dose máxima tolerável (DMT) e a adequabilidade do regime de dosagem antes da realização de estudos de eficácia maiores.

A severidade dos efeitos para os animais dependerá dos modelos e do objetivo do estudo. Por exemplo, a manutenção das linhas de células tumorais não deveria ter um impacto significativo no bem-estar, desde que as boas práticas fossem devidamente observadas, incluindo o acompanhamento completo dos animais e a adoção de limites críticos precoces e humanos. No entanto, é provável que os estudos destinados a avaliar os novos tratamentos em modelos metastáticos suscitem maiores preocupações em matéria de bem-estar devido ao desenvolvimento de múltiplos tumores e aos prováveis efeitos adversos dos fármacos citotóxicos.

Foram publicadas algumas diretrizes para o bem-estar e a utilização de animais em investigação oncológica, nomeadamente no British Journal of Cancer (Workman et al. 2010). Estas diretrizes apresentam um panorama pormenorizado dos vários modelos de tumores animais disponíveis, da forma como estes influenciam os animais e da forma como o sofrimento pode ser minimizado.

No presente documento, são apresentados dois exemplos que ilustram os modelos animais oncológicos de diferentes classificações de severidade.

Referência

Workman et al. (2010) Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British Journal of Cancer* (2010) 102(11), 1555 – 1577; disponível gratuitamente em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2883160/pdf/6605642a.pdf>

1 (a) – Manutenção de linhas de células tumorais humanas em murganhos pelados imunocomprometidos

Algumas linhas de células tumorais humanas não se replicam de forma fiável em cultura, e, ocasionalmente, é necessário caracterizar e manter linhas de células humanas num modelo xenogénico *in vivo*.

Estudo

Trinta murganhos pelados BALB/C machos receberão, por injeção subcutânea no flanco esquerdo, uma suspensão de células 10³ HCT 116 em 0,1 ml de soluto salino. Os animais serão alojados em grupo em gaiolas individualmente ventiladas (GIV) com cama e materiais de nidificação. O bem-estar dos animais será avaliado diariamente e os animais pesados de 4 em 4 dias. Os indivíduos serão palpados para detetar tumores dia sim, dia não, e os tumores detetados serão também medidos com paquímetros dia sim, dia não. Os animais serão sacrificados ao dia 15 para colheita do tumor.

Avaliação prospetiva inicial e consideração dos refinamentos e limites críticos humanos específicos

O que é que este estudo implica que se faça aos animais?	O que sentirão os animais? Que grau de sofrimento poderá causar? O que o poderá agravar?	De que forma será possível reduzir ao mínimo o sofrimento?	
	Efeitos adversos	Metodologia e intervenções	Limites críticos
Manutenção de murganhos	Os animais são suscetíveis a infeções	Alojamento em GIV e práticas zootécnicas adaptadas a fim de	Qualquer animal que evidencie sinais de doença será sacrificado

imunocomprometidos		<p>minimizar os riscos de contaminação</p> <p>Animais alojados em grupo e com enriquecimento ambiental, a fim de reduzir o <i>stress</i></p> <p>As práticas zootécnicas e os cuidados serão revistos em caso de observação de sinais de angústia, agressão ou comportamentos anormais</p>	
Injeção subcutânea de células tumorais	Desconforto temporário após a injeção	<p>A injeção é administrada apenas uma vez</p> <p>Será injetado o volume adequado (máximo de 0,2 ml)</p> <p>Os animais serão vigiados de perto no período imediatamente após a injeção</p>	Os animais serão sacrificados sem dor caso se observe angústia ou desconforto superiores a ligeiros, sem uma recuperação rápida, após a injeção (muito raro)
Crescimento do tumor	<p>Pode causar desconforto ou afetar o comportamento ou a locomoção normais</p> <p>O tumor pode infetar ou ulcerar (mas não deve metastizar)</p>	<p>O crescimento do tumor será medido dia sim, dia não</p> <p>O regime de vigilância incluirá uma observação atenta da postura, da marcha e do tamanho e condição do tumor</p>	O animal será sacrificado se o tumor ulcerar ou interferir com o seu comportamento, postura ou locomoção normais, ou se exceder 1,2 cm de diâmetro (Workman et al. 2010)

Análise

Os animais apenas deverão sentir desconforto **LIGEIRO** e serão sacrificados caso surjam problemas de saúde ou bem-estar acima deste nível.

Uma classificação prospetiva de severidade LIGEIRA é, por conseguinte, adequada.

No final deste modelo, é apresentado um exemplo de uma ficha de observação preenchida.

Observações clínicas

Foi elaborada uma ficha de pontuação básica centrada na dimensão do tumor, no peso corporal, na postura e na marcha, uma vez que não se esperavam muitos outros sinais clínicos. Incluiu-se espaço para o registo de sinais clínicos inesperados em texto livre. Uma entrada NAD (nenhuma anomalia detetada) confirma que os animais foram verificados, não tendo sido detetada qualquer anomalia. Apresenta-se, de seguida, um exemplo.

Resultados

- Não foi registada perda de peso significativa em nenhum dos animais.
- Em 5 animais, não se observou o desenvolvimento de tumores.
- 25 animais desenvolveram tumores no flanco. Estes tumores não interferiram com o seu comportamento normal e mediam, no máximo, 1 cm ao dia 14, quando os animais foram sacrificados em conformidade com o protocolo do estudo para colheita de tumores
- Ocorreram alguns comportamentos agressivos e lutas numa gaiola; um dos animais apresentou feridas resultantes de mordeduras na cauda e no dorso e foi separado dos restantes e colocado numa gaiola individual. As feridas foram desinfetadas localmente todos os dias até cicatrizarem e o animal foi mantido até ao final do procedimento.

Avaliação da severidade real

- 29 animais concluíram o estudo apenas com sofrimento ligeiro relacionado com a injeção e o crescimento dos tumores. A severidade nestes casos foi considerada **LIGEIRA**. Um animal apresentou feridas resultantes de mordeduras, que foram eficazmente geridas. Neste animal, verificou-se algum sofrimento adicional causado pela agressão, mas não relacionado com o procedimento. Estes incidentes foram geridos eficazmente e o sofrimento foi minimizado. Apesar de o nível de sofrimento sentido por este animal ter sido moderado, como o incidente não estava relacionado com o procedimento a severidade real relacionada com o procedimento a notificar foi considerada como **LIGEIRA**

Exemplo de ficha de observação (preenchida para caso hipotético)

Crescimento de tumor em murganho pelado – ficha de procedimento e observação				
Gaiola 1 – Murganhos números 1-5				
Data	Procedimento	Tamanho do tumor (cm)	Peso (g)	Observações clínicas - verificar atentamente a postura e a marcha
28/02	Injeção subcutânea		1 - 21 2 - 22 3 - 21 4 - 22 5 - 22	Sem sinais de problemas de bem-estar após as injeções
01/03				Nenhuma anomalia detetada (NAD)
02/03	Palpação			NAD
03/03				NAD
04/03	Palpação		1 - 21 2 - 22 3 - 21 4 - 22 5 - 22	NAD

05/03				NAD
06/03	Palpação			NAD
07/03				Algum comportamento agressivo; sem feridas aparentes
08/03	Medição do tumor	1 – 0,1 2 – 0,1 3 – 0,1 4 – ausência de tumor 5 – 0,2	1 - 21 2 - 22 3 - 21 4 - 22 5 - 22	O murganho 1 tinha feridas de mordeduras na cauda e no dorso – tratamento local; passado para alojamento individual. Caixa de nidificação proporcionada a animal alojado individualmente mas removida da gaiola com os restantes quatro murganhos, para o caso de ser a causa da agressão
09/03				Feridas do murganho 1 desinfetadas, a cicatrizar bem; nenhum sinal de agressão entre os restantes animais
10/03	Medição do tumor	1 – 0,2 2 – 0,1 3 – 0,1 4 – ausência de tumor 5 – 0,2		Feridas do murganho 1 desinfetadas
11/03				Feridas do murganho 1 desinfetadas
12/03	Medição do tumor	1 - 0,4 2 – 0,3	1 - 22 2 - 22	Feridas do murganho 1 cicatrizadas; desinfecção descontinuada.

		3 – 0,3 4 – ausência de tumor 5 – 0,5	3 - 21 4 - 21 5 - 23	
13/03				NAD
14/03	Sacrificar o animal e colher o tumor.			

1(b) Eficácia de novos agentes farmacêuticos no crescimento de tumores – Procedimento em várias etapas

O estudo visa avaliar a eficácia de novos agentes na redução ou interrupção do crescimento de células tumorais. O tumor tem de estar bem estabelecido antes de se poder iniciar o tratamento (bastam normalmente 0,5 cm de diâmetro). Devido à duração do estudo, alguns tumores podem desenvolver-se até um máximo de 1,2 cm de diâmetro, normalmente no grupo de controlo do veículo. É provável que os fármacos citotóxicos causem alguns efeitos adversos no bem-estar.

30 murganhos pelados BALB/C machos receberão uma injeção de células tumorais de crescimento lento (0,1 ml). O bem-estar dos animais será avaliado diariamente e os animais serão pesados uma vez por semana durante 3 semanas consecutivas. O crescimento do tumor será medido com paquímetros ao dia 7 e ao dia 14; ao dia 20, os tumores serão medidos de novo, os animais serão aleatorizados e o tratamento será iniciado sob a forma de injeções intraperitoneais, duas vezes por dia, durante 7 dias.

Avaliação prospetiva inicial e consideração dos refinamentos e limites críticos humanos específicos

O que é que este estudo implica que se faça aos animais?	O que sentirão os animais? Que grau de sofrimento poderá causar? O que o poderá agravar?	De que forma será possível reduzir ao mínimo o sofrimento?	
	Efeitos adversos	Metodologia e intervenções	Limites críticos
Manutenção de murganhos imunocomprometidos	Os animais são suscetíveis a infeções	<p>Alojamento em GIV e práticas zootécnicas adaptadas a fim de minimizar os riscos de contaminação</p> <p>Animais alojados em grupo e com enriquecimento ambiental, a fim de reduzir o <i>stress</i></p> <p>As práticas zootécnicas e os cuidados serão revistos em caso de observação de sinais de angústia,</p>	Qualquer animal que evidencie sinais de doença intercorrente será sacrificado

		agressão ou comportamentos anormais	
Injeção subcutânea de células tumorais	Desconforto temporário após a injeção	A injeção é administrada apenas uma vez Será injetado o volume adequado (máximo de 0,2 ml) Os animais serão vigiados de perto no período imediatamente após a injeção	Os animais serão sacrificados sem dor caso se observe angústia ou desconforto superiores a ligeiros, sem uma recuperação rápida, após a injeção (muito raro)
Crescimento do tumor	Pode causar desconforto ou afetar o comportamento ou a locomoção normais O tumor utilizado pode infectar ou ulcerar (mas não deve metastizar)	Observação diária dos animais, acompanhamento regular da saúde geral e do crescimento do tumor O regime de vigilância incluirá uma observação atenta da postura, da marcha e do tamanho e condição do tumor As intervenções farmacêuticas começarão quando o tumor atingir 0,5 cm de diâmetro (medido com paquímetro)	O animal será sacrificado se o tumor ulcerar ou interferir com o seu comportamento, postura ou locomoção normais, ou se exceder 1,2 cm de diâmetro (Workman et al. 2010)
Injeção intraperitoneal de novo agente farmacêutico	Desconforto temporário após a injeção Os fármacos citotóxicos podem causar diarreia, perda de peso, anorexia ou letargia	Os animais serão vigiados de perto no período imediatamente após a injeção Volume máximo de 10 ml/kg diários durante 7 dias Serão usados níveis de dose	Os animais serão sacrificados se a perda de peso exceder 20% do peso corporal inicial Os animais que não comam ou que tenham diarreia durante mais de 48 horas serão sacrificados

		mínimos (determinados após estudos dos intervalos de dosagem) Será utilizado um sistema de pontuação clínica para avaliar o bem-estar	Será definido um limite superior de pontuação clínica como limite crítico humano
--	--	--	--

Análise

Como consequência do tamanho do tumor, do maior potencial de ulceração, da frequência das injeções e dos efeitos adversos dos fármacos administrados, neste caso é adequada uma **classificação prospectiva de severidade MODERADA**.

O limite de severidade poderia ser LIGEIRO?

É muito pouco provável, a menos que os objetivos científicos pudessem ser alcançados com limites críticos mais precoces, por exemplo reduzindo o tamanho máximo do tumor. Implicaria também a injeção de fármacos numa dose que se saiba que não causa efeitos clínicos adversos significativos. Nestas circunstâncias, poderia considerar-se adequado um grau de severidade **LIGEIRO**.

