



Comissão
Europeia

Prestação de cuidados a animais na perspetiva de uma ciência melhor

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



**ANIMAIS GENETICAMENTE
ALTERADOS**

A Comissão Europeia não é responsável, em caso algum, pelas eventuais consequências da reutilização desta publicação.
Luxemburgo: Serviço das Publicações da União Europeia, 2022



© União Europeia, 2022

A política de reutilização dos documentos da Comissão Europeia é regida pela Decisão 2011/833/UE da Comissão, de 12 de dezembro de 2011, relativa à reutilização de documentos da Comissão (JO L 330 de 14.12.2011, p. 39). Salvo indicação em contrário, a reutilização do presente documento é autorizada ao abrigo da licença «Atribuição 4.0 Internacional (CC BY 4.0)» da Creative Commons (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). Tal significa que a reutilização é autorizada desde que seja feita uma menção adequada da origem do documento e que sejam indicadas eventuais alterações.

Para qualquer utilização ou reprodução de elementos que não sejam propriedade da União Europeia, pode ser necessário obter autorização diretamente junto dos respetivos titulares dos direitos.

Print ISBN 978-92-76-52200-3
PDF ISBN 978-92-76-52180-8

doi:10.2779/393596
doi:10.2779/782

KH-09-22-172-PT-C
KH-09-22-172-PT-N

**Quadro para os animais geneticamente alterados ao abrigo
da Diretiva 2010/63/UE relativa à proteção dos animais
utilizados para fins científicos**

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

Documento de trabalho sobre os animais geneticamente alterados, para satisfazer os requisitos previstos na diretiva

*- Substitui o documento de consenso de 22-23 de março de 2012 –
Bruxelas, 25-26 de novembro de 2021*

Em 2011, a Comissão criou dois grupos de trabalho de peritos (GTP) 1) para criar um modelo comum para a comunicação de dados estatísticos e 2) para a avaliação da severidade dos procedimentos, a fim de facilitar a aplicação da Diretiva 2010/63/UE relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos.

Como resultado deste trabalho, os pontos de contacto nacionais dos Estados-Membros para a aplicação da Diretiva 2010/63/UE aprovaram, na sua reunião de 22-23 de março de 2012, um documento de orientação sobre os animais geneticamente alterados (AGA), seguido da aprovação do sistema de avaliação do bem-estar dos AGA (incluído no anexo) na sua reunião de 11-12 de julho de 2012. Em 23 de janeiro de 2013, foi aprovada uma retificação do anexo.

No entanto, com a rápida evolução tecnológica verificada na última década e as dificuldades aparentes em alcançar um entendimento uniforme sobre quando e quais as autorizações necessárias, bem como sobre a forma de declarar os animais utilizados para criar e manter linhagens GA, a Comissão Europeia organizou uma reunião de um GTP adicional sobre a criação, reprodução e manutenção de AGA, que teve lugar em Bruxelas, em 27-28 de junho de 2018. No seguimento da reunião, foram criados vários subgrupos para elaborar quadros de avaliação do bem-estar das espécies geneticamente alteradas mais comumente utilizadas, bem como outro subgrupo para identificar os elementos de informação que devem acompanhar os AGA quando estes são enviados entre estabelecimentos ou para locais fora da UE, a fim de assegurar a existência de práticas adequadas de maneo e de prestação de cuidados que contribuam para a melhor aplicação possível das práticas de redução e refinamento.

Todos os Estados-Membros e as principais organizações de partes interessadas foram convidados a nomear peritos para darem o seu contributo e participarem nos debates. O presente documento resulta do trabalho de todos os GTP acima referidos, dos debates com os Estados-Membros e dos contributos jurídicos da Comissão. Foi aprovado pelas autoridades nacionais competentes para a aplicação da Diretiva 2010/63/UE, na sua reunião de 25-26 de novembro de 2021.

Declaração de exoneração de responsabilidade:

O texto que se segue destina-se a ajudar os Estados-Membros e outras partes afetadas pela Diretiva 2010/63/UE relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos [com a redação que lhe foi dada pelo Regulamento (UE) 2019/1010 do Parlamento Europeu e do Conselho] a chegar a um entendimento comum das disposições da diretiva e a facilitar a sua aplicação. Todas as observações devem ser consideradas no contexto da Diretiva 2010/63/UE e da Decisão de Execução (UE) 2020/569 da Comissão. O conteúdo do documento não impõe obrigações adicionais, para além das estabelecidas na diretiva.

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

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	5
PARTE 1: PROCEDIMENTOS ADMINISTRATIVOS APLICÁVEIS AOS ANIMAIS GENETICAMENTE ALTERADOS	7
1. CONTEXTO	7
2. QUADRO JURÍDICO	8
3. ATIVIDADES ABRANGIDAS PELA DEFINIÇÃO DE PROCEDIMENTO E QUE EXIGEM UMA AUTORIZAÇÃO DE PROJETO	9
4. FLUXOGRAMA DOS REQUISITOS DE AUTORIZAÇÃO DE PROJETOS PARA A CRIAÇÃO E MANUTENÇÃO DE LINHAGENS GA	17
5. TIPOS DE PROJETOS E PROCESSOS DE AUTORIZAÇÃO	19
6. ELEMENTOS ESSENCIAIS NUM PEDIDO DE PROJETO PARA EFEITOS DE AVALIAÇÃO DO PROJETO.....	21
7. ALTERAÇÕES DAS AUTORIZAÇÕES DE PROJETOS	21
PARTE 2: TRÊS R NA CRIAÇÃO, REPRODUÇÃO E MANUTENÇÃO DE ANIMAIS GENETICAMENTE ALTERADOS	23
1. DISPONIBILIDADE DE LINHAGENS EXISTENTES DE ANIMAIS GENETICAMENTE ALTERADOS .	23
2. ESCOLHA DOS MÉTODOS DE GERAÇÃO DE NOVAS LINHAGENS DE ANIMAIS GENETICAMENTE ALTERADOS.....	24
3. REFINAMENTOS NOS PROCEDIMENTOS QUE ENVOLVEM ROEDORES (MURGANHOS E RATOS)	26
<i>Superovulação.....</i>	<i>26</i>
<i>Vasectomia.....</i>	<i>26</i>
<i>Transferência de embriões.....</i>	<i>27</i>
<i>Indução e supressão da atividade genética</i>	<i>27</i>
4. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA.....	27
5. AVALIAÇÃO DO BEM-ESTAR.....	30
6. REPRODUÇÃO, PRESTAÇÃO DE CUIDADOS E MANUTENÇÃO E GESTÃO DOS EXCEDENTES.....	31
<i>Minimizar os excedentes</i>	<i>31</i>
<i>Equilíbrio entre o refinamento e a redução.....</i>	<i>34</i>
<i>Criopreservação.....</i>	<i>34</i>
PARTE 3: SISTEMAS DE AVALIAÇÃO DO BEM-ESTAR DAS ESPÉCIES GENETICAMENTE ALTERADAS MAIS COMUNS	36
1. INTRODUÇÃO	36
2. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	36
3. SECÇÃO A DO MODELO DE AVALIAÇÃO DO BEM-ESTAR PARA TODAS AS ESPÉCIES E PONTOS TEMPORAIS	39
4. SECÇÃO B DO MODELO DE AVALIAÇÃO DO BEM-ESTAR PARA ESPÉCIES ESPECÍFICAS.....	41
<i>Sistema de avaliação do bem-estar de roedores geneticamente alterados</i>	<i>41</i>