Observações clínicas

No final deste modelo, é apresentado um exemplo de uma ficha de observação e um exemplo de uma ficha de pontuação

Resultados

Dos 30 murganhos BALB/C machos, 25 foram utilizados para avaliação da eficácia; 10 animais receberam o fármaco B em dose H, 10 receberam o fármaco B em dose X e 5 receberam o fármaco C em dose Y

Avaliação da severidade real

- 3 animais não desenvolveram tumores e foram sacrificados por serem inúteis para a experiência - **LIGEIRA**
- 2 animais desenvolveram ulceração no local de injeção do tumor antes do início do tratamento e foram sacrificados. – **MODERADA**
- 10 animais que receberam o fármaco B em dose H desenvolveram tumores que se mantiveram relativamente pequenos, sem perda significativa de peso e sem sinais clínicos – **LIGEIRA**

- 7 animais que receberam o fármaco B em dose X apresentaram uma redução do tamanho do tumor, uma perda de peso de 15% e presença de fezes moles, mas foram mantidos até ao final da experiência - **MODERADA**
- 3 animais que receberam o fármaco B em dose X apresentaram uma redução do tamanho do tumor, uma perda de peso de 15% e presença de fezes moles, bem como anorexia, e estavam muito letárgicos; foram sacrificados sem dor ao dia 25 - **SEVERA**
- 5 animais que receberam o fármaco C em dose Y apresentaram um crescimento contínuo do tamanho do tumor, aumento de peso e ausência de sinais clínicos para além do crescimento do tumor. Estes animais foram sacrificados quando o tamanho do tumor excedeu 1,2 cm - **MODERADA**

Exemplo de ficha de pontuação

N.º do animal				
Data	01/06	02/06	03/06	04/06
Aspeto				
Peso corporal				
Estado do pelo				
Função fisiológica				
Dispneia e/ou taquipneia				
Ingestão de alimentos				
Ambiente				
Fezes moles ou diarreia				
Diarreia com sangue				
Comportamentos				
Manuseamento				
Agressão				
Marcha anormal				

Postura anormal				
Relutância em mover-se				
Indicadores específicos dos procedimentos				
Tamanho do tumor				
Ulceração do tumor				
O tumor impede o movimento				
Pontuação total				
Outras observações				

Exemplos de pontuações clínicas

Aspeto	Pontuação
Peso corporal	
5-10% de perda de peso	1
11-15% de perda de peso	2
16-20% de perda de peso	3
20% + de perda de peso	LCH
Estado do pelo	
Pelo ligeiramente desgrenhado	1
Ligeira piloereção	2
Piloereção notória	3
Função fisiológica	
Taquipneia (respiração acelerada)	1

Ações	
Pontuação 1	Rever a frequência do acompanhamento
2	Considerar cuidados suplementares, por ex. mais líquidos
4	Consultar veterinário
6	Implementar limite crítico humano

Dispneia (dificuldade em respirar)	3
Ambiente	
Fezes moles ou diarreia	1
Diarreia com sangue	LCH
Comportamento	
Tenso e nervoso durante manuseamento	1
Em notório sofrimento durante o manuseamento, p. ex. tremores, vocalizações, agressividade	3
Locomoção	
Marcha/postura ligeiramente anormal	1
Marcha/postura significativamente anormal	2
Problemas de mobilidade significativos/relutância em mover-se	3
Imobilidade > 24 h	LCH
Indicadores específicos de procedimentos	
Tamanho do tumor > 1,2 cm	LCH
Ulceração do tumor	LCH
O tumor impede o movimento	LCH

Exemplos ilustrativos do processo de severidade

Modelo 2 – Encefalite autoimune experimental (EAE) no murganho

Última atualização: 05/02/2013

Contexto geral

A encefalomielite autoimune experimental (EAE) é utilizada para modelizar vários aspetos da esclerose múltipla (EM) em roedores e primatas. A EM é uma doença neurológica complexa e multiforme que ocorre em jovens adultos. Os seus sintomas incluem inflamação, desmielinização e perda axonal. Os modelos animais são utilizados para investigar a fisiopatologia desta doença e para avaliar possíveis estratégias protetoras ou curativas, incluindo imunomodulação, imunoproteção, regeneração axonal e reparação da mielina. As características multiformes e multifásicas da EM exigem a utilização de modelos adequados para abordar questões específicas relacionadas com os diferentes estádios da doença.

A EAE envolve a geração de atividade do sistema imunitário dirigida à mielina, que induz inflamação no sistema nervoso central e a abertura da barreira hematoencefálica. Este processo pode causar uma síndrome neurológica grave no modelo animal, que deve ser seguida por uma recuperação parcial durante a primeira fase crónica recidivante remitente. Esta fase está associada a inflamação e desmielinização reversível. Após 9-10 semanas, o animal entra na forma progressiva, que está associada à desmielinização crónica e à perda axonal. Durante esta fase, é possível avaliar diferentes estratégias terapêuticas. Os limites críticos humanos e científicos devem ser escolhidos cuidadosamente, tendo em conta os objetivos do estudo.

Referências

- Emerson MR *et al.* (2009) Enhancing the ability of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis to serve as a more rigorous model of Multiple Sclerosis through refinement of the experimental design. *Comparative Medicine***59**: 112-128
- Miller SD *et al.* (2010) Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the mouse. *Current Protocols in Immunology***88**: 15.1.1 – 15.1.20
- Weissert R (ed) (2012) *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis - Models, Disease Biology and Experimental Therapy*. Published by InTech, DOI: 10.5772/11190, <http://www.intechopen.com>
- Wolfensohn S *et al.* (em prep) Reducing suffering in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.

Estudo

Neste exemplo, a EAE será induzida em quatro murganhos machos e quatro fêmeas Biozzi ABH (uma estirpe amplamente utilizada, que se considera ter um elevado valor translacional) para avaliar uma possível terapêutica para a EM. Na fase inicial de planificação do projeto, o utilizador considera cada acontecimento adverso possível para os animais e identifica possíveis causas de sofrimento, em discussão com o técnico de experimentação animal e os tratadores, assim como com o veterinário responsável. Investigam refinamentos e implementam-nos no projeto. Os murganhos serão alojados socialmente em grupos de quatro do mesmo sexo. Será prestada especial atenção ao ambiente local, uma vez que os animais com EAE têm défices motores significativos. As gaiolas terão pavimento sólido, cama de serradura, refúgios adequados e material de nidificação, assim como blocos para roer. Os animais serão tratados com um adjuvante inflamatório para induzir EAE e serão acompanhados durante a recuperação e a fase crónica recidivante remitente (9 a 10 semanas). Uma vez desenvolvida a forma progressiva, os compostos terapêuticos candidatos serão avaliados nos murganhos num estudo de três semanas.

Avaliação prospetiva inicial e consideração dos refinamentos e limites críticos humanos específicos

O que é que este estudo implica que se faça aos animais?	O que sentirão os animais? Que grau de sofrimento poderá causar? O que o poderá agravar?	De que forma será possível reduzir ao mínimo o sofrimento?	
	Efeitos adversos	Metodologia e intervenções	Limites críticos
Injeções múltiplas de adjuvante inflamatório	Desconforto ou dor devido à primeira injeção Possível reação no local da injeção, causando irritação ou desconforto	Serão injetadas pequenas doses em vários locais subcutâneos (exceto nas plantas das patas e na base da cauda) O adjuvante e o veículo são formulados para serem o menos irritantes possível Os animais serão acompanhados após a injeção	Os animais serão sacrificados sem dor se se observar dor ou angústia mais do que moderada transitória após a injeção

Indução de EAE – síndrome neurológica inicial grave seguida por fase de recuperação	Paralisia, que pode causar angústia ou ansiedade: perda do tônus da cauda, fraqueza dos membros traseiros, hipomotilidade, paralisia dos membros Disfunção urinária (incontinência ou retenção)	A função urinária será acompanhada verificando a bexiga diariamente. A bexiga será esvaziada manualmente sempre que necessário em casos de retenção (vigiar atentamente sinais de dor ou angústia após esvaziamento da bexiga) Em caso de incontinência dos animais, a gaiola será frequentemente vigiada para verificar se a cama e o material de nidificação estão molhados e, se necessário, estes serão substituídos por materiais limpos Serão fornecidos refúgios e material de nidificação adequados	LCH para qualquer um dos seguintes critérios: <ul style="list-style-type: none"> • Paralisia bilateral dos membros dianteiros durante >24 h • Paralisia bilateral dos membros traseiros até 5 dias • Qualquer tipo de automutilação • Retenção urinária persistente/incapacidade de esvaziar a bexiga • Paresia (perda de movimento; ligeira paralisia) • Perda de peso de 35%* • Deixar de comer ou beber durante >24 h após o início da doença • Não-recuperação de EAE no espaço de 3 semanas após o início da doença clínica • Sinais clínicos de doença intercorrente, por exemplo postura curvada
	Perda de peso significativa (por exemplo, até 35%)	Será garantido acesso constante a água e alimentos colocados em recipientes no pavimento da gaiola O peso corporal e o estado do animal serão acompanhados diariamente e registados mais frequentemente (se necessário) depois do início da perda de peso Serão fornecidos, quando necessário, alimentos húmidos e	

		blocos de líquido com suplementos por via subcutânea	
Curso clínico recidivante remitente	Défices neurológicos crônicos	Todos os fatores causadores de <i>stress</i> serão reduzidos, incluindo os níveis de ruído A temperatura ambiente será aumentada se necessário, utilizando aquecedores e materiais de cama e nidificação extra	
Administração de novo agente terapêutico (durante a forma progressiva)	Desconforto resultante da injeção Efeitos secundários ou falta de eficácia do agente	Os animais serão acompanhados de perto após a injeção do agente candidato	Os animais serão sacrificados sem dor se se observar algum dos indicadores supramencionados ou se existirem efeitos secundários graves decorrentes do novo agente terapêutico

* Perda de peso de 35% é um limite crítico extremo que requer uma justificação científica sólida. Neste caso, uma perda de peso significativa é inevitável e os animais podem recuperar dela com apoio adequado, por exemplo, aquecimento suplementar e alimentos adicionais, incluindo alimentação manual, se necessário. O limite crítico de 35% é definido para este estudo específico como forma de reduzir o requisito de induzir EAE em mais animais «virgens», que seria significativamente superior com um limite crítico mais «convencional» (por exemplo, de 20%).

Análise

Uma **severidade prospetiva SEVERA é considerada adequada**, uma vez que se espera que o procedimento cause um grave compromisso do bem-estar e da condição gerais do animal.

A severidade poderia ser MODERADA?

Apesar de a severidade prospetiva deste modelo dever ser sempre SEVERA pelos motivos apontados acima, a classificação de severidade prospetiva pode ser MODERADA, consoante a duração do estudo e a implementação de LCH precoces, tal como aqui indicado.

Observações clínicas

Durante o estudo, os murganhos foram acompanhados pelos técnicos de experimentação animal e pelos tratadores utilizando um sistema de fichas de pontuação clínica adaptado ao protocolo após discussão com os utilizadores, os técnicos de experimentação animal, os tratadores e o veterinário. Estas fichas incluem parâmetros relacionados com o peso, a estado do pelo, o tónus da cauda, o controlo vesical, o endireitamento, a marcha, paresia e sinais avançados (posição de lateral de descanso; paralisia quase completa; respiração rápida, lenta ou profunda). Uma vez que o projeto envolveu procedimentos severos, os animais foram acompanhados muito atentamente e o utilizador realizou revisões contínuas da severidade regularmente, em discussão com o órgão responsável pelo bem-estar animal, o técnico de experimentação animal e o veterinário designado. A seguir é apresentado um exemplo ilustrativo de uma ficha de pontuação.

Exemplo de uma ficha de pontuação adequada

Quadro. Ficha de pontuação clínica utilizada para murganhos com EAE

Data:					
Aspeto					
Peso corporal					
Estado do pelo					

Função fisiológica					
Controlo vesical					
Tónus da cauda					
Respiração					
Ambiente					
Condição do ninho					
Comportamento					
Comportamento social					
Marcha					
Indicadores específicos dos procedimentos					
Posição lateral de descanso					
Tempo de endireitamento					
Paresia					
Paralisia					

Outras observações					
(Texto livre)					

Notas: cada um dos indicadores foi avaliado de acordo com o sistema apresentado no quadro seguinte, no qual (por exemplo) poderia ser inserido «1» a seguir a «tónus da cauda» caso fosse observada uma menor elevação da cauda e «2» junto de «condição do ninho» caso o ninho estivesse desorganizado.