<i>Sistema de avaliação do bem-estar de peixes geneticamente alterados (peixes ósseos, teleósteos).....</i>	<i>46</i>
<i>Sistema de avaliação do bem-estar de porcos de criação e miniporcos</i>	<i>52</i>
<i>Sistema de avaliação do bem-estar de galinhas geneticamente alteradas</i>	<i>56</i>
PARTE 4: TRANSFERÊNCIA DE INFORMAÇÕES SOBRE O BEM-ESTAR DOS ANIMAIS GENETICAMENTE ALTERADOS	60
1. PRINCÍPIOS FUNDAMENTAIS	60
2. SECÇÃO C - MODELO DE TRANSFERÊNCIA PARA OS REQUISITOS DE PRESTAÇÃO DE CUIDADOS E MANEIO DE ANIMAIS GENETICAMENTE ALTERADOS	62
PARTE 5: COMUNICAÇÃO DE INFORMAÇÕES SOBRE ANIMAIS GENETICAMENTE ALTERADOS	64
1. QUADRO JURÍDICO GERAL	64
2. FLUXOGRAMA DOS REQUISITOS DE COMUNICAÇÃO DE DADOS ESTATÍSTICOS E DE EXECUÇÃO PARA A CRIAÇÃO, MANUTENÇÃO E UTILIZAÇÃO DE AGA	64
3.1. COMUNICAÇÃO DE DADOS ESTATÍSTICOS ANUAIS	66
<i>Requisitos legais relativos aos AGA e requisitos de comunicação de dados estatísticos anuais</i>	<i>66</i>
<i>Comunicação de informações sobre os animais utilizados para a criação de linhagens GA</i>	<i>66</i>
<i>Comunicação de informações sobre os animais utilizados para a manutenção de linhagens GA.....</i>	<i>67</i>
<i>Comunicação de informações sobre animais que circulam entre procedimentos, projetos, estabelecimentos e/ou Estados-Membros</i>	<i>67</i>
3.2. RELATÓRIO DE EXECUÇÃO DE CINCO EM CINCO ANOS.....	73
<i>Requisitos legais relativos aos AGA e aos relatórios de execução dos Estados-Membros</i>	<i>73</i>
<i>Animais criados, occisados e não utilizados</i>	<i>73</i>
<i>Colheita de amostras de tecidos</i>	<i>74</i>
APÊNDICES.....	79
APÊNDICE I: EXEMPLOS DE BASES DE DADOS DE LINHAGENS GA.....	79
APÊNDICE II: PEDIDO E AVALIAÇÃO DE PROJETOS PARA A CRIAÇÃO E MANUTENÇÃO DE LINHAGENS GA.....	80
<i>Introdução</i>	<i>80</i>
<i>Parte A: Exemplos ilustrativos das principais informações necessárias num pedido de projeto de AGA.....</i>	<i>80</i>
<i>A proposta do projeto</i>	<i>80</i>
<i>O resumo não técnico do projeto.....</i>	<i>81</i>
<i>Lista dos elementos referidos no artigo 37.º, n.º 1, alínea c), e no anexo VI</i>	<i>81</i>
<i>Parte B: Exemplo ilustrativo da avaliação de propostas de projetos de AGA.....</i>	<i>92</i>
APÊNDICE III: BIBLIOGRAFIA	104
APÊNDICE IV: GLOSSÁRIO.....	106

Introdução

Em 2017, os animais geneticamente alterados (AGA) representavam quase um terço (2,59 milhões) dos animais utilizados na investigação científica e em ensaios na UE¹. As espécies com mais AGA em proporção da espécie foram o peixe-zebra e o murganho, embora também tenha sido declarado um número significativo de rãs *Xenopus* spp., coelhos e ratos, bem como um menor número de outras espécies, como cobaias, cães, suínos, ovinos, galinhas domésticas e outras espécies de peixes. Sessenta e quatro por cento dos peixes-zebra e 38 % dos murganhos utilizados na investigação e nos ensaios eram geneticamente alterados.

O artigo 1.º, em conjugação com os artigos 3.º e 17.º da Diretiva 2010/63/UE relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos, a seguir designada por «diretiva», considera a criação e manutenção de um animal geneticamente alterado como um «procedimento» científico, se o nascimento ou a incubação do animal for suscetível de lhe causar dor, sofrimento, angústia ou dano duradouro equivalente ou superior ao provocado pela introdução de uma agulha em conformidade com as boas práticas veterinárias. Por conseguinte, para além dos animais utilizados diretamente em investigação e ensaios, são também abrangidos pela definição de «procedimento» os animais necessários para a criação de novas linhagens geneticamente alteradas (GA) e os utilizados para a manutenção (reprodução) de linhagens GA existentes com um fenótipo nocivo. Em 2017, sem contar com os AGA utilizados em investigação e ensaios, a criação e a manutenção de AGA ascendeu a quase 1,3 milhões de animais². Além disso, em resultado dos programas de criação e reprodução de AGA destinados a assegurar uma disponibilidade suficiente das linhagens GA necessárias, foi comunicada a occisão de 6,1 milhões de animais suplementares sem terem sido utilizados em procedimentos³.

É, por conseguinte, importante prestar atenção às técnicas de produção e manutenção de AGA, bem como às características específicas transmitidas em resultado da alteração genética, a fim de aplicar os princípios dos três R nas práticas de criação, reprodução, utilização e prestação de cuidados destes animais. Além disso, a fim de facilitar um entendimento uniforme dos requisitos da diretiva, foram consideradas necessárias mais orientações sobre os procedimentos administrativos e obrigações de comunicação de informações decorrentes da diretiva e da Decisão de Execução (UE) 2020/569 da Comissão conexa.

A parte I do presente documento de orientação estabelece o quadro jurídico e as obrigações formais ao abrigo da diretiva, além de fornecer informações sobre os elementos essenciais a incluir e especificar para efeitos de pedido e avaliação de projetos, a fim de ajudar a facilitar o cumprimento.

¹ Comissão Europeia; [Relatório estatístico de 2019, documento de trabalho dos serviços da Comissão SWD\(2020\) 10 final](#) (não traduzido para português); (2020).

² Comissão Europeia; [Documento de trabalho dos serviços da Comissão SWD\(2017\) 353 final/2](#) (não traduzido para português); (2017).

³ Comissão Europeia; [Relatório sobre a aplicação da Diretiva 2010/63/UE, documento de trabalho dos serviços da Comissão SWD\(2020\) 15 final](#) (não traduzido para português); (2020)

A parte 2 analisa a aplicação dos três R no âmbito de atividades e procedimentos relacionados com a criação e manutenção de linhagens GA, que os criadores, utilizadores, avaliadores de projetos e inspetores devem ter cuidadosamente em conta, e apresenta alguns dos princípios gerais que devem ser respeitados.

As partes 3 e 4 do presente documento de orientação incidem sobre o sistema de avaliação do bem-estar das linhagens GA que é necessário para facilitar a identificação dos efeitos da alteração genética, a fim de:

- permitir a classificação da linhagem GA consoante se considere que tem um fenótipo nocivo ou não nocivo;
- fornecer instrumentos para a monitorização da saúde e do bem-estar dos AGA;
- facilitar a prestação de cuidados e de alojamento adequados adaptados às necessidades da linhagem;
- facultar as informações sobre prestação de cuidados e de bem-estar necessárias sobre os AGA quando estiver prevista a sua transferência para outro estabelecimento.

Foram criados vários modelos para os utilizadores, a fim de fornecer orientações práticas e úteis sobre os seguintes domínios:

- **A secção A do modelo de avaliação do bem-estar para todas as espécies e pontos temporais** especifica as informações pertinentes, tais como a descrição e o nome da linhagem, a alteração genética e os pormenores da avaliação (data, avaliador), e apresenta a classificação prospetiva final da severidade atribuída à linhagem;
- **A secção B do modelo de avaliação do bem-estar para espécies específicas** apresenta em pormenor os elementos e as constatações que são específicos da espécie em avaliação;
- **A secção C - Modelo de transferência para os requisitos sobre prestação de cuidados e manejo de AGA** baseia-se nas conclusões da avaliação do bem-estar, fornecendo informações sobre as preocupações em matéria de bem-estar a ter em conta na linhagem, as necessidades específicas em matéria de alojamento e de prestação de cuidados e/ou sugestões de estratégias de refinamento.

Os três documentos em conjunto constituirão as informações necessárias que devem acompanhar os AGA que são transferidos dentro dos estabelecimentos ou entre estabelecimentos.