Quadro. Sistema de avaliação para indicadores em ficha de pontuação clínica de EAE

Pontuação:	1 = Ligeira	2 = Moderada	3 = Severa
Perda de peso	Até 10%	10 a 20%	20 a 35%
Estado do pelo	Ligeiramente desgrenhado	Ausência de limpeza	Piloereção significativa/prolongada
Controlo vesical – incontinência	Evidência de alguma perda de controlo, por exemplo pequena quantidade de urina no ninho	«Perda» de urina mais pronunciada	Incontinência
Controlo vesical – retenção	A bexiga pode ser palpada mas esvazia com manuseamento	É necessário um esforço ligeiramente maior para esvaziar a bexiga	Incapaz de urinar sem assistência; sinais de desconforto/angústia durante ou após esvaziamento manual
Tónus da cauda	Menor elevação ou encaracolar da cauda	Perda de tónus na metade distal da cauda	Perda de tónus em toda a cauda
Respiração: rápida, lenta ou profunda	Ligeiro	Moderado	Significativo
Condição do ninho	Ligeiramente desorganizado	Alguma tentativa de nidificação,	Ausência de ninho

		mas desorganizada	
Comportamento social	Não se esperam alterações com sofrimento ligeiro; a pontuação começa em 2	Interação reduzida com outros animais	Interação significativamente reduzida; passivo
Marcha	Desajeitada	Arrasta um membro traseiro	Arrasta ambos os membros traseiros
Posição lateral de descanso	Não se esperam alterações com sofrimento ligeiro ou moderado; a pontuação começa em 3	Não se esperam alterações com sofrimento ligeiro ou moderado; a pontuação começa em 3	Presente
Tempo de endireitamento	Lento quando colocado de costas	Dificuldade significativa em endireitar-se	Incapacidade de se endireitar no espaço de 5 segundos após ser colocado de costas
Paresia	Abdução lenta dos membros dianteiros quando colocado de costas	Amplitude reduzida de abdução dos membros dianteiros quando colocado de costas	Ausência de abdução dos membros dianteiros
Paralisia completa ou quase completa	Não se esperam alterações com sofrimento ligeiro ou moderado; a pontuação começa em 3	Não se esperam alterações com sofrimento ligeiro ou moderado; a pontuação começa em 3	Presente

Avaliação da severidade real

No final do procedimento, a ficha de pontuação foi revista para cada indivíduo ver a pontuação dos indicadores e a sua evolução ao longo do tempo.

- Dois murganhos perderam 8% de peso corporal após a indução de EAE; apresentavam o pelo ligeiramente desgrenhado e abdução lenta dos membros dianteiros, mas registaram uma pontuação de «2» em todos os outros indicadores durante os primeiros 5 dias do projeto. As suas pontuações reverteram, depois, para «1» ou «0» para cada indicador durante a fase recidivante remittente e durante o ensaio farmacológico. Severidade = **MODERADA**

- Três murganhos perderam entre 22 e 32% de peso corporal e obtiveram uma pontuação de «3», «2» e «1» ao longo da fase recidivante remitente e durante o ensaio farmacológico. Severidade = **SEVERA**
- Um murganho perdeu 37% de peso corporal durante a fase pós-indução e foi sacrificado. Severidade = **SEVERA**
- Dois murganhos perderam 15 e 18% de peso corporal, respetivamente, e pontuaram uma combinação de «2» e «3» em todos os outros indicadores durante os primeiros 4 dias do estudo. Depois obtiveram uma pontuação combinada de «1» e «2» durante a fase recidivante remitente e durante o ensaio farmacológico. Severidade = **SEVERA**

Não foi observada paralisia e revelou-se demasiado difícil avaliar a respiração durante o período de cativeiro, pelo que foram ambas eliminadas das fichas de registo. Nas caixas de texto livre, foi indicado frequentemente um aumento do tempo de refúgio como um indicador precoce de sofrimento, pelo que este indicador foi acrescentado às fichas para futuros projetos.

6 animais com severidade **SEVERA**, 2 animais com **MODERADA**

Oportunidades para futuras aplicações dos três R

Após a avaliação da severidade real, os utilizadores consultaram os colegas e fizeram uma pesquisa bibliográfica em busca de mais refinamentos. Foram identificados os seguintes refinamentos adicionais:

- Pré-alimentar os animais com suplementos alimentares altamente calóricos, como gelatina e leite condensado, antes de administrar o adjuvante
- Utilizar uma dose menor de adjuvante
- Utilizar um protocolo de estudo alternativo para que a duração do projeto possa ser reduzida

Estes foram acrescentados ao protocolo para futuros estudos, com a intenção de comparar os níveis de severidade real a fim de verificar se os refinamentos foram eficazes.

Exemplos ilustrativos do processo de severidade

Modelo 3 – Artrite

Última atualização: 05/02/2013

Contexto geral

Utilizam-se modelos animais de artrite para estudar a patogênese da doença e avaliar possíveis fármacos antiartríticos para utilização clínica. Alguns critérios importantes para a seleção de modelos incluem, portanto, semelhanças morfológicas com a doença humana e a capacidade do modelo para prever a eficácia dos compostos terapêuticos candidatos nos humanos.

Alguns modelos animais da artrite reumatoide vulgarmente utilizados são: a artrite adjuvante do rato, a artrite induzida no rato por colagénio do tipo II, a artrite induzida no murganho por colagénio do tipo II e a artrite induzida por antigénio em várias espécies (Bendele, 2001). A injeção na base da cauda é vulgarmente utilizada, uma vez que proporciona uma boa resposta imunogénica, apesar de a literatura também indicar outros locais de injeção. Existem igualmente variações consideráveis a nível das estirpes no que diz respeito à suscetibilidade, severidade e latência do início da artrite. Por exemplo, a suscetibilidade das linhas geneticamente modificadas (GM) ao desenvolvimento de artrite pode ser modificada (reforçada ou suprimida) em função dos efeitos das alterações genéticas. Em modelos animais de artrite que têm sido frequentemente utilizados e que estão, por isso, bem validados, o início da doença será previsível e as técnicas de avaliação poderão ser bem definidas e caracterizadas. Nesses modelos, podem utilizar-se avaliações múltiplas, incluindo a análise da marcha e a utilização de filamentos de Von Frey, por oposição a medições observacionais únicas.

De notar que devem ser realizadas revisões regulares das estirpes, dos protocolos e dos refinamentos disponíveis, para que seja(m) selecionado(s) o(s) mais adequado(s) para a questão científica levantada, caso a caso (Joe et al, 1999).

O modelo apresentado neste exemplo é o da artrite induzida por colagénio do tipo II em ratos, que pode causar sofrimento severo. Por esse motivo, a justificação científica obrigatória para a sua utilização é um requisito absoluto. Os ratos são imunizados contra o colagénio heterólogo do tipo II, produzindo lesões semelhantes às observadas na artrite reumatoide humana (Bendele, 2001). A poliartrite resultante é caracterizada por uma destruição marcada da cartilagem, associada a uma deposição de complexo imune nas superfícies articulares, resorção óssea e proliferação periosteal, assim como sinovite moderada a marcada e inflamação periarticular.

Referências

- Bendele, A.M. Animal models of rheumatoid arthritis, *J Musculoskel Neuron Interact* 2001; 1(4):377-385
- Jasemian Y et al. (2011) Refinement of the collagen induced arthritis model in rats by infrared thermography. *Br. J. Med. & Med. Res.* **1(4)**: 469-477
- Joe, B., Griffiths, M.M., Remmers, E.F., Wilder, R.L. Animal models of rheumatoid arthritis, *Current Rheumatology Reports* 1999; 1 139-149

Estudo

Neste exemplo, será induzida artrite em ratos Lewis, 18 machos e 18 fêmeas, por injeção repetida de AIF (adjuvante incompleto de Freund) e colagénio. O local de injeção será a base da cauda. O tratamento diário terá início 10 dias depois (D10), após o desenvolvimento de artrite, e será continuado diariamente durante mais 14 dias (até D24). O objetivo do estudo será testar possíveis agentes terapêuticos. Reviram-se dados previamente publicados sobre compostos relacionados para verificar se a administração de analgesia interferiria com os objetivos científicos e determinou-se que introduziria fatores de confusão experimental. Não será, por isso, administrada analgesia durante o desenvolvimento de artrite nem aos controlos e será prestada especial atenção a métodos não-farmacológicos de alívio da dor (por exemplo, refinamentos zootécnicos) a fim de atenuar o sofrimento.

Todos os animais serão observados e pesados diariamente e as observações serão registadas numa ficha de pontuação clínica geral. Os animais serão testados no D0 (antes da primeira injeção) e no D10 (antes do início do tratamento), no D13, D16, D20 e D24. Os testes incluirão medidas indiretas do compromisso da função física, como o diâmetro das articulações (medido com paquímetro) e a pontuação clínica, de acordo com um sistema de pontuação da artrite. Os limites críticos humanos serão aplicados com base nas pontuações clínicas (ver *infra*).

Avaliação de novos agentes farmacêuticos terapêuticos num modelo de artrite do rato (colagénio tipo II)

Severidade SEVERA

O que é que este estudo implica que se faça aos animais?	O que sentirão os animais? Que grau de sofrimento poderá causar? O que o poderá agravar?	De que forma será possível reduzir ao mínimo o sofrimento?	
	Efeitos adversos	Metodologia e intervenções	Limites críticos
Injeções subcutâneas de colagénio bovino do tipo II em adjuvante incompleto de Freund (AIF) na base da cauda num máximo de três ocasiões	<p><i>Stress</i> resultante da contenção</p> <p>Dor transitória, inchaço moderado no local da injeção e desconforto durante um a dois dias</p> <p>Possível ulceração cutânea, mas muito pouco provável com AIF</p>	<p>Atitudes empáticas e manuseamento competente durante os procedimentos</p> <p>Dose e formulação normalizadas escolhidas para minimizar o inchaço e a dor</p>	<p>Se a ulceração cutânea persistir ou infetar, os animais serão sacrificados sem dor</p>
Desenvolvimento de artrite (D0-D10)	<p>Desconforto, dor, incapacidade e angústia; o animal pode mostrar sinais de doença, incluindo um aspeto abatido, falta de apetite, relutância em mover-se, perda de peso, inchaço das articulações, vocalização audível durante o manuseamento</p>	<p>Acompanhamento clínico atento utilizando uma ficha de pontuação clínica geral, com aumento da frequência do acompanhamento após o início dos sinais clínicos (normalmente a partir do dia D8-D10)</p> <p>Colocação de mais material suave para cama e nidificação ao longo do estudo</p> <p>Acesso fácil a água e alimentos (por</p>	<p>Os animais serão sacrificados sem dor quando alcançarem as pontuações clínicas predeterminadas para limites críticos humanos (ver quadro <i>infra</i>)</p>

		<p>exemplo, no pavimento da gaiola) ao longo do estudo</p> <p>Será utilizado o sistema de pontuação clínica da artrite, que avalia o grau de inchaço e o número de articulações afetadas</p>	
<p>Administração de agentes farmacológicos (ensaio e controle, duas vezes por dia) por via subcutânea ou intraperitoneal (de D10 a D24)</p>	<p>Desconforto temporário após a injeção</p> <p>Não se espera que os agentes farmacológicos causem efeitos adversos, com base em dados animais anteriores</p>	<p>Acompanhamento clínico diário cuidadoso utilizando uma ficha de pontuação clínica geral</p>	<p>Serão aplicados limites críticos humanos se se verificarem efeitos adversos significativos</p>
<p>Avaliação dos efeitos de agentes farmacológicos na severidade da artrite (D0, D10, D13, D16, D20 e D24)</p>	<p>Consoante os métodos utilizados, pode existir alguma dor ou desconforto transitórios adicionais, por exemplo a utilização de filamentos de Von Frey, o uso de paquímetros, o requisito de manuseamento</p>	<p>Acompanhamento clínico minucioso</p> <p>Reduzir a frequência do acompanhamento (para o mínimo consistente com os objetivos científicos) até que o animal recupere</p>	<p>Consultar o quadro <i>infra</i></p>

Nota: O investigador, o cirurgião veterinário, os técnicos de experimentação animal e os tratadores devem discutir o sistema de pontuação clínica e de artrite, que deverá ser acordado antes do início do estudo.

Análise

Como consequência da probabilidade de impacto clínico significativo no animal, que se poderá prolongar por várias semanas, considerou-se adequada uma classificação prospetiva de severidade **SEVERA**.