Por último, a parte 5 analisa as obrigações legais de comunicação de informações relacionadas com os AGA durante a criação e manutenção de linhagens e apresenta orientações adicionais para assegurar o cumprimento dos requisitos de comunicação de dados estatísticos e de relatórios de execução quinquenais.

Parte 1: procedimentos administrativos aplicáveis aos animais geneticamente alterados

1. Contexto

Desde 2011, foram convocados vários grupos de trabalho de peritos para analisar de que forma os AGA devem ser considerados no contexto da diretiva. As conclusões destes GTP resultaram na aprovação de um documento de trabalho sobre os animais geneticamente alterados⁴ e na adoção da Decisão de Execução 2012/707/UE da Comissão, que especifica, nomeadamente, o tratamento dos AGA no âmbito da comunicação de dados estatísticos.

Com base no texto da diretiva, a abordagem adotada consistia em separar as linhagens GA nocivas estabelecidas das consideradas não nocivas. O principal motivo para tal era a eliminação da necessidade de uma autorização específica de projeto e dos encargos administrativos conexos para as linhagens não nocivas em relação às quais não existia qualquer probabilidade de risco de dor, sofrimento, angústia ou dano duradouro, tal como referido na definição de «procedimento» que consta do artigo 3.º, n.º 1, da diretiva. No entanto, neste contexto, é importante referir que, independentemente de uma atividade exigir uma autorização explícita de *projeto*, todos os animais criados para fins científicos estão abrangidos pelo âmbito de aplicação da diretiva e, subsequentemente, só podem ser criados por estabelecimentos autorizados que cumpram os requisitos previstos na legislação.

Na prática, a separação entre linhagens nocivas e não nocivas causou dificuldades tanto às autoridades como aos operadores, dando origem a incoerências de práticas quanto à questão de saber se uma linhagem é ou não considerada nociva, aos critérios utilizados para a tomada de decisões e à subsequente comunicação de informações pelos Estados-Membros. Além disso, as diferentes abordagens das autorizações de projetos para a criação de novas linhagens GA (que variam entre uma autorização de projeto de linhagem única e projetos que abrangem várias linhagens GA) impediram a criação de condições de concorrência equitativas para os operadores, um dos principais objetivos da diretiva. Estas questões foram salientadas tanto no relatório de revisão da diretiva publicado em 2017⁵ como no primeiro relatório da UE sobre a aplicação da diretiva, publicado em 2020³. Os pontos de contacto nacionais dos Estados-Membros consideraram que seria benéfica uma maior clareza e orientações adicionais. Desta forma, foi incorporada maior clareza e precisão na Decisão de Execução (UE) 2020/569 da Comissão, que substitui a Decisão 2012/707/UE.

Esta primeira parte das orientações sobre AGA analisará os principais princípios e os elementos essenciais relacionados com o pedido de autorização de projetos, avaliação e autorização de projetos que têm por objeto a criação e a manutenção de AGA.

⁴ Autoridades nacionais competentes para a aplicação da Diretiva 2010/63/UE relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos; [Working document on genetically altered animals](#) (não traduzido para português); (2013).

⁵ Comissão Europeia; [Relatório nos termos do artigo 58.º da Diretiva 2010/63/UE relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos](#); (2017).

2. Quadro jurídico

A Diretiva 2010/63/UE relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos abrange, no seu âmbito de aplicação, a criação, manutenção e utilização de animais geneticamente alterados na União. A Decisão de Execução (UE) 2020/569 da Comissão fornece instruções adicionais sobre a aplicação prática.

Conforme descrito anteriormente, a diretiva abrange todos os animais utilizados para fins científicos, quer sejam geneticamente alterados (nocivos ou não nocivos) ou convencionais/de tipo selvagem. Os criadores de animais têm de dispor de autorização e exercer a sua atividade em conformidade com a diretiva. A supervisão fica a cargo das autoridades que são obrigadas a efetuar inspeções regulares aos criadores, fornecedores e utilizadores de animais. As atividades abrangidas pela definição de «procedimento» só podem ser realizadas no contexto de um projeto autorizado. A autorização de projeto só pode ser concedida com base numa avaliação favorável do projeto, realizada por uma autoridade competente. A avaliação do projeto deve garantir que o princípio dos três R é respeitado e que a autoridade está convencida de que os danos causados aos animais são justificados pelos benefícios esperados, tendo em conta considerações de ordem ética.

Para determinar quais as atividades abrangidas pelo âmbito de aplicação de um procedimento e, conseqüentemente, que requerem uma autorização de projeto, o artigo 3.º, n.º 1, da diretiva inclui na definição de «procedimento» qualquer ação destinada ou suscetível de **conduzir ao nascimento ou à incubação de um animal, ou à criação e manutenção de uma linhagem animal geneticamente modificada, suscetível de lhe causar um nível de dor, sofrimento, angústia ou dano duradouro equivalente ou superior ao provocado pela introdução de uma agulha em conformidade com as boas práticas veterinárias.**

Tal como referido na Decisão de Execução (UE) 2020/569 da Comissão, para efeitos da diretiva, os «animais geneticamente alterados (AGA)» incluem os geneticamente modificados (transgénicos, com inativação de genes ou com outras formas de alteração genética) e os mutantes por fenómeno natural ou induzido, de acordo com a definição constante do artigo 3.º, n.º 1.

Além disso, o artigo 3.º, n.º 1, prevê o limiar mínimo de dor, sofrimento, angústia e dano duradouro para além do qual a atividade é considerada «um procedimento» e requer autorização no âmbito de um projeto (artigo 12.º, n.º 2).

Nos termos do artigo 17.º, considera-se que um procedimento está terminado quando não existir mais nenhuma observação a fazer a seu respeito ou, **em relação às novas linhagens de animais geneticamente modificadas, quando já não forem observados ou esperados para a descendência dor, sofrimento, angústia ou dano duradouro** equivalentes ou superiores aos provocados pela introdução de uma agulha.

A Decisão de Execução (UE) 2020/569 da Comissão descreve ainda que uma nova linhagem é considerada «estabelecida» se a transmissão da alteração genética for estável (um mínimo de duas gerações) e tiver sido realizada uma avaliação do bem-estar. São necessários dados científicos sobre os efeitos prováveis da alteração genética e sobre o momento em que tais

alterações são suscetíveis de se manifestar. As informações/provas obtidas durante uma avaliação do bem-estar e outros dados científicos determinarão se a linhagem será classificada como nociva/não nociva quando reproduzida e mantida como linhagem estabelecida. No contexto da manutenção de linhagens estabelecidas, o artigo 1.º, n.º 2, estabelece, nomeadamente, **que a supressão da dor, do sofrimento, da angústia ou de dano duradouro graças à correta utilização** de métodos anestésicos, analgésicos ou **outros não exclui** a utilização de um animal em procedimentos do âmbito de aplicação da diretiva. **A reprodução de linhagens GA que mantêm um risco de desenvolvimento de um fenótipo nocivo** (por exemplo, risco de infeção devido ao comprometimento do sistema imunitário), **independentemente do refinamento aplicado** (condições de barreira/biossegurança), **exige a autorização de projeto** em conformidade com o artigo 1.º, n.º 2, uma vez que a aplicação do refinamento **não elimina totalmente o risco**, reduzindo-o apenas nesse contexto (as intervenções positivas necessárias para reduzir o risco).

Do mesmo modo, no que se refere às patologias esperadas com início associado à idade, pode prever-se que os efeitos adversos ocorram numa fase mais tardia da vida, à medida que os animais envelhecem, como é o caso da hipertensão. Se os animais forem occisados em determinados momentos para evitar o aparecimento de efeitos nocivos, tal não elimina o risco para a linhagem, apenas para o animal que foi occisado. Por conseguinte, estas linhagens devem ser **classificadas como nocivas**, sendo necessária uma autorização de projeto para a sua manutenção.

Em casos raros, os estudos ao longo da vida podem determinar que não há danos nem redução do tempo de vida nestas patologias com início associado à idade. Se tal for demonstrado, a linhagem poderá ser reclassificada como não nociva, não sendo necessária autorização de projeto a partir desse momento.

Por último, é importante recordar a definição de «projeto» constante do artigo 3.º, n.º 2, a saber, **um programa de trabalho com um objetivo científico definido** e que envolva um ou mais procedimentos (ver exemplos no apêndice II).

3. Atividades abrangidas pela definição de procedimento e que exigem uma autorização de projeto

Em consonância com as disposições da diretiva acima referidas, a **criação** de uma nova linhagem GA é, em princípio, considerada um procedimento, uma vez que as consequências da criação da nova linhagem nem sempre podem ser totalmente determinadas com antecedência.

Constituem exceções os casos em que se efetua o cruzamento/retrocruzamento de duas linhagens de fenótipo não nocivo e em que se pode esperar razoavelmente que a nova linhagem não resultará num fenótipo nocivo; nestas circunstâncias, pode não ser aplicável o requisito de autorização de projeto. Esta decisão deve ser claramente registada no estabelecimento onde os animais são criados. Quando é produzida descendência, é necessário confirmar que a linhagem não apresenta nenhum fenótipo nocivo utilizando uma avaliação do bem-estar, conforme

descrito na secção 3. Todos estes animais permanecem sob a proteção e o controlo do estabelecimento, à semelhança dos animais criados para fins científicos.

A **manutenção** de uma linhagem GA estabelecida é considerada um procedimento quando a linhagem é portadora de um fenótipo nocivo.

Além disso, durante a criação e manutenção de linhagens GA, são realizadas várias atividades específicas, tais como superovulação, vasectomia, transferência de embriões e colheita de amostras de tecidos para efeitos de determinação do genótipo. A maioria destas atividades é abrangida pela definição de «procedimento» que consta do artigo 3.º, n.º 1, da diretiva.

Para a colheita de amostras de tecidos, há que utilizar o método menos invasivo que forneça uma amostra de ADN adequada em termos de qualidade e quantidade, com vista à realização de um procedimento sólido de determinação do genótipo. Sempre que possível, este método deve, ao mesmo tempo, proporcionar uma identificação/marcação altamente fiável. A utilização de tecidos excedentários provenientes de um método de identificação/marcação não é considerada um procedimento [artigo 1.º, n.º 5, alínea e)].

O quadro que se segue apresenta um resumo das atividades mais comuns e em que circunstâncias estas devem ser abrangidas por uma autorização de projeto.

Atividade	Observação	Autorização de projeto necessária	Autorização de projeto não necessária
Criação de uma nova linhagem GA	Manipulação genética de gâmetas ou embriões	A criação de uma nova linhagem GA exige uma autorização de projeto.	
	Cruzamento de linhagens existentes	A criação de uma nova linhagem GA através do <i>cruzamento de linhagens diferentes com vista a criar uma nova linhagem geneticamente alterada, para a qual não é possível determinar antecipadamente o carácter não nocivo do fenótipo, exige uma autorização de projeto, tal como referido na</i> Decisão de Execução (UE) 2020/569 da Comissão (anexo III, parte B; secção B - Categorias dos dados introduzidos - ponto 8), no contexto das obrigações de comunicação de dados estatísticos sobre a utilização de animais.	Quando se cria uma nova linhagem GA através do cruzamento/retrocruzamento de duas linhagens de fenótipo não nocivo e se pode pressupor razoavelmente que a nova linhagem não resultará num fenótipo nocivo , pode não ser aplicável o requisito de autorização de projeto. Nestes casos, a autoridade competente deve ter em conta os princípios de tomada de decisões do estabelecimento e certificar-se de que existem processos para que, se as previsões se revelarem incorretas, a autorização de projeto possa ser rapidamente assegurada.
	Mutagénesse	Utiliza-se exposição química ou irradiação para induzir mutações aleatórias em células germinativas que, em muitos casos, são nocivas para a descendência. A exposição dos progenitores e da descendência exige uma autorização de projeto.	
	Mutante nocivo espontâneo	Surgem espontaneamente mutações em toda a criação, que, em alguns casos, conduzem a características nocivas que são de interesse científico. Quando os animais em causa são mantidos, criados,	Surgem mutações nocivas em animais isolados/ninhadas, que são imediatamente occisados,

		<p>fornecidos e/ou utilizados para fins científicos, é necessária uma autorização de projeto.</p>	<p>a característica nociva é identificada e os progenitores não são mais utilizados para efeitos de reprodução.</p> <p>Algumas linhagens consanguíneas de tipo selvagem apresentam características nocivas ocasionais, como hidrocefalia em murganhos B6. Estas linhagens não são mantidas para investigar a hidrocefalia. Todos os animais identificados com essa característica serão imediatamente occisados. Serão envidados esforços para reduzir a incidência da característica através da criação seletiva.</p>
<p>Manutenção de uma linhagem existente</p>	<p>Fenótipo da linhagem GA</p>	<p>Reprodução de uma linhagem de fenótipo nocivo existente.</p> <p>Linhagens que tenham uma avaliação do bem-estar (conforme descrita na parte 3) que demonstre que a linhagem apresenta um risco de fenótipo nocivo acima do limiar mínimo de dor, sofrimento, angústia ou dano duradouro durante a vida do animal.</p> <p>A reprodução de linhagens nocivas através do cruzamento entre heterozigotos ou entre heterozigoto e tipo selvagem para reduzir/eliminar o risco de exprimir um fenótipo nocivo exige na mesma uma autorização de projeto.</p>	<p>Reprodução de uma linhagem de fenótipo não nocivo existente.</p> <p>Linhagens com uma avaliação do bem-estar (descrita na parte 3) que demonstre que não é provável a ocorrência de danos acima do limiar mínimo de dor, sofrimento, angústia ou dano duradouro durante a vida do animal, por exemplo, algumas linhagens com a proteína fluorescente verde (PFV).</p> <p>Caso os animais de uma linhagem GA não nociva (ou seja, não criados ao abrigo de uma autorização de projeto) sofram efeitos adversos, a avaliação do bem-estar deve ser revista e atualizada, e a linhagem deve ser reclassificada de não nociva para nociva. A autorização de manutenção da linhagem e de criação de outros animais deve ser solicitada imediatamente à autoridade competente.</p>

	Linhagens imunocomprometidas	As linhagens imunocomprometidas são particularmente sensíveis a infeções em consequência da alteração genética e têm de ser mantidas em condições especiais de alojamento, como um ambiente biosseguro específico para as proteger, podendo também necessitar de cuidados que vão além dos necessários à manutenção da saúde e do bem-estar dos animais convencionais. Estas linhagens são definidas como sendo de fenótipo nocivo, exigindo uma autorização de projeto; Decisão de Execução (UE) 2020/569 da Comissão, anexo III, parte B, secção A «Disposições gerais», ponto 11. 7.	
	Linhagens de fenótipo nocivo com início associado à idade	Os fenótipos nocivos incluem linhagens GA com início associado à idade ; a Decisão de Execução (UE) 2020/569 da Comissão estabelece, no anexo III, parte B, ponto 11.7, que «... Estes animais incluem, entre outros, os que exigem... cuidados que vão além dos necessários à manutenção da saúde e do bem-estar dos animais convencionais».	
	Linhagens Cre-Lox	A reprodução de linhagens cruzadas Cre-Lox para exprimir o fenótipo nocivo exige uma autorização de projeto.	A reprodução de linhagens Cre ou Lox não cruzadas em que não é exibido nenhum fenótipo nocivo não requer autorização de projeto.
	Linhagens induzidas ou suprimidas	Foi administrado um agente indutor para «ativar» um fenótipo nocivo.	Linhagens nas quais a alteração genética do fenótipo só fica ativa aquando do tratamento com agentes indutores (por exemplo, tamoxifeno, tetraciclina, etc.): considera-se que estas linhagens não têm um fenótipo