A severidade poderia ser MODERADA?

Se a severidade poderia ser reduzida para moderada depende do objetivo do estudo. Por exemplo, com um acompanhamento frequente e pormenorizado dos animais e havendo a possibilidade de implementar limites críticos precoces (por exemplo, quando o animal começa a coxear ou após um período de ligeiro coxeio num membro, ou utilizando métodos de imagiologia *in-vivo* para detetar alterações na patologia articular precocemente), poderá ser possível classificar o procedimento de MODERADO. Esses limites críticos precoces (por exemplo, terminar o estudo ao dia 6 após a imagiologia) podem ser possíveis em projetos de investigação de alterações inflamatórias precoces. Um tratamento profilático (com início antes do desenvolvimento completo da artrite) com novos agentes farmacêuticos que possuam fortes efeitos anti-inflamatórios e que reprimam o desenvolvimento de artrite também pode levar a uma redução da severidade para **MODERADA**. No entanto, o tipo de estudo ilustrado aqui visa avaliar tratamentos para artrite totalmente estabelecida, pelo que se mantém uma classificação **SEVERA**.

A severidade poderia estar acima do limite superior?

De acordo com o artigo 15.º, n.º 2, da diretiva, «*os Estados-Membros asseguram que um procedimento não seja realizado se implicar dor, sofrimento ou angústia severos suscetíveis de se prolongarem e que não possam ser aliviados*». Este estudo tem potencial para causar sofrimento severo ao longo de várias semanas, o que pode ser considerado prolongado. Se se desenvolvesse artrite grave nos quatro membros e o sofrimento do animal não melhorasse, o estudo estaria acima do limite superior de severidade e seria necessário refiná-lo significativamente ou invocar a «cláusula de salvaguarda» (artigo 55.º da diretiva) e apresentar um pedido de autorização à Comissão.

Contudo, neste exemplo existem medidas destinadas a reduzir o sofrimento – embora tendo em conta o objetivo científico – incluindo refinar a composição, a administração e a escolha do adjuvante, permitindo que a artrite se desenvolva apenas nos membros traseiros, proporcionando um ambiente confortável e fácil acesso a alimentos e água, um sistema de acompanhamento abrangente e limites críticos humanos. Não se considera, portanto, que este projeto esteja acima do limite superior, podendo ser autorizado desde que esteja sujeito a uma avaliação de projeto positiva que inclua a análise da relação danos-benefícios.

A seguir é apresentado um exemplo de uma ficha de pontuação clínica para a observação diária de ratos artríticos.

Data:	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4
Aspeto				
Peso corporal				
Ausência de limpeza				
Desidratação				
Funções fisiológicas				
Dispneia				
Taquipneia				
Comportamento				
Relutância em mover-se				
Letargia/apatia				
Imobilidade				
Vocalização				
Indicador específico do procedimento				
Pontuação da pata artrítica				

(ver Quadro 2)				
Outras observações				
(Texto livre)				
Pontuação total				

Nota: todos os indicadores foram avaliados de acordo com o sistema nos Quadros 1 e 2 *infra*. Por exemplo, seria inserido «1» na ficha de pontuação a seguir a «ausência de limpeza» (Quadro 1) e «5» a seguir a «indicador específico do procedimento» se os dois membros traseiros pontuassem «3» e «2», respetivamente (Quadro 2). As ações e os limites críticos definidos a seguir têm em conta os requisitos destinados a evitar sofrimento severo sempre que possível, mas não os requisitos relativos ao abate humano dos animais antes da obtenção de dados suficientes, o que tornaria necessário utilizar mais animais «virgens».

Quadro 1. Sistema de pontuação para os indicadores utilizados na ficha de pontuação clínica	
<u>Aspeto</u>	Pontuação
Normal < 5% de perda de peso	0
5-10% de perda de peso	1
11-15% de perda de peso	2

Quadro 2. Indicador específico do procedimento – pontuação para pata artrítica	
Pontuação	<u>Aspeto</u>
0	Normal
1	Eritema e inchaço num tornozelo
2	Eritema e inchaço no tornozelo e na metade proximal

16-20% de perda de peso	3
20% + de perda de peso	LCH
Ausência de limpeza	1
Pele enrugada/desidratação	1

	das articulações tarsicas
3	Eritema e inchaço do tornozelo e de todas as articulações tarsicas até às articulações metatarsicas
4	Eritema e inchaço de toda a pata, incluído dos dedos

Este sistema de pontuação da artrite utilizado como um indicador específico do procedimento baseia-se em níveis crescentes de inchaço e eritema periarticular. As pontuações baseiam-se no exame físico e na inspeção visual e são utilizadas para calcular um «índice artrítico» que é definido como a soma das pontuações de ambos os membros traseiros.

<u>Funções fisiológicas</u>	
Dispneia	2
Taquipneia	1
<u>Comportamento</u>	
Relutância em mover-se	1
Letargia/apatia	2
Imobilidade persistente < 24 h	3
Imobilidade > 24 h	LCH
Vocalização durante o manuseamento	1
Vocalização, tensão e nervosismo durante manuseamento	2
Vocalização ao mover-se/espontânea	3

Indicador específico do procedimento	
Pontuação da pata artrítica (Quadro 2)	0-8

LCH: limite crítico humano implementado, independentemente da presença ou ausência de outros sinais clínicos

Exemplos de intervenções adequadas em resposta às pontuações clínicas totais

Medidas a tomar	Pontuação total
Aumentar a frequência do acompanhamento; considerar líquidos/cuidados suplementares	≥4
Rever progressos com veterinário	5-15
Limite crítico humano	≥16

Nota: as pontuações totais são retiradas das fichas de pontuação clínica, preenchidas de acordo com os sistemas de pontuação dos Quadros 1 e 2. Por exemplo, um animal com uma perda de peso corporal de 12%, evidência de redução na limpeza e inchaço em ambos os tornozelos traseiros teria uma pontuação total de 5.

Avaliação retrospectiva:

35 ratos foram imunizados com colagénio bovino do Tipo II em Adjuvante Incompleto de Freund (AIF). Todos os animais desenvolveram artrite: a pontuação da pata artrítica foi de 6 no D10. Todos os animais registaram uma perda de peso de 5-10%. As medições do diâmetro das articulações indicaram uma alteração significativa em relação aos dados de base. As observações clínicas diárias incluíram ausência de limpeza, relutância em mover-se, apatia, vocalização durante o manuseamento (durante a observação e a mudança de gaiola), um decréscimo na ingestão de alimentos e períodos de imobilidade.

- Foram usados 12 animais no grupo tratado com soluto salino. As pontuações de pata artrítica mais elevadas ficaram entre 6 e 8 em todas as medições (D13, D16, D20 e D24). As medições do diâmetro das articulações também indicaram sempre aumentos significativos em relação à linha de base. As pontuações clínicas variaram entre 4 e 8, com uma perda de peso corporal entre 5 e 15%, exceto num animal, que alcançou uma perda de peso de 21% no D17 e foi sacrificado sem dor.

Avaliação retrospectiva: SEVERA

- 12 animais foram tratados com o FÁRMACO A numa dose **baixa**. Em todos os animais, a pontuação da pata artrítica não diferiu da do grupo tratado com soluto salino até ao D16. No D20, um animal registou uma pontuação da pata artrítica de 8. As pontuações dos restantes foram de 6 e 7.

No D24, cinco animais registaram uma pontuação da pata artrítica um pouco inferior (5 a 7). Os sinais clínicos destes cinco animais apresentaram algumas melhorias, os pesos corporais estavam ainda 5 a 10% inferiores e a mobilidade na gaiola também se manteve diminuída.

Os restantes sete animais não apresentaram uma redução da artrite e dos sinais clínicos em comparação com o grupo tratado com soluto salino.

Avaliação retrospectiva: SEVERA

- 12 animais foram tratados com o FÁRMACO A numa dose **elevada**. No D13, as pontuações da pata artrítica foram de 4 a 6; os diâmetros das articulações também registaram uma diminuição não significativa. Os sinais clínicos incluíram ausência de limpeza e uma perda de peso corporal <10%. No D16, as pontuações da pata artrítica diminuíram para 4 e os diâmetros das articulações registaram reduções significativas. Os pesos corporais estabilizaram ao D16. Ainda se observava relutância em mover-se em alguns animais. A partir do D20, o inchaço das articulações reduziu para 2 a 4. Observaram-se comportamentos normais na gaiola. O peso corporal foi recuperado para os níveis anteriores ao procedimento.

Avaliação retrospectiva: SEVERA

Nota: no final do estudo, no terceiro grupo de doze animais, o agente em estudo «FÁRMACO A» administrado em dose **elevada** revelou-se eficaz na redução da severidade real para Moderada. No entanto, dado o modelo exigir artrite totalmente desenvolvida em todos os animais antes do início do tratamento, momento em que os animais demonstraram sinais clínicos consistentes com uma classificação «severa», a classificação da severidade real para estes animais manteve-se como **Severa**.

Uma vez que este projeto envolve procedimentos severos, o utilizador realiza regularmente revisões da severidade, em discussão com o órgão responsável pelo bem-estar animal, o técnico de experimentação animal e o veterinário designado, a fim de garantir a aplicação contínua dos três R.

Exemplos ilustrativos do processo de severidade

Modelo 4 – AVC

Última atualização:05/02/2013

Contexto geral

O AVC é definido como a perda ou alteração da função fisiológica normal resultante da irrigação sanguínea insuficiente de parte do cérebro. Apesar de conhecermos melhor a fisiopatologia das lesões vasculares cerebrais, o tratamento eficaz para o AVC é ainda uma necessidade médica não satisfeita, e estão em curso investigações para descobrir medidas preventivas e terapêuticas adequadas.

Podem observar-se três tipos diferentes de AVC em doentes humanos: isquémico, hemorragia intracerebral e hemorragia subaracnoide. A maioria dos modelos animais atualmente disponíveis baseia-se no tipo isquémico. Os modelos de AVC, pela sua natureza, representam um desafio do ponto de vista do bem-estar dos animais. A boa interação e comunicação entre todos os indivíduos envolvidos nos procedimentos científicos (veterinários, investigadores, técnicos de experimentação animal e tratadores) são fundamentais para garantir um equilíbrio adequado entre o alcance de um modelo válido neste domínio de investigação e a minimização do sofrimento dos animais.

O AVC é induzido rotineiramente em roedores através da oclusão temporária ou permanente da artéria cerebral média (oclusão da artéria cerebral média; modelo OACM). Este modelo «OACM» visa reproduzir experimentalmente a isquemia cerebral focal que ocorre no AVC e tem sido amplamente utilizado para estudar os mecanismos da lesão, para identificar potenciais alvos e para testar eventuais agentes neuroprotetores. Foram identificadas diferenças entre estirpes no murganho e no rato, assim como a influência complexa e significativa da idade, do sexo e de comorbilidades como diabetes, hipertensão e aterosclerose. Ao passo que a investigação pré-clínica do AVC utiliza frequentemente roedores jovens machos saudáveis, o impacto de fatores como os supramencionados pode ser explorado utilizando modelos com condições comórbidas (por exemplo, ratos espontaneamente hipertensos ou rato diabético induzido por estreptozotocina (STZ)). Nesses casos com condições comórbidas, podem ser necessárias observações mais atentas dos sinais clínicos e limites críticos humanos (LCH) precoces.

Numa conceção de estudo padrão, os animais são treinados para o desempenho de determinados testes comportamentais antes do procedimento de OACM. Durante a janela temporal terapêutica, definida de acordo com o mecanismo de ação do fármaco e o objetivo do estudo, é administrado aos animais o composto em estudo. A análise dos resultados deveria incluir informações sobre a dimensão do enfarte, a taxa de mortalidade, a frequência de complicações (por exemplo, hemorragia subaracnoide), juntamente com uma avaliação funcional e neurológica

para acompanhar a evolução. A ressonância magnética (RM) em série revelou-se um instrumento fundamental para obter informações sobre a variação da dimensão do enfarte ao longo do tempo, mas também pode fornecer informações adicionais sobre o fluxo sanguíneo ou o estado metabólico. Também podem ser incluídos limites críticos histológicos, bioquímicos e moleculares.

Existem vários testes comportamentais que podem ser aplicados a modelos de AVC. Os testes mais simples incluem sistemas de pontuação neurológica, que avaliam o estado neurológico global, e testes de colocação dos membros, utilizados para medir os reflexos motores. Estes são geralmente utilizados para avaliar os animais na fase aguda pós-AVC. Em estudos a longo prazo, podem utilizar-se testes mais complexos para avaliar as funções sensoriais e motoras (por exemplo, teste bilateral com autocolante, de marcha na trave e da escada) e funções cognitivas como a memória (por exemplo, testes de fuga passiva ou avaliações de estratégias de aprendizagem).

É boa prática realizar um grupo de testes comportamentais, incluindo pelo menos um para cada fase (aguda e a longo prazo), a fim de recolher informações abrangentes sobre o impacto nas funções sensoriais, motoras e cognitivas. Estes testes têm de ser cuidadosamente escolhidos para capturarem eventuais efeitos das estratégias terapêuticas. Neste documento não incluímos descrições pormenorizadas de cada um destes testes comportamentais, incluindo calendários de treino, mas, para uma revisão e apresentação exaustivas da sua utilização, recomendamos a leitura de Schaar et al. (2010).

Referências

- Braeuninger S and Kleinschnitz C. Recent models of focal cerebral ischemia: procedural pitfalls and translational problems. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 2009 Nov; 1:8.
- Freret T and Bouet V. Improvements of the Stroke Model Guidelines – Animal body weight and long-term functional concerns. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 2009; 2(2): 28-31
- Graham SM et al. Animal models of ischemic stroke: balancing experimental aims and animal care. *Comparative Medicine*, 2004 Out; 54(5): 486-496
- Yanamoto H et al. Evaluation of MCAo stroke models in normotensive rats: standardized neocortical infarction by the 3VO technique. *ExpNeurol*, 2003 Ago; 182(2):261-74
- Liu S et al. Rodent stroke model guidelines for preclinical stroke trials (1.^a edição). *Journal of experimental stroke and translational medicine*, 2009 Jan 1;2(2):2-27.
- Schaar KL et al. Functional assessments in the rodent stroke model. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 2010; 2: 13; acesso livre em <http://www.etsmjournal.com/content/2/1/13>

- Virley et al. A temporal MRI assessment of neuropathology after transient middle cerebral artery occlusion in the rat: correlations with behaviour. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000;20: 563-582.

Estudo

Eficácia de um novo agente terapêutico no modelo da oclusão da artéria cerebral média (OACM) por fio intraluminal no rato

Neste exemplo, 40 ratos Strague-Dawley machos jovens (300-350 g) serão submetidos a OACM permanente utilizando a técnica do fio intraluminal sob anestesia geral. Os ratos serão aleatorizados (n=10/grupo) para receber o veículo (10 ml/kg) ou um novo agente em estudo (composto A) em doses de 1, 3 ou 10 ml/kg por infusão endovenosa numa veia da cauda durante 1 h com início 30 min pós-OACM. Serão administradas doses subsequentes (veículo ou composto A a 1, 3 ou 10 ml/kg) por via intraperitoneal 6 e 24 h pós-OACM. Os ratos serão inicialmente alojados aos pares em gaiolas com pavimento sólido com camas profundas e material de nidificação. Os alimentos serão limitados durante a fase pré-treino para facilitar o desempenho no teste da escada, que consiste numa tarefa motivada pelo apetite. Os animais receberão alimentos *ad libitum* a partir de 6 horas antes da cirurgia até 6 dias pós-OACM, a fim de melhorar o peso e a recuperação no pós-operatório.

Os resultados funcionais serão avaliados diariamente utilizando um sistema de pontuação neurológica (escala de Bederson; ver Schaar et al. 2010) e testes comportamentais (teste bilateral com autocolante e de marcha na trave). O teste da escada será também realizado diariamente a partir do dia 7 pós-OACM, de forma a dar tempo suficiente para a recuperação pós-operatória antes da reintrodução da restrição alimentar. Nenhum dos testes comportamentais deverá causar angústia significativa. Será realizada uma ressonância magnética (RM) aos ratos sob anestesia nos dias 1, 7, 14 e 28 para avaliar o volume da lesão. Todos os animais serão sacrificados 28 dias após a OACM.

Avaliação prospetiva inicial e consideração dos refinamentos e limites críticos humanos específicos

O que é que este estudo implica que se faça aos animais?	O que sentirão os animais? Que grau de sofrimento poderá causar? O que o poderá agravar?	De que forma será possível reduzir ao mínimo o sofrimento?	
	Efeitos adversos	Metodologia e intervenções	Limites críticos
Treino pré-operatório para testes comportamentais ao longo de um período de 2-3 semanas: teste bilateral com autocolante (para negligência contralateral), marcha na trave (para coordenação dos membros traseiros) e teste da escada (para precisão na colocação das patas dianteiras)	É possível que se verifique um <i>stress</i> /angústia mínimos antes de os animais se habituarem aos testes, uma vez que estes implicam que os animais circulem em salas/arenas novas	Habituação gradual aos aparelhos dos testes Manuseamento calmo, empático	Remoção da sessão caso se observem sinais de angústia Os animais que não alcancem um desempenho de base dentro de um limite de tempo predefinido serão excluídos do estudo
Restrição alimentar (85-90% do peso com alimentação livre) pré-operatório e a partir do dia 7 pós-OACM para facilitar o desempenho no teste da escada	Ligeira fome; possível frustração e ansiedade	A perda de peso não excederá os 10%, caso contrário a restrição alimentar será suspensa	Caso sejam observados problemas comportamentais resultantes da redução na ingestão de alimentos, o animal será removido do estudo

<p>Sob anestesia geral, oclusão temporária (90 min) da ACM utilizando um fio intraluminal introduzido via artéria carótida comum</p>	<p>Dor e desconforto associados à cirurgia</p> <p>Possíveis complicações cirúrgicas inesperadas, por exemplo hemorragia subaracnoide, lesão ipsilateral da retina, formação de trombos intraluminais, edema cerebral e envolvimento do hipotálamo com consequente hipertermia ou necrose muscular temporal. Estes podem persistir de diversas formas, como, por exemplo, colapso súbito, paralisia, inclinações da cabeça severas, convulsões</p> <p>Aversão e possíveis efeitos da anestesia sobre as variáveis fisiológicas (como hipotermia, hipotensão ou hipoxia)</p> <p>Ingestão nutricional pobre resultante do nível reduzido de consciência, do compromisso da mastigação e da má motilidade, geralmente nas primeiras 48 h</p>	<p>Utilização de anestésias adequadas e minimamente aversivas, com analgésicos adequados (isto é, eficazes mas com propriedades neuroprotetoras mínimas)</p> <p>Cirurgião qualificado que utilize uma técnica cirúrgica asséptica adequada (com análises regulares das taxas de sucesso)</p> <p>Manutenção da homeostase durante a anestesia</p> <p>Utilização de monofilamentos e técnica cirúrgica normalizados para reduzir a variabilidade e as complicações resultantes de lesões extensas</p> <p>Cuidados pós-operatórios intensivos durante os primeiros 3-5 dias, incluindo fontes de calor externas.</p> <p>Controlos regulares do peso corporal; observação diária e</p>	<p>Os animais serão sacrificados sem dor se ocorrer alguma das seguintes situações –</p> <ul style="list-style-type: none"> • Problemas técnicos significativos durante a cirurgia • Incapacidade de recuperar totalmente da anestesia • Sinais de complicações cirúrgicas inesperadas • Se a perda de peso corporal do animal exceder 20% antes da cirurgia, apesar da alimentação adicional e/ou reidratação ou se este se mantiver imóvel por mais de 24 horas
--	--	--	---

	<p>pós-OACM</p> <p>Grau de déficit locomotor, que pode causar <i>stress</i> e/ou frustração</p>	<p>tratamento das feridas</p> <p>Provisão de alimentos e água facilmente acessíveis durante o período de recuperação, ou alimentos adicionais (puré, líquidos) e assistência na ingestão, se necessário; reidratação (por exemplo via injeção de soluto salino), se necessário</p>	
<p>Testes comportamentais (teste bilateral com autocolante e teste da marcha na trave) realizados diariamente a partir do dia 1 até ao dia 28 pós-OACM; teste da escada realizado diariamente a partir do dia 7 pós-OACM</p>	<p>As tarefas podem causar <i>stress</i> nos animais se as suas competências motoras estiverem comprometidas</p>	<p>Vigiar indicadores comportamentais de ansiedade ou angústia</p> <p>Os animais serão continuamente observados por pessoal experiente</p>	<p>Normalmente, é definido um tempo máximo para a realização da tarefa exigida e é dada uma pontuação final</p>
<p>Administração do novo agente terapêutico por via subcutânea/endovenosa/intraperitoneal antes e/ou após a cirurgia (profilática/terapêutica)</p>	<p>Desconforto temporário associado à via de administração</p> <p>Nenhum efeito adverso esperado com as doses administradas</p>	<p>Administração conforme com as boas práticas, pela via e com as técnicas menos dolorosas/agonizantes possíveis de acordo com os objetivos científicos.</p> <p>Os animais serão observados de perto para deteção de efeitos</p>	<p>Os animais serão sacrificados sem dor se se observarem efeitos secundários graves resultantes dos novos agentes terapêuticos</p>

		adversos das substâncias em estudo	
RM longitudinal sob anestesia nos dias 1, 7, 14 e 28 pós-OACM	Anestesia repetida Aversão e possíveis efeitos da anestesia sobre as variáveis fisiológicas (como hipotermia, hipotensão ou hipoxia)	Utilização de anestesia adequada e minimamente aversiva Manutenção da homeostase durante a anestesia, incluindo hidratação antes ou durante a anestesia caso surjam problemas de desidratação e aquecimento para manter a normotermia	Os animais que não recuperem totalmente da anestesia serão sacrificados Os animais serão sacrificados sem dor se não for possível manter a homeostase após a recuperação

Análise

Este modelo é considerado SEVERO devido ao procedimento cirúrgico envolvido, aos efeitos adversos (mas normalmente temporários) da OACM no bem-estar do animal e à possibilidade de complicações pós-operatórias significativas. No entanto, o impacto negativo para o bem-estar do animal pode ser reduzido através de cuidados pós-operatórios intensivos durante, pelo menos, as primeiras 48 h e acompanhamento próximo na fase posterior – com ação imediata caso surjam problemas. Do ponto de vista experimental, a atenção ao refinamento e à normalização de cada um dos procedimentos pode levar a uma redução da incidência de complicações e da variabilidade, e conseqüentemente a uma melhor qualidade dos dados e a uma redução do número de animais utilizados.

Uma classificação prospetiva de severidade SEVERA é, por conseguinte, adequada

A severidade poderia ser MODERADA?

Apesar de a severidade prospetiva deste modelo dever ser sempre SEVERA pelos motivos supramencionados, a incidência dos efeitos severos pode ser reduzida por operadores experientes, juntamente com supervisão veterinária especializada e cuidados aos animais, assim como intervenções precoces acordadas em caso de complicações. Em certos casos, poderia ser autorizada uma severidade MODERADA, mas apenas caso a caso em grupos individuais de investigação que tenham experiência comprovada com este modelo particular e se saiba que são capazes de utilizar o modelo sem causar sofrimento mais do que moderado.

Observação clínica

Os animais são acompanhados muito atentamente no período pós-operatório. São administradas analgesia e terapêutica local de apoio sempre que necessário.

No final deste exemplo, é apresentado um exemplo de um sistema combinado de pontuação neurológica/clínica utilizado para ajudar a acompanhar a condição clínica dos animais ao longo do procedimento.

Resultados

Todos os animais, exceto um no grupo tratado com o veículo, recuperaram da cirurgia sem complicações inesperadas, em resultado do apoio perioperatório intensivo prestado.