			nocivo até ao momento da indução e não estão sujeitas a autorização antes da indução.
		<p>Linhagens nas quais um fenótipo de base genética é suprimido mediante o tratamento com agentes de supressão (como a tetraciclina), embora não apresentem nenhum fenótipo nocivo; por ter de ser tomada uma medida específica para manter a linhagem não nociva, torna-se necessária uma autorização de projeto.</p> <p>A Decisão de Execução (UE) 2020/569 da Comissão estabelece, no anexo III, parte B, secção A, ponto 11.7, que «... Estes animais incluem, entre outros, os que exigem... cuidados que vão além dos necessários à manutenção da saúde e do bem-estar dos animais convencionais».</p>	
	Linhagens repórteres		A presença de genes repórteres no genoma e de moléculas resultantes destes genes não resulta num fenótipo nocivo <i>per se</i> . Por conseguinte, a reprodução de linhagens nas quais apenas foram introduzidos genes repórteres não está sujeita a autorização.
Caracterização genética	Colheita de amostras de tecidos por um método invasivo	Colheita de amostras de tecidos por corte de orelha, se o corte não for efetuado para efeitos de identificação/marcação, por exemplo, quando se utiliza um método de identificação alternativo, como as micropastilhas.	Tecido excedentário da identificação/marcação de um animal (por exemplo, marcação da orelha, mas excluindo o corte da ponta da cauda ou o corte da barbatana).

		Colheita de amostras de tecidos por corte da ponta da cauda ou corte da barbatana (métodos não adequados para a identificação/marcação de indivíduos).	
		Colheita de amostras de tecidos por corte de falanges/dedos, se o corte não for efetuado para efeitos de identificação/marcação.	Tecido excedentário da identificação/marcação por remoção de uma única falange distal, nos casos em que continue a ser considerado o método mais refinado para identificar animais individuais, como em roedores neonatos.
		Amostra de sangue (método não adequado para identificação/marcação de indivíduos).	
	Método não invasivo		Tecido obtido por um método invasivo, mas apenas após confirmação da morte (<i>post mortem</i>).
			Métodos abaixo do limiar mínimo de dor, sofrimento, angústia ou dano duradouro (conforme definido no artigo 3.º, n.º 1), como a utilização de fezes e a colheita de amostras de pelo.
			Métodos de observação, por exemplo cor da pelagem, luz fluorescente UV.
Vasectomia		Procedimento cirúrgico exigido nos machos para permitir a sua utilização na produção de pseudogravidez. Apenas o procedimento cirúrgico exige autorização (o acasalamento natural subsequente não é um procedimento; ver <i>infra</i>).	

Superovulação		As injeções necessárias para fins científicos, que ultrapassam o limiar mínimo de dor, sofrimento, angústia ou dano duradouro, são, por conseguinte, procedimentos.	
Transferência de embriões		Exige a implantação cirúrgica ou a inserção de um tubo através do colo do útero (transferência não cirúrgica de embriões), acima do limiar mínimo de dor, sofrimento, angústia ou dano duradouro; trata-se, portanto, de procedimentos.	
Acasalamento natural		Acasalamento natural em que qualquer dos progenitores seja portador de um fenótipo nocivo. Quando o cruzamento gerar um fenótipo nocivo, por exemplo, os cruzamentos Cre-Lox, é necessária uma autorização de projeto para o nascimento ou a incubação da descendência (artigo 3.º, n.º 1).	Cruzamento/retrocruzamento de duas linhagens de fenótipo não nocivo e em que se pode esperar razoavelmente que a nova linhagem não resultará num fenótipo nocivo; nestas circunstâncias, o requisito de autorização de projeto não se aplica. A utilização pós-recuperação de animais vasectomizados no acasalamento para produzir pseudogravidez não é um procedimento.
Rederivação		Quando realizada exclusivamente para fins científicos , por exemplo, nos casos em que as respostas imunitárias podem ser afetadas pelo(s) agente(s) patogénico(s) presente(s), mas em que a saúde dos animais não é comprometida.	Quando realizada em benefício da saúde e/ou do bem-estar da colónia, ou seja, quando é necessário que o agente patogénico seja removido porque os animais sofrerão problemas de saúde se tal não for feito, por exemplo no caso do vírus da hepatite murina (VHM).
Criopreservação		Técnicas que utilizam animais vivos, necessárias para a criopreservação para fins científicos, quando efetuadas para a preservação de uma linhagem.	Quando efetuadas para a preservação de uma linhagem, utilizando esperma congelado de animais occisados.

Ao considerar os procedimentos individuais, a determinação da necessidade de uma autorização de projeto decorre do objetivo da atividade, ou seja, se esta é realizada para fins científicos ou em prol do bem-estar do animal ou da sua colónia. Apresentam-se seguidamente alguns esclarecimentos adicionais, recorrendo a dois exemplos:

Rederivação

Os micróbios podem ser patogénicos ou comensais. São necessárias muitas rederivações para eliminar os comensais que podem afetar a ciência. Quando a rederivação não tem em vista melhorar o bem-estar do(s) animal(ais) e é efetuada para criar ou manter animais/colónias de qualidade e consistência adequadas em prol da qualidade da ciência, considera-se que está a ser efetuada para fins científicos e deve cumprir os requisitos da diretiva, incluindo a autorização de projetos, a formação das pessoas envolvidas, etc. No entanto, se o veterinário designado determinar que a rederivação é do interesse do animal ou da colónia, a fim de eliminar os agentes patogénicos da colónia, a rederivação não é abrangida pela definição de «procedimento» e não é necessária uma autorização de projeto ao abrigo da diretiva. A rederivação em causa seria efetuada ao abrigo da legislação veterinária pertinente do Estado-Membro. A tomada de decisões e os números utilizados, entre outros elementos, devem ser declarados nos registos de saúde veterinária (Quadro para a educação e a formação, módulo 24, ponto 24.15) e os procedimentos devem ser realizados por veterinários ou pessoas elegíveis para a delegação dos mesmos (se pertinente a nível local). Tal proporciona alguma flexibilidade, mas a decisão deve ser devidamente documentada e defensável ao abrigo da legislação aplicável.