- Os 10 animais tratados com veículo registaram a pontuação neurológica mais baixa ao longo do estudo, juntamente com um mau desempenho nos testes comportamentais, em comparação com os animais tratados. A pontuação clínica foi semelhante aos animais tratados no pós-OACM imediato (primeiras 48 h), sendo posteriormente notadas diferenças entre os animais no grupo veículo:
 - 1/10 tiveram de ser sacrificados ao dia 2 pós-cirurgia devido a perda de peso corporal >20% (apesar da alimentação adicional e reidratação).
Avaliação: SEVERA
 - 6/10 desenvolveram um défice neurológico moderado, mas apresentaram melhorias mínimas na pontuação clínica ao longo do tempo
Avaliação: SEVERA
 - 3/10 animais desenvolveram um défice neurológico moderado e apresentaram uma redução gradual da pontuação clínica ao longo do tempo, possivelmente resultante da sua capacidade para compensar e adaptar-se a défices neurológicos a longo prazo
Avaliação: MODERADA
- Os 20 animais tratados com o composto A em doses menores (1 e 3 mg/kg) apresentaram uma melhoria na pontuação neurológica após as 48 h pós-OACM, juntamente com uma melhoria na pontuação clínica.
Avaliação: MODERADA
- Os 10 animais tratados com o composto A na dose mais elevada (10 mg/kg) apresentaram uma melhoria na pontuação neurológica em comparação com o grupo veículo a partir das 24 h pós-OACM, uma perda de peso corporal mínima (5%) 24 horas após a cirurgia e uma melhoria significativa na pontuação clínica a partir das 48 h pós-OACM
Avaliação: MODERADA

Avaliação da severidade real

7 animais com severidade **SEVERA**, 33 animais com severidade **MODERADA**

Sistema de pontuação

A avaliação da severidade é realizada por uma combinação de observações clínicas gerais (peso corporal, aspeto, comportamento, ambiente da gaiola), juntamente com uma avaliação neurológica específica do procedimento. A escala de Bederson é uma avaliação neurológica global que foi desenvolvida para medir os compromissos neurológicos após um AVC. É utilizada uma escala de graduação de 0-3, sendo 0 = normal e 3 = nível mais elevado de incapacidade. Os testes realizados incluem flexão dos membros dianteiros, resistência a empurrões laterais e movimentos circulares.

grau 0: nenhum déficit observável

grau 1: flexão dos membros dianteiros

grau 2: menor resistência a empurrões laterais (e flexão dos membros dianteiros) sem movimentos circulares

grau 3: mesmo comportamento que no grau 2, mas com movimentos circulares

LCH: limite crítico humano

	Pontuação
Aspeto	
5-10% de perda de peso	1
11-15% de perda de peso	2
16-20% de perda de peso	3
20% + de perda de peso	LCH
Pelo ligeiramente desgrenhado	1
Ligeira piloereção	2

Piloereção notória	3
Comportamento	
Marcha ligeiramente anormal	1
Marcha significativamente anormal	2
Problemas significativos de mobilidade	3
Imobilidade > 24 h	LCH
Tenso e nervoso durante manuseamento	2
Em notório sofrimento durante o manuseamento, p. ex. tremores, vocalizações, agressividade	3
Ambiente	
Ninho ligeiramente desorganizado	1
Ninho praticamente irreconhecível	2
Ausência de ninho	3
Pontuação neurológica	
Flexão dos membros dianteiros	1
Menor resistência a empurrões laterais (e flexão dos membros dianteiros) sem movimentos circulares	2
Mesmo comportamento que no grau 2, com movimentos circulares	3

Ações	
Pontuação 1	Rever a frequência da monitorização
4	Prestar cuidados suplementares, por exemplo, administração de fluídos suplementares e puré húmido
5	Rever progressos com veterinário
12	Implementar limite crítico humano

Ações – de notar que, uma vez que as complicações cirúrgicas são geralmente observadas no período de recobro imediato pós-operatório, é essencial que haja uma monitorização atenta e um julgamento empático e especializado durante as primeiras 24 horas para garantir que os efeitos adversos são identificados e que são tomadas medidas para os tratar, bem como, que os animais são eutanasiados caso o seu sofrimento exceda a categoria severa.

Exemplo de uma ficha de observação individual (Dias 0-4)

Dia	0	1	2	3	4
<u>Aspeto</u>					
Peso corporal (g) (pontuação)	320 (0)	292 (1)	285 (2)	287 (1)	292 (1)
<u>Estado do pelo</u>					
Pelo desgrenhado/piloereção	1	1	0	1	0
<u>Comportamentos</u>					
Marcha	3	2	2	2	1
Resposta ao manuseamento	0	0	2	0	0
<u>Ambiente</u>					
Condição do ninho	3	2	1	0	0
<u>Pontuação neurológica específica do procedimento</u>	2	2	1	1	1
Pontuação total	9	8	8	5	3
Volume da lesão (avaliação por RM)*		11%			

<u>Outras observações</u>	Recuperação da cirurgia sem incidentes nem complicações Medicado aos 30 min e 6 h	Andou pela gaiola e tentou fazer um ninho	Testes comportamentais, ansioso ao início mas concluiu todos os testes, ninho mais estruturado	Hoje apresenta o pelo menos limpo mas tem um peso estável e um bom ninho	Testes comportamentais concluídos, menos ansioso e melhoria notória na marcha
----------------------------------	--	---	--	--	---

* O «volume da lesão» (avaliado por meio de RM) é incluído para que o investigador o preencha no final do estudo. Estes dados podem depois ser correlacionados com as observações clínicas e comportamentais para permitir um refinamento do acompanhamento, dos cuidados e dos procedimentos.

Exemplos ilustrativos do processo de severidade

Modelo 5 – Produção de anticorpos policlonais no coelho

Última atualização: 05/02/2013

Contexto geral

O principal objetivo da produção de anticorpos em animais de laboratório é a obtenção de antissoros com título elevado e elevada afinidade para utilização em testes experimentais ou de diagnóstico.

Muita da biologia e da bioquímica moderna depende da disponibilidade de anticorpos altamente específicos para utilização em diversas técnicas, como a imuno-histoquímica, os testes ELISA, a imunoprecipitação e a imunotransferência. Assim, a geração de grandes quantidades de anticorpos específicos dirigidos a proteínas ou péptidos de interesse é essencial para o êxito de muitos programas de investigação básica e aplicada.

Neste exemplo, será utilizado um coelho para desenvolver anticorpos contra pequenos péptidos considerados importantes para a regulação da divisão celular, no âmbito de um programa de investigação que envolve estudos bioquímicos da divisão celular nos mamíferos.

Referências

- Canadian Council on Animal Care guidelines on; antibody production (2002). Disponível em http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Antibody_production.pdf
- EFPIA/ECVAM (Diehl K-H et al.) (2001) A good practice guide to the administration of substances and the removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology* **21**: 15-23
- JWGR (2001) Refining procedures for the administration of substances. *Laboratory Animals***35**: 1-41
- Keating SCJ, Thomas AA, Flecknell PA & Leach MC (2012) Evaluation of EMLA cream for preventing pain during tattooing of rabbits: changes in physiological, behavioural and facial expression responses. *PLOS ONE***7(9)**: e44437 (acesso livre, <http://www.plosone.org>)
- Leenars M, Hendriksen CFM (2005) Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendation. *ILAR Journal***46**:269-279

- Stills HF (2005) Adjuvants and antibody production: Dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR Journal* **46**:280-293
- UFAW/RSPCA (2008) *Refining Rabbit Care: A Resource for Those Working With Rabbits in Research*. Southwater, Reino Unido: RSPCA (disponível em <http://www.rspca.org.uk/sciencegroup/researchanimals/implementing3rs/gapassport>)

Estudo

Foi possível determinar, com base em experiências anteriores, que um único coelho deverá proporcionar material suficiente para cada péptido de interesse. O coelho será alojado num recinto fechado com um grupo estável de coelhos compatíveis (também utilizados para produção de anticorpos), com espaço adequado para enriquecimento, exercício e comportamento social normal (UFAW/RSPCA 2008). O animal será imunizado com uma mistura de antigénio/adjuvante. Em momentos predeterminados, serão colhidas pequenas amostras de sangue para determinar se a imunização foi bem-sucedida. Quando tiver sido obtido um título de anticorpos adequado, o animal será sangrado sob anestesia profunda, sem recuperação, para a recolha dos anticorpos presentes no sangue.

O manuseamento dos coelhos pode ser desgastante e deverá apenas ser realizado por pessoal competente e empático. O comportamento dos coelhos pode ser difícil de interpretar, pelo que é boa prática manter-se a par da literatura sobre o comportamento e o bem-estar dos coelhos. Por exemplo, estudos recentes indicaram que os coelhos podem apresentar «expressões faciais de dor» em determinadas circunstâncias (Keating et al. 2012) e a possibilidade de utilizar este instrumento para a avaliação do bem-estar deverá ser explorada caso a caso.

Devido à fraca imunogenicidade do péptido de cadeia curta, será necessário administrá-lo em combinação com um adjuvante. O adjuvante completo de Freund (ACF) foi utilizado anteriormente, mas existem agora adjuvantes sintéticos que também são eficazes neste procedimento e minimamente irritantes.

Avaliação prospetiva inicial e consideração dos refinamentos e limites críticos humanos específicos

O que é que este estudo implica que se faça aos animais?	O que sentirão os animais? Que grau de sofrimento poderá causar? O que o poderá agravar?	De que forma será possível reduzir ao mínimo o sofrimento?	
	Efeitos adversos	Metodologia e intervenções	Limites críticos
Imunização com antigénio e adjuvante; três injeções subcutâneas nos dias 8, 22 e 37	<p>Desconforto após a injeção</p> <p>Podem desenvolver-se nódulos não dolorosos em resposta ao adjuvante</p> <p>Possível (rara) ulceração no local da injeção</p>	<p>O volume, a formulação e a frequência da injeção serão determinados em conformidade com as orientações de boas práticas (por exemplo, EFPIA/CEVMA ou JWGR), normalmente um máximo de quatro locais e 0,25 ml por local</p> <p>Eventuais úlceras receberão tratamento veterinário adequado de imediato</p>	<p>O animal será sacrificado sem dor se surgirem sinais de desconforto, dor ou angústia prolongados (por exemplo, atenção persistente aos locais de injeção ou nódulos) ou caso se formem úlceras que não curem</p>
Recolha de amostras de sangue para avaliar a resposta dos anticorpos (até 5 ocasiões)	<p>Captura, manuseamento e contenção, que podem ser desgastantes</p> <p>Ligeiro desconforto associado à picada da agulha</p> <p>Baixo risco de hemorragia ou formação de hematoma</p>	<p>A amostra será de uma veia superficial (orelha).</p> <p>Pequenos volumes de sangue (<5 ml) apenas para verificar os títulos de anticorpos</p> <p>Aplicar pressão no local da recolha</p>	<p>Se o animal evidenciar <i>stress</i> exagerado devido ao procedimento, a recolha da amostra será adiada para quando o comportamento do animal regressar ao normal</p>

		da amostra	
Sangria sob anestesia geral	Ligeiro desconforto e possível aversão ao agente durante a indução da anestesia	Agente anestésico minimamente aversivo utilizado	O animal continuará sob anestesia até morrer

Análise

Espera-se apenas severidade ligeira, graças aos refinamentos nos procedimentos zootécnicos e nos cuidados, às boas práticas de administração e amostragem e à escolha de um adjuvante minimamente irritante.

Uma classificação prospetiva de severidade LIGEIRA é, por conseguinte, adequada

O procedimento poderia ser mais refinado?

O potencial para utilizar adjuvantes minimamente irritantes e agentes anestésicos menos aversivos deveria ser revisto regularmente através de acompanhamento da literatura e de discussão com os colegas. Poderia criar-se um programa de habituação de coelhos jovens ao manuseamento para reduzir ainda mais o *stress* (UFAW/RSPCA, 2008).

Observações clínicas

Uma vez que apenas se esperam efeitos adversos ligeiros neste estudo, foi utilizado um sistema de acompanhamento básico, isto é, o animal era verificado diariamente e as observações eram registadas, mas não se considerou necessário utilizar uma ficha de registo estruturada.

No final deste exemplo, é apresentado um exemplo ilustrativo de uma ficha de observação.

Avaliação da severidade real

Registou-se algum inchaço temporário e ligeiro num dos locais de injeção, mas sem necessidade de tratamento. O coelho deu alguma atenção aos locais de injeção durante um curto período de tempo, mas considerou-se que tal indicava apenas um ligeiro desconforto. Não se observaram «expressões faciais de dor».

Não se observaram efeitos adversos resultantes da recolha da amostra de sangue da veia da orelha.

Foi considerada adequada uma classificação da severidade real **LIGEIRA** para este animal.

Exemplo de ficha de observação

Produção de anticorpos no coelho – Ficha de procedimento e observação		
Data	Peso corporal (kg)	Observações
01/03	3,5	Pré-sangria – 5 ml da veia da orelha; nenhum efeito adverso observado
02/03		Nenhuma anomalia detetada (NAD)
06/03		NAD
07/03		NAD
08/03	3,6	Imunizado – 0,25 ml x 2 locais por via subcutânea, ligeira atenção aos locais (limpeza) durante vários minutos, depois regresso ao

		normal
09/03		NAD
10/03		NAD
11/03		NAD
12/03		Inchaço ligeiro e suave, não doloroso, no local de injeção do lado esquerdo.
13/03		Inchaço no local de injeção do lado esquerdo permanece, sem agravamento
14/03		Inchaço no local de injeção do lado esquerdo ainda presente, mas sem dor à palpação
15/03	3,6	Inchaço desapareceu, tudo normal

21/03		NAD
22/03	3,6	Imunizado – 0,25 ml x 2 locais por via subcutânea, breve atenção aos locais

28/09		NAD
29/03	3,7	NAD

30/03		Ensaio de sangria – 2 ml da veia da orelha; nenhum efeito adverso
-------	--	---

05/04		NAD
06/04	3,6	Imunizado – 0,25 ml x 2 locais

14/04	3,6	NAD
15/04		Ensaio de sangria – 2 ml da veia da orelha; nenhum efeito adverso

26/04		NAD
27/04	3,6	Sangrado sob anestesia geral, sem efeitos adversos

Deve manter-se a confirmação de que o animal foi verificado pelo menos diariamente – por exemplo no registo individual do animal (ver *supra*) ou no registo da sala.

Exemplos ilustrativos do processo de severidade

Modelo 6 – Produção e manutenção de animais geneticamente modificados (GM)

Última atualização: 05/02/2013

1. Contexto geral

A utilização de animais geneticamente modificados (GM) na investigação tem contribuído para a compreensão da função dos genes e das correspondentes proteínas. Diferentes fenótipos podem ter diversos efeitos no bem-estar dos animais, e alguns deles podem causar dor, sofrimento ou angústia. Apesar de alguns fenótipos e resultados serem previsíveis, podem ocorrer muitos traços inesperados ou secundários durante a criação de linhas GM, pelo que nem sempre é possível prever a severidade com precisão. Na prática, o fenótipo não é afetado em muitas linhas GM, e podem ser criados protocolos de avaliação para garantir a deteção de eventuais fenótipos adversos. Em alternativa, o fenótipo esperado pode ser, muitas vezes, associado a fenótipos secundários imprevistos que se manifestam em diferentes momentos e podem ser afetados por diferentes fatores ambientais.

Ao avaliar os danos efetivos ao animal, devem ter-se em conta vários fatores, como o tipo de mutação, o genótipo, o fenótipo e a estratégia de reprodução (por exemplo, evitar fenótipos homocigóticos nocivos acasalando heterocigóticos x tipo selvagem), juntamente com a natureza de eventuais procedimentos científicos ou zootécnicos adicionais e com os possíveis efeitos de todos eles. Para uma avaliação eficaz do bem-estar do animal, são necessárias observações calendarizadas sistemáticas e adequadas, tanto durante a progressão da colónia como ao longo da fase experimental de uma colónia.

As novas linhas devem ser cuidadosamente acompanhadas e sujeitas a uma avaliação-padrão do bem-estar. Todas as linhas devem ser avaliadas individualmente por pessoal devidamente qualificado e competente durante a progressão e a manutenção da colónia, devendo ser recolhidas e comunicadas quaisquer informações sobre efeitos adversos específicos observados. O pessoal certificado deve aplicar os procedimentos científicos envolvidos e, em conjunto com os tratadores, acompanhar e registar os efeitos nos animais. Devem definir-se prospetivamente os limites críticos humanos relativamente a parâmetros como a perda de peso, as condições físicas e comportamentos preocupantes, bem como a características específicas do desenvolvimento. Nenhum animal deverá ser mantido vivo se exceder o limite de severidade previsto, a menos que seja de interesse científico incontornável e, mesmo assim, apenas com autorização da autoridade competente.

A natureza, o momento e a duração das observações dependerão de uma série de fatores para além da mutação aplicada. Por exemplo, os antecedentes genéticos e as condições ambientais nas quais os animais são mantidos podem alterar significativamente a expressão do fenótipo. Estes fatores específicos devem ser registados com precisão para permitir melhores comparações entre instalações e o acompanhamento dos animais GM em geral. O ciclo de vida de cada linha numa determinada instalação também deverá ser tido em conta, uma vez que alguns fenótipos têm um início tardio e só serão observados se os animais forem mantidos durante mais tempo.

Referências

RSPCA GA Passport Working Group (2010) *GA Passports: The Key to Consistent Animal Care*. Southwater, UK: RSPCA (disponível em <http://www.rspca.org.uk/sciencegroup/researchanimals/implementing3rs/gapassport>)

Wells DJ et al (2006) *Assessing the welfare of genetically altered mice* *Laboratory Animals* **40(2)**: 111-114 (disponível em <http://www.nc3rs.org.uk/downloaddoc.asp?id=356&page=231&skin=0>)

2. Exemplos

Os três exemplos das secções 2.1 a 2.3 *infra* ilustram a forma como a severidade pode ser avaliada em murghanos GM, incluindo a revisão de marcos do desenvolvimento, do impacto processual e do desenvolvimento das colónias. Cada um dos exemplos centra-se nos princípios da avaliação da severidade, ao invés de ter em conta todos os cenários possíveis ao longo do desenvolvimento da colónia.

A criação de cada modelo seguirá procedimentos normalizados que exigem a preparação cirúrgica de machos reprodutores vasectomizados, a manipulação de embriões e a sua implantação cirúrgica em fêmeas recetoras pseudogestantes. Pressupõe-se a aplicação de boas práticas em matéria de assepsia, gestão da dor e competência do cirurgião.

A confirmação da presença em descendentes da linha fundadora ou germinal será determinada a partir de amostras de tecido obtidas como subproduto da identificação (marcas na orelha) ou pelo método menos invasivo que resulte em tecido suficiente para a avaliação do genótipo. A estratégia de fenotipagem para cada linha dependerá do gene, da área de investigação e dos efeitos previstos. A avaliação da severidade será determinada por uma série de observações normalizadas.

2.1 Modelo de murganho geneticamente modificado – *GeneA*^{tm1a(Funding)Lab}

2.1.1 Contexto geral

Foi criada uma colónia de murganhos com uma nova mutação no *GeneA*, destinada a uma linha de células estaminais embrionárias derivadas da estirpe C57BL/6N com um potencial fenotípico desconhecido. O modelo foi mantido numa estirpe definida (C57BL/6N). Uma vez estabelecida a transmissão por linha germinal dos murganhos G1, foi realizada uma avaliação básica do bem-estar utilizando 30 crias de 3-5 ninhadas de acasalamentos independentes. As crias foram acompanhadas em momentos definidos no desenvolvimento da colónia – aquando do nascimento, 14 dias após o nascimento (em conjunto com a identificação das crias e a recuperação de tecido para genotipagem) e aquando do desmame. Foi desenvolvida uma ficha de pontuação adequada com base num Regime de Avaliação do Bem-estar GM (Wells et al. 2006). Foram realizadas observações das crias pelos técnicos de experimentação animal durante o período de cativoiro, com gestores de colónias a acompanhar os rácios do genótipo. Os murganhos foram alojados em grupo após o desmame sempre que possível, em gaiolas individualmente ventiladas com camas, material de nidificação e enriquecimento ambiental adequados. Os técnicos de experimentação animal realizaram avaliações durante o período de cativoiro durante as suas interações diárias até os murganhos alcançarem maturidade sexual. Foram acompanhadas e registadas avaliações a longo prazo dos efeitos adversos no bem-estar relacionados com a idade em animais de reserva e futuros animais de reprodução. As observações foram comparadas com a estirpe de base e a sua relevância foi avaliada.

2.1.2 Avaliação prospetiva

O que é que este estudo implica que se faça aos animais?	O que sentirão os animais? Que grau de sofrimento poderá causar? O que o poderá agravar?	De que forma será possível reduzir ao mínimo o sofrimento?	
	Efeitos adversos	Metodologia e intervenções	Limites críticos
Efeitos de base da alteração genética	As alterações genéticas podem provocar efeitos adversos clínicos	Acompanhamento contínuo durante o período de cativoiro	Os animais serão sacrificados se a severidade moderada for ultrapassada

	<p>Nos casos em que estes são imprevisíveis, qualquer indicação de que os animais com a mutação se afastaram dos parâmetros físicos ou comportamentais normais (isto é, os que se sabem que ocorrem em fenótipos relacionados com o padrão genético e/ou nos controlos do tipo selvagem) pode denotar um problema de bem-estar</p>	<p>Avaliação do bem-estar em momentos definidos do desenvolvimento; nascimento, desmame e maturidade sexual</p> <p>Consoante a natureza dos efeitos adversos detetados, serão aplicados fatores atenuantes adequados, sempre que possível, como estratégias de reprodução alteradas ou refinamentos zootécnicos (por exemplo, aumento do material de nidificação para auxiliar uma termorregulação comprometida)</p>	
<p>Amostragem de tecidos para genotipagem</p>	<p>Possível dor e/ou angústia causados pela metodologia de recolha da amostra de tecido, por exemplo, perfuração/marcação da orelha ou corte da ponta da cauda</p> <p>A biopsia da cauda é utilizada vulgarmente quando são necessárias grandes quantidades de ADN, mas pode causar dor a curto e a longo prazo (a última resultante da formação de um neuroma)</p>	<p>Ao identificar animais individuais com a orelha marcada, é boa prática utilizar o tecido da orelha para genotipagem sempre que possível</p> <p>No corte da cauda, deverá ser retirada a porção mínima possível (tendo em conta que a amostragem repetida é altamente indesejável), devendo ser utilizada anestesia e analgesia conforme necessário e tratando de imediato qualquer hemorragia</p>	<p>Não aplicável, uma vez que o procedimento deve ser único, sendo improvável que sejam causadas dor ou angústia a um nível em que seria necessário o abate sem dor</p>

		É necessário estar a par da evolução de técnicas menos invasivas, avaliá-las a nível local e aplicá-las sempre que tal seja viável	
Fenotipagem	O <i>stress</i> induzido pelo manuseamento do ensaio fenotípico, por exemplo o <i>stress</i> de ser colocado num ambiente desconhecido, a administração de compostos experimentais para induzir uma resposta, o controlo de infeções, a anestesia e a contenção para imagiologia, etc.	Formação do pessoal que realiza a fenotipagem em manuseamento e observações competentes, empáticos e normalizados Utilização de anestesia durante procedimentos de imagiologia ou dolorosos. Estruturação dos testes fenotípicos para passar dos menos invasivos (por exemplo, observação do comportamento em arena aberta) para os mais invasivos (por exemplo, procedimentos que exijam anestesia)	Quando a mutação provoca uma resposta severa a um ensaio fenotípico, serão alcançados os limites críticos humanos e os animais serão sacrificados sem dor

O gene em investigação é um novo mutante com efeitos adversos desconhecidos. A experiência neste estabelecimento demonstrou que a grande maioria dos modelos similares geralmente apresentam um fenótipo ligeiro. No entanto, ocasionalmente, um modelo exhibe, inesperadamente, sinais clínicos moderados, pelo que, neste contexto, este exemplo seria classificado prospetivamente como MODERADO.

2.1.3 Resultados

Avaliação inicial em animais neonatos (após nascimento):

Cor das crias (apenas para neonatos)	Normal
Atividade das crias (apenas para neonatos)	Normal
Depósito de leite (apenas para neonatos)	Presente
Ninhada	Todas as crias conformadas com os parâmetros de base no que diz respeito à dimensão da ninhada, à sua homogeneidade e ao desenvolvimento e crescimento das crias

Os indicadores seguintes foram observados 14 dias após o nascimento e o desmame:

Aspetto global	Todas as crias são morfologicamente «normais» Sem indicação de malformações observadas
Tamanho, conformação e crescimento	Crescimento normal, de acordo com a curva padrão de crescimento para a estirpe de referência
Estado do pelo	Normal
Comportamento –	Comportamentos e interações normais entre todos os habitantes

postura, marcha, atividade e interações com o ambiente	da gaiola; não foi observada hiperatividade nem agressão.
Sinais clínicos	Nenhum detetado
Tamanho relativo	Normal em comparação com o padrão de referência
Números	A taxa de mortalidade antes do desmame foi normal tendo em conta o padrão de referência

Observações clínicas

Todas as observações e rácios em crias neonatas até ao desmame foram considerados normais em relação ao padrão genético (C57BL/6N) com murganhos homocigóticos, heterocigóticos e do tipo selvagem nascidos com rácios mendelianos normais.

Às 4 semanas de idade, os murganhos homocigóticos e do tipo selvagem de controlo (7+7) foram submetidos a uma série de testes observacionais e processuais ligeiros, como SHIRPA, dismorfologia, campo aberto, química clínica ao sangue, DEXA e Faxitron ao longo de um período de 16 semanas. No final desta experiência, a análise fenotípica evidenciou uma redução na depuração da glucose nos murganhos homocigóticos após uma prova de tolerância à glucose por via intraperitoneal (ipGTT). Apesar de a depuração da glucose ter sido reduzida durante o teste, após o procedimento todos os animais regressaram ao seu estado de base, não tendo sido observados mais efeitos adversos.