Criopreservação

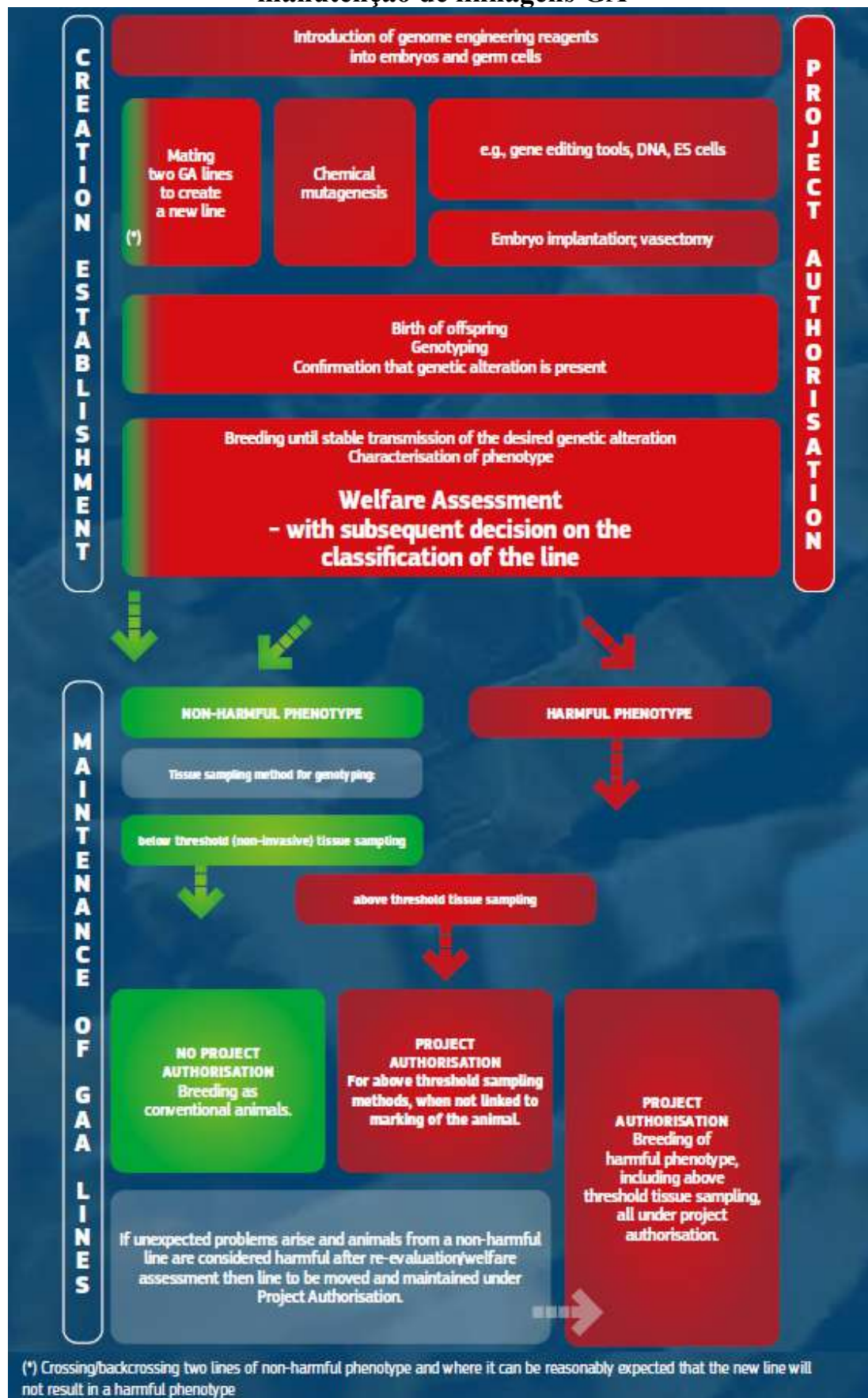
A criopreservação (superovulação com recolha de óvulos/embriões após a occisão, ou colheita de espermatozoides com congelação de gâmetas/embriões, reconstituição de uma linhagem GA específica) é efetuada com o objetivo de manter a integridade científica e a adequação de uma linhagem GA, nomeadamente para evitar a deriva genética identificada na colónia. A utilização de animais vivos para criopreservação para fins científicos exige uma autorização de projeto. A criopreservação não é abrangida pela definição de «procedimento» apenas quando é efetuada com espermatozoides congelados de animais occisos.

4. Fluxograma dos requisitos de autorização de projetos para a criação e manutenção de linhagens GA

O fluxograma da página seguinte apresenta as principais etapas desde a criação até ao estabelecimento e manutenção de uma linhagem GA, bem como os requisitos conexos de autorização de projetos (áreas assinaladas a vermelho). Pode ser transferido em formato de cartaz no seguinte endereço:

https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pubs_posters_en.htm

Fluxograma dos requisitos de autorização de projetos para a criação e manutenção de linhagens GA



5. Tipos de projetos e processos de autorização

É necessária uma abordagem uniforme para a autorização de projetos que envolvam a criação e manutenção de linhagens GA, a fim de alcançar os objetivos estipulados na diretiva de criação de condições de concorrência equitativas entre os operadores na União. Apesar dos esforços para facilitar a aplicação uniforme da diretiva, as reações dos utilizadores, em 2016, à revisão do artigo 58.º da diretiva⁵ sugeriram que se verificavam diferenças significativas nos processos de autorização de projetos no que diz respeito à produção de AGA, variando entre a exigência de uma proposta de projeto separada para cada nova linhagem GA e a maior flexibilidade oferecida por projetos genéricos múltiplos em que podem ser criadas e mantidas várias linhagens ao abrigo de uma única autorização de projeto, o que resulta em disparidades nos custos e em atrasos na realização da investigação. As respostas à revisão identificaram igualmente dificuldades na movimentação de AGA entre os Estados-Membros devido às diferentes abordagens de autorização e às classificações divergentes das linhagens (linhagem nociva *versus* não nociva), comprometendo potencialmente o bem-estar dos animais.

Desde a adoção da diretiva, as técnicas de edição genética evoluíram consideravelmente. Uma das alterações mais significativas, em resultado da introdução de técnicas CRISPR/Cas9, diz respeito à acessibilidade das novas tecnologias e à rapidez do processo de criação. Graças a esta tecnologia, podem ser criadas várias linhagens numa fração do tempo em comparação com os métodos anteriores e permitindo uma seleção progressiva das linhagens que devem continuar a ser desenvolvidas. Esta evolução, que ocorreu desde a adoção da diretiva, tem um impacto ainda maior nos processos administrativos conexos dos Estados-Membros/regiões em que um projeto é autorizado ao nível de uma única linhagem, em vez de múltiplas linhagens no âmbito de uma determinada área de doença/investigação.

Neste contexto, é importante recordar que a definição de projeto é «um programa de trabalho com um objetivo científico definido». A diretiva exige ainda que a avaliação do projeto seja efetuada com o grau de pormenor adequado ao projeto, permitindo ao mesmo tempo uma estimativa realista dos danos e benefícios esperados e assegurando a aplicação dos três R no projeto.

O artigo 38.º requer a flexibilidade necessária no que diz respeito ao grau de pormenor exigido na avaliação do projeto, e o artigo 40.º, n.º 4, e, em alguns casos, o artigo 42.º preveem a possibilidade de simplificar os processos administrativos. A criação de novas linhagens GA difere da manutenção de um AGA estabelecido para fins de produção. No entanto, há que reconhecer que, muitas vezes, os projetos incluem tanto a criação como a manutenção de linhagens GA.

O pedido de projeto deve, por conseguinte, conter um grau de pormenor suficiente para permitir que a avaliação do projeto seja realizada em conformidade com as obrigações da diretiva, minimizando simultaneamente os encargos administrativos tanto para os operadores como para as autoridades.

As alterações dos projetos relativos à criação e manutenção de linhagens GA são abordadas na secção 7.

As atividades que devem ser abrangidas por uma autorização de projeto incluem:

- A criação de novas linhagens GA (com a exceção de que, quando se cria uma nova linhagem GA através do cruzamento/retrocruzamento de **duas linhagens de fenótipo não nocivo e se pode pressupor razoavelmente** que a nova linhagem **não resultará num fenótipo nocivo**, pode não ser aplicável o requisito de autorização de projeto);
- As técnicas necessárias para a criação de novas linhagens, por exemplo vasectomia e superovulação;
- A manutenção de linhagens GA nocivas estabelecidas;
- A colheita de amostras de tecidos (independentemente do fenótipo da linhagem quando se utiliza métodos de colheita de amostras de tecidos acima do limiar para efeitos de determinação do genótipo).

Por conseguinte, é importante observar que, mesmo que a manutenção de uma linhagem de fenótipo não nocivo não exija uma autorização de projeto, é provável que o estabelecimento necessite de uma autorização de projeto para procedimentos como a colheita de amostras de tecidos por método invasivo para efeitos de determinação do genótipo.

Recomendações

A fim de harmonizar e simplificar as práticas administrativas com vista a reduzir os encargos administrativos tanto para a comunidade científica como para as autoridades, e a fim de assegurar o cumprimento dos três R, há que equacionar:

- o abandono de projetos que abrangem apenas a criação de linhagens únicas em prol de projetos que abrangem a **criação de linhagens para uma área de doença definida ou outro tema de projeto específico**;
- a combinação num único projeto de todas as atividades relacionadas com AGA, ou seja, criação, reprodução, manutenção e outros procedimentos relacionados com AGA;
- o grau de pormenor no pedido de projeto:
 - por um lado, para assegurar a cobertura suficiente de todos os elementos necessários para avaliar a conformidade do projeto com os três R e melhorar o bem-estar dos animais (incluindo os requisitos em matéria de prestação de cuidados e de alojamento);
 - por outro lado, para assegurar que as informações solicitadas se limitam aos elementos pertinentes para a avaliação dos danos e benefícios (incluindo qualquer proposta de reutilização);
- a utilização de projetos genéricos múltiplos, conforme previsto no artigo 40.º, n.º 4, da diretiva, por exemplo autorizações que abranjam várias linhagens necessárias para investigar a patogénese da doença do neurónio motor, em que os fenótipos serão semelhantes, ou que possam ser descritas de outro modo no âmbito de um programa de trabalho integrado.

6. Elementos essenciais num pedido de projeto para efeitos de avaliação do projeto

A avaliação do projeto deve garantir a conformidade com os requisitos da diretiva, nomeadamente a inclusão de todos os elementos exigidos no anexo VI da diretiva e a aplicação dos três R em relação às atividades em causa. A parte 3 do presente documento apresenta uma série de recomendações sobre formas de aplicação dos três R no âmbito de diferentes atividades relacionadas com a criação e manutenção de linhagens GA.

É importante que o pedido de projeto contenha um grau de pormenor suficiente que permita determinar se esses elementos foram devidamente tidos em conta, a fim de permitir a avaliação.

O apêndice II, parte A, apresenta exemplos do tipo de informações necessárias para um pedido de projeto de criação e manutenção de AGA, e o apêndice II, parte B, descreve as questões e os aspetos a considerar no pedido durante a avaliação do projeto (AP).

7. Alterações das autorizações de projetos

O artigo 44.º da diretiva estabelece que só são necessárias alterações das autorizações quando qualquer modificação do projeto puder ter repercussões negativas no bem-estar dos animais. Essas modificações do projeto podem resultar no aumento do número de animais, na introdução de novas espécies ou no aumento das severidades em relação às inicialmente autorizadas.

No contexto de projetos de criação e manutenção de linhagens GA, é provável que a produção de novas linhagens aumente o número de animais necessários, e a conclusão das avaliações do bem-estar poderá alterar as severidades. Nos casos em que seja possível prever novas linhagens no momento do pedido, estas podem ser incluídas como um grupo, nomeadamente linhagens que marquem neurónios ou linhagens que apresentem sinais de distrofia muscular. No entanto, haverá muitos projetos que exigirão alterações ao longo do seu ciclo de vida, por exemplo devido ao aumento da procura, a alterações das orientações científicas ou ao estabelecimento de orientações científicas adicionais.

Outro exemplo seria a necessidade de um processo para lidar rapidamente com alterações em que tenham sido identificadas questões de bem-estar adicionais para além das inicialmente consideradas. Dois exemplos possíveis:

1. Linhagens nocivas com severidade superior à prevista (por exemplo, classificação prospetiva de severidade ligeira, mas constata-se, na prática, que os animais sofrem de severidade moderada); ou
2. Efeitos nocivos inesperados numa linhagem inicialmente classificada como não nociva, exigindo que a linhagem seja incluída numa autorização de projeto.

A estrutura e o conteúdo dos pedidos de projetos e os pormenores exigidos para o processo de autorização podem ter uma influência muito significativa no número de alterações que podem ser necessárias ao longo de um período de cinco anos.

Recomendações

- ☐ Ter em conta a estrutura e os elementos essenciais do pedido para minimizar o número de alterações, permitindo simultaneamente um grau de pormenor suficiente para a realização da avaliação do projeto.
- ☐ Limitar a exigência de alterações apenas às modificações que possam ter repercussões negativas no bem-estar dos animais ou quando sejam necessárias para reavaliar a análise dos danos e benefícios.

Parte 2: Três R na criação, reprodução e manutenção de animais geneticamente alterados

Aplicação dos três R nas práticas de criação, manutenção e reprodução de AGA

Os três R (das iniciais da expressão inglesa «replacement, reduction and refinement» - substituição, redução e refinamento) devem ser tidos em conta em todas as etapas, desde o início do projeto até à criação, reprodução e fornecimento de linhagens de animais geneticamente alterados.

Esta parte 2 das orientações destaca os domínios em que a aplicação dos três R deve ser objeto de especial atenção neste contexto.

1. Disponibilidade de linhagens existentes de animais geneticamente alterados

Não deve ser criada qualquer linhagem se a mesma ou uma alternativa que permita alcançar os resultados científicos já estiver disponível. No entanto, há uma série de questões que podem dificultar a informação e o acesso às linhagens GA já existentes.

Existem várias bases de dados especializadas de linhagens GA estabelecidas. O apêndice I apresenta exemplos das atuais bases de dados. Contudo, como é frequentemente o caso, continuam a ser criadas novas bases de dados, enquanto as mais antigas são eliminadas ou não são devidamente mantidas. Além disso, não existe uma plataforma consolidada para a partilha de informações entre diferentes organizações ou estabelecimentos de investigação sobre as linhagens existentes em todas as espécies e estirpes.

Os modelos de AGA não são necessariamente partilhados entre grupos de investigação individuais dentro dos estabelecimentos, e ainda menos externamente, quer com grupos de investigação fora da própria instalação e/ou país, quer através de acesso aberto.

Podem existir questões de confidencialidade e/ou propriedade intelectual (PI) que atrasam ou, em alguns casos, impedem o acesso a tecnologias e a novas linhagens de AGA.

Além disso, o estado sanitário pode não ser adequado. Neste caso, deve ser tomada uma decisão sobre se é melhor apostar na rederivação para animais com um estatuto adequado de indemnidade de agentes patogénicos ou recriar a linhagem.

Recomendações:

- ☐ A fim de evitar duplicações desnecessárias, é necessário efetuar uma pesquisa sistemática das linhagens GA existentes nas bases de dados disponíveis antes de ser tomada a decisão de gerar uma nova. A duplicação de uma linhagem só deve ser efetuada quando houver uma justificação científica específica, uma falta de disponibilidade ou um problema de acesso a uma linhagem existente.
- ☐ É importante rever regularmente o estado das bases de dados (se são mantidas continuamente) que são utilizadas para pesquisar as linhagens existentes e assegurar

uma pesquisa exaustiva para identificar quaisquer novas bases de dados que possam ter sido criadas entretanto.

- ☐ A criação de uma plataforma comum para a partilha de informações sobre as linhagens existentes em todas as espécies e estirpes seria mutuamente benéfica para reduzir o custo da duplicação (tempo e recursos) e contribuir para a redução e o refinamento.
- ☐ Os grupos de investigação e os órgãos responsáveis pelo bem-estar dos animais (AWB - das iniciais da designação inglesa «Animal Welfare Bodies») devem rever a utilização interna de AGA, a fim de evitar duplicações no estabelecimento. Quando cada grupo dispõe de modelos comumente utilizados, a racionalização para uma única colónia de reprodução permite um melhor planeamento com vista a uma utilização mais eficiente dos animais, à redução dos excedentes e a um maior controlo de questões como a deriva genética.
- ☐ Os grupos de investigação devem equacionar o fornecimento externo de AGA, evitando a duplicação necessária para a criação e gestão de colónias de AGA que é inerente a múltiplas colónias dispersas. A consolidação das linhagens, como as que transportam recombinases específicas, alelos condicionais ou genes repórteres, melhoraria a eficiência e reduziria os excedentes a nível nacional e internacional.
- ☐ A comunidade de utilizadores deve envidar esforços no sentido de melhorar a partilha aberta de informações e o fornecimento das linhagens GA existentes para benefício mútuo e para atualizar as bases de dados a que tem acesso.
- ☐ Devem ser utilizados descritores normalizados que utilizem terminologia acordada para a nomenclatura (<http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/strains.shtml>) e o bem-estar (por exemplo, www.mousewelfareterms.org), a fim de registar informações sobre as linhagens GA e para a pesquisa das linhagens GA existentes.
- ☐ Os repositórios (bases de dados e instalações de criação/armazenamento) devem incluir informações sobre o fenótipo, a conceção da mutação, o bem-estar, o alojamento e as necessidades de prestação de cuidados. A inclusão de informações sobre se a linhagem foi classificada como um fenótipo nocivo ou não nocivo contribuiria para assegurar a coerência em toda a Europa.
- ☐ A comunidade de utilizadores de AGA deve ponderar a elaboração de estratégias para identificar e superar questões de confidencialidade e/ou PI, a fim de reduzir a duplicação desnecessária de linhagens GA.
- ☐ Deve existir um conjunto normalizado de informações que acompanhe os animais quando são transportados para um novo estabelecimento (ver parte 4 do presente documento de orientação).