2.1.4 Análise dos resultados

Avaliação da severidade real

Após o estabelecimento da colónia, a manutenção e a progressão da colónia utilizaram murganhos heterocigóticos e companheiros da ninhada do tipo selvagem. Não foram observados fenótipos nocivos em nenhum dos murganhos utilizados para reprodução e manutenção, pelo que se

considerou que não evidenciaram efeitos adversos. Uma vez que não se espera um fenótipo nocivo, esta linha pode ser transformada em homozigótica e mantida sem autorização do projeto.

O acasalamento supramencionado de murganhos heterozigóticos x heterozigóticos produziu murganhos homozigóticos. Um grupo destes murganhos foi utilizado para um rastreio fenotípico padrão que consistiu numa série de protocolos ligeiros, incluindo a inserção de uma agulha para amostragem de sangue durante a prova de tolerância à glucose por via intraperitoneal. Foram realizados controlos no tipo selvagem ao mesmo tempo. O efeito cumulativo nos murganhos teria sido ligeiro, devido à amostragem de sangue e aos posteriores procedimentos de fenotipagem, por oposição ao efeito global da alteração genética.

Síntese

Reprodução e manutenção – sem efeitos adversos

Murganhos homozigóticos + controlo – LIGEIRO – graças aos testes de rastreio (e não ao efeito da alteração genética)

Em suma, pode considerar-se que esta linha de murganhos GM possui um fenótipo não nocivo. A reprodução de linhas estabelecidas não exigiria a autorização do projeto ao abrigo da diretiva.

2.2 Modelo de murganho geneticamente modificado – *Tg(GeneB)*^{Labcode}

2.2.1 Contexto geral

Será criada uma colónia de murganhos com uma mutação que superexpressa um transgene como modelo para estudar uma forma de cancro. A linha será criada numa estirpe de base C57BL/6N. Contudo, o início e a taxa de desenvolvimento do tumor não podem ser definidos e exigirão uma avaliação no âmbito da caracterização do modelo. Uma vez estabelecidas as linhas fundadoras, será realizado um rastreio de avaliação do bem-estar de base, tal como descrito na secção 2.1. A linha mais útil será utilizada para estudar este tipo de leucemia.

2.2.2 Avaliação prospetiva

O que é que este estudo implica que se faça aos animais?	O que sentirão os animais? Que grau de sofrimento poderá causar? O que o poderá agravar?	De que forma será possível reduzir ao mínimo o sofrimento?	
	Efeitos adversos	Metodologia e intervenções	Limites críticos
<p>Avaliação e caracterização do desenvolvimento do tumor</p>	<p>A perda de peso e a deterioração das condições evoluirão com o desenvolvimento do cancro</p> <p>Os inchaços subcutâneos podem causar desconforto e afetar o comportamento normal, a postura ou a locomoção</p> <p>Os animais podem estar mais suscetíveis a doença devido ao compromisso do sistema imunitário</p>	<p>As intervenções serão baseadas em observações diárias utilizando critérios como a perda de peso, a deterioração das condições físicas, letargia, etc.</p> <p>Observações diárias e acompanhamento da saúde geral e do crescimento do tumor</p>	<p>Os animais de reserva e reprodutores que apresentem sinais clínicos que não estejam previstos nos procedimentos experimentais, como perda de peso superior a 15%, má estado do pelo ou letargia, serão sacrificados sem dor</p> <p>O animal será sacrificado sem dor se o tumor ulcerar ou interferir com o seu comportamento, postura ou locomoção normais, ou se exceder 1,2 cm de diâmetro</p> <p>Os animais que evidenciem sinais de doença intercorrente serão sacrificados sem dor</p>

O modelo sob investigação será mutado para criar a perturbação genética prevista. O início da doença não pode ser facilmente previsto, mas os sinais clínicos podem ser predefinidos de forma a permitirem que o início seja caracterizado. O modelo, depois de caracterizado, tem de ser

mantido a fim de permitir a sua utilização durante posteriores estudos experimentais sobre potenciais tratamentos para este tipo de cancro em estudo. Com base no exposto, este exemplo seria classificado prospetivamente como MODERADO.

2.2.3 Resultados

Foram realizadas avaliações do bem-estar conforme previsto na secção 2.2 *supra*. Não foram observadas anomalias nos marcos de desenvolvimento, nem no crescimento até à maturidade sexual. A colónia foi expandida com animais de reserva e futuros reprodutores acasalados a partir das 10 semanas de idade para manter a colónia e produzir novos animais experimentais. Os animais foram acompanhados ao longo deste tempo e o desenvolvimento do tumor foi observado a partir das 18 semanas de idade em 60% dos animais com a mutação. O curso clínico da doença foi entre 4 e 6 semanas, momento no qual foi necessário sacrificar os animais.

2.2.4 Análise dos resultados

Avaliação da severidade real

Os animais portadores da mutação desenvolveram tumores em 60% dos casos a partir das 18 semanas de idade. A estratégia de reprodução determina o acasalamento de animais a partir das 10 semanas de idade. O potencial de os pares reprodutores desenvolverem tumores foi considerado suficiente para alterar a reprodução e manutenção. Os pares reprodutores foram então acasalados a partir das 6 semanas de idade e os pares dissolvidos às 12 semanas de idade com os machos reprodutores sacrificados. As fêmeas de reserva e reprodutoras foram acompanhadas diariamente para detetar sinais precoces de desenvolvimento de tumores. Os animais que não foram utilizados ou necessários foram sacrificados sem dor antes do início de sinais clínicos.

Síntese

Animais com menos de 18 semanas de idade – sem efeitos adversos

Animais a partir das 18 semanas de idade que desenvolveram tumores – LIGEIRA graças aos limites críticos clínicos precoces

Animais a partir das 18 semanas de idade que desenvolveram tumores para utilização – LIGEIRA ou MODERADA consoante a aplicação de limites críticos clínicos.

2.3 Modelo de murganho geneticamente modificado – *GeneC*^{tm1a(Funding)Lab}

2.3.1 Contexto geral

Foi criada uma colónia de murganhos com uma mutação no *GeneC*, destinada a uma linha de células estaminais embrionárias derivadas da estirpe C57BL/6N com um potencial fenotípico desconhecido, a fim de testar o comportamento e a memória. O modelo foi mantido numa estirpe definida (C57BL/6N). Uma vez estabelecida a transmissão por linha germinal dos murganhos G1, foi realizado um rastreio de avaliação de bem-estar de base.

2.3.2 Avaliação prospetiva

Tal como na secção 2.1, o gene em investigação é um novo mutante. A intenção é utilizar o modelo em futuros estudos comportamentais para testar a eficácia de novos compostos farmacêuticos. A experiência neste estabelecimento demonstrou que a grande maioria dos modelos similares apresentam geralmente um fenótipo ligeiro. No entanto, ocasionalmente, um modelo exibe, inesperadamente, sinais clínicos moderados, pelo que, neste contexto, este exemplo seria classificado prospetivamente como MODERADO.

2.3.3 Resultados

Todas as observações e rácios foram considerados normais em relação ao padrão genético deste modelo (C57BL/6N) com murganhos homocigóticos, heterocigóticos e do tipo selvagem nascidos com rácios mendelianos normais.

Às 4 semanas de idade, os murganhos homocigóticos e do tipo selvagem de controlo foram submetidos a uma série de observações e testes para avaliar a aprendizagem e a memória. Estes testes foram realizados ao longo de um período de 10 semanas. No final desta análise fenotípica, não foram observados fenótipos nocivos. O modelo foi então utilizado para testar a eficácia de novos compostos farmacêuticos.

A reprodução dos murganhos heterozigóticos produziu animais homozigóticos saudáveis que apresentavam um desempenho reprodutor semelhante ao da estirpe-padrão. Assim, para reduzir os números de animais, utilizou-se uma estratégia de reprodução de acasalamentos homozigóticos. Em contraste com o acasalamento original, em que os murganhos homozigóticos foram derivados de um acasalamento heterozigótico x heterozigótico, o novo grupo de animais homozigóticos derivados de um acasalamento parental homozigótico tinham aspeto raquítico e não alcançaram o tamanho e peso normais em comparação com os seus irmãos.

Apesar de a linha ser originalmente destinada a um modelo de comportamento e memória, foram realizadas mais análises nos tecidos e no sangue obtidos destes animais. Durante a análise dos resultados de bioquímica do sangue e a subsequente pesquisa bibliográfica, concluiu-se que o *GeneC* é uma proteína de transporte essencial que se liga à vitamina B12. A eliminação do *GeneC* resultou numa quebra do mecanismo de transporte extracelular, levando a compromissos na síntese do ADN e no metabolismo dos lípidos e proteínas. O efeito desta mutação não teria sido observado em murganhos nascidos de uma fêmea heterozigótica, uma vez que a fonte de vitamina B12 materna é transferida *in utero* através da placenta para o feto em desenvolvimento. As inativações originais deste gene tinham, por isso, B12 armazenada suficiente para lhes permitir sobreviver e desenvolver-se até, pelo menos, às 16 semanas de idade, garantido uma reprodução e fertilidade normais em comparação com a estirpe-padrão.

2.3.4 Análise dos resultados

Avaliação da severidade real

Este exemplo demonstra que a manutenção da colónia pode ter um efeito profundo e, muitas vezes, inesperado nos murganhos. Nas informações anteriormente disponíveis e nos resultados da reprodução e fenotipagem primárias, esta colónia teria parecido normal. Logicamente, manter uma colónia com uma estratégia de acasalamento homozigótico garantiria, em circunstâncias normais, a produção dos números mínimos de animais, o que é desejável para minimizar a utilização de animais. Podem ocorrer fenótipos nocivos imprevistos em linhas anteriormente mantidas como animais normais sem autorização de projeto. Como consequência dos efeitos adversos para o bem-estar dos animais neste exemplo, este modelo teria de ser colocado de novo sob autorização de projeto se se pretendesse aplicar este regime de reprodução.

Síntese

Reprodução e manutenção de acasalamentos heterozigóticos – sem efeitos adversos

Reprodução e manutenção de acasalamentos homozigóticos – severidade MODERADA para os descendentes desta geração devido a raquitismo e atraso de desenvolvimento

Exemplo 2.3 – Isto sublinha a necessidade de transferência, entre institutos, de dados precisos e úteis relativos ao bem-estar, por exemplo sob a forma de um «passaporte do murganho», quando existe a possibilidade de manifestação de fenótipos nocivos¹.

¹ RSPCA GA Passport Working Group (2010) *GA Passports: The Key to Consistent Animal Care*. Southwater, UK: RSPCA (disponível em <http://www.rspca.org.uk/sciencegroup/researchanimals/implementing3rs/gapassport>)

CONTACTAR A UE

PESSOALMENTE

Em toda a União Europeia há centenas de centros de informação Europe Direct. Pode encontrar o endereço do centro mais próximo em: https://europa.eu/european-union/contact_pt.

TELEFONE OU CORREIO ELETRÓNICO

Europe Direct é um serviço que responde a perguntas sobre a União Europeia. Pode contactar este serviço:

- pelo telefone gratuito: **00 800 6 7 8 9 10 11** (alguns operadores podem cobrar estas chamadas),
- pelo telefone fixo: **+32 22999696**, ou
- por correio eletrónico, na página: https://europa.eu/european-union/contact_pt.

ENCONTRAR INFORMAÇÕES SOBRE A UE

EM LINHA

Estão disponíveis informações sobre a União Europeia em todas as línguas oficiais no sítio Europa: https://europa.eu/european-union/index_pt.

PUBLICAÇÕES DA UE

As publicações da UE, quer gratuitas quer pagas, podem ser descarregadas ou encomendadas no seguinte endereço: <https://publications.europa.eu/pt/publications>. Pode obter exemplares múltiplos de publicações gratuitas contactando o serviço Europe Direct ou um centro de informação local (ver https://europa.eu/european-union/contact_pt).

LEGISLAÇÃO DA UE E DOCUMENTOS CONEXOS

Para ter acesso à informação jurídica da UE, incluindo toda a legislação da UE desde 1952 em todas as versões linguísticas oficiais, visite o sítio EUR-Lex em: <http://eur-lex.europa.eu>.

DADOS ABERTOS DA UE

O Portal de Dados Abertos da União Europeia (<http://data.europa.eu/euodp/pt>) disponibiliza o acesso a conjuntos de dados da UE. Os dados podem ser utilizados e reutilizados gratuitamente para fins comerciais e não comerciais.