2. Escolha dos métodos de geração de novas linhagens de animais geneticamente alterados

Atualmente, estão disponíveis vários métodos para gerar novas linhagens de AGA. Os métodos «tradicionais» de manipulação genética foram, em grande medida, substituídos por tecnologias de edição genética mediada por endonuclease, das quais prevaleceu a CRISPR (nucleases associadas a repetições palindrómicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas)/Cas.

Inevitavelmente, à medida que as técnicas de manipulação genética evoluem, passarão a ser utilizados métodos novos e mais controlados. O mosaicismo, as modificações imprevisíveis no sítio visado e os efeitos fora do alvo continuam a ser problemas potenciais. Poderá ser necessário recorrer a especialistas para ultrapassar/minimizar estes problemas. A utilização de transgênese aleatória tem de ser bem justificada, devido aos resultados imprevisíveis da integração não direcionada na codificação ou no sistema regulador do genoma. No entanto, as células estaminais embrionárias continuam a desempenhar um papel na criação de novos modelos, quando visam alterações complexas do genoma, em especial a recombinação homóloga de segmentos mais longos do genoma.

A tecnologia CRISPR/Cas9 promoveu e permitiu a criação de novos AGA, de uma forma que facilita a criação de uma nova linhagem por parte de muitos cientistas, comparativamente à utilização das metodologias preexistentes.

Geralmente, as necessidades científicas determinarão qual o método a utilizar. Cada método apresenta diferentes desafios e oportunidades, tanto para a ciência como para a aplicação dos três R, em especial o número de animais necessários. O número de animais é igualmente afetado pela complexidade do modelo pretendido, ou seja, quantas manipulações genéticas concomitantes são necessárias.

Devem existir sistemas para validar os genes de interesse e as regiões de inserção/supressão, e as linhagens de reprodução devem ser sempre rastreáveis através de documentação clara.

Os ensaios de determinação do genótipo devem ser específicos para a alteração genética da estirpe (ou seja, específicos do alelo) e não para um transgene comum, como CRe, PFV, neo, etc., uma vez que estas sequências genéticas são comuns nas reservas laboratoriais e um ensaio genérico não identificará se houve mistura das estirpes que as transportam.

Recomendações:

- ☐ Convém analisar de que forma a manipulação precisa pelo método escolhido para gerar novas linhagens é otimizada e os eventos moleculares indesejados podem ser rastreados e controlados. Se, a nível local, não estiverem disponíveis conhecimentos especializados em controlo da qualidade genética para garantir uma produção eficiente e eficaz, deve ponderar-se a possibilidade de o adjudicar a terceiros.
- ☐ Deve haver uma validação cuidadosa de que o gene de interesse satisfaz as necessidades científicas.
- ☐ Independentemente do método escolhido, é necessária uma componente de garantia da qualidade para assegurar a estrutura da mutação pretendida durante a criação de novas linhagens e que o programa de reprodução a mantenha conforme previsto. Importa considerar os aspetos ligados à garantia da qualidade como parte da conservação da integridade genética do modelo em curso de produção.
- ☐ Deve evitar-se a expansão do fornecimento de animais de linhagens não estabelecidas e/ou bem caracterizadas.
- ☐ A fim de assegurar uma boa integridade genética, devem ser adotados protocolos sólidos de determinação do genótipo e sequenciação que possam validar a linhagem.

3. Refinamentos nos procedimentos que envolvem roedores (murganhos e ratos)

Existem amplas oportunidades para aplicar o refinamento durante procedimentos comuns realizados para efeitos de criação e manutenção de linhagens GA. Uma vez que o impacto destes elementos varia (por exemplo, em função da idade ou da linhagem), é importante que as escolhas relativas aos elementos a seguir enumerados sejam discutidas e equacionadas caso a caso.

Superovulação

- A estirpe de base pode ter impacto no número de descendentes produzidos e, por conseguinte, no número de animais utilizados. No entanto, o fator mais importante é o requisito científico para a estirpe de base final na qual é necessária a alteração genética, a fim de otimizar a produção e evitar o retrocruzamento;
- A produção de oócitos e embriões é igualmente afetada pela idade e pelo peso das fêmeas. Para a superovulação, uma fêmea imatura fornece mais oócitos e é preferida quando se produz oócitos destinados a fertilização *in vitro* (FIV) ou embriões destinados a criopreservação. Por conseguinte, são recomendadas fêmeas jovens que não tenham ovulado. A maioria das unidades não emparelharia fêmeas jovens (pequenas) com machos grandes potencialmente demasiado fortes;
- Para efeitos de criopreservação, deve ponderar-se a utilização de espermatozoides colhidos de machos occisados antes de se proceder à criação e congelação de embriões. Trata-se de um método mais refinado que resulta numa redução do número de animais necessários para arquivo;
- Deve ser assegurado um regime de estimulação hormonal adequado e mais refinado, incluindo tempo/intervalo, idade e peso ideais das fêmeas, tendo em conta as necessidades científicas e de bem-estar dos animais.

Vasectomia

- Considerações para a utilização de machos estéreis:
 - o o desempenho global de acasalamento de animais geneticamente estéreis (potencialmente reduzidos) *versus* animais vasectomizados, e
 - o impacto sobre o número, se for necessário manter uma colónia de reprodução para fornecer os machos geneticamente estéreis (o que pode resultar num aumento do número de animais excedentários, a menos que sejam utilizados para outros fins);
- Caso seja necessário preparar machos vasectomizados, devem ser consultados os dados científicos mais recentes para determinar se a incisão escrotal deve impor-se à abordagem abdominal;
- Para assegurar um acasalamento eficiente e a produção de fêmeas pseudográvidas, o desempenho dos machos deve ser monitorizado e os machos devem ser substituídos, conforme necessário, para garantir o vigor e a eficácia.

Transferência de embriões

- A escolha da estirpe de base tem impacto na capacidade de maternidade/criação;
- Deve selecionar-se a idade e o peso dos machos utilizados para induzir a pseudogravidez, a fim de evitar quaisquer impactos negativos no bem-estar das fêmeas;
- Utilização de transferência de embriões cirúrgica *versus* não cirúrgica (NSET): embora possa parecer que a NSET é o método mais refinado, não é atualmente adequado para embriões muito precoces (0,5 dias após a fertilização), relativamente aos quais as taxas de sucesso são baixas. No entanto, deve ser equacionada para as fases embrionárias pré-implantação mais tardias;
- Abordagem cirúrgica: é possível implantar embriões por meio de uma incisão única ou bilateral. As possibilidades devem ser examinadas com o parecer do veterinário designado, tendo em conta os êxitos esperados de cada abordagem e os diferentes impactos no bem-estar.

Indução e supressão da atividade genética

- O facto de o fenótipo nos mutantes induzíveis poder ser ativado imediatamente antes da utilização prevista e não estar presente durante toda a vida do animal pode contribuir para o refinamento, reduzindo o período durante o qual os animais sentem dor, sofrimento, angústia ou dano duradouro. Porém, há que ter em conta que as substâncias administradas para a supressão e indução da expressão genética (por exemplo, tamoxifeno) podem, elas próprias, causar efeitos secundários indesejados, como a perda de peso;
- Sempre que um animal apresente um fenótipo nocivo, o aparecimento de qualquer característica prejudicial deve ser gerido com um conjunto de cuidados bem definido e/ou com limites críticos humanos aplicados de forma rigorosa.

4. Caracterização genética

A caracterização genética é necessária para confirmar o genótipo pretendido do animal. É essencial que a caracterização ocorra não só no momento da criação, mas também para preservar o genótipo necessário com reprodução e manutenção. Devem ser tomadas precauções para evitar o cruzamento acidental, especialmente em sistemas de gaiola aberta. Existe potencial de contaminação inadvertida. A formação correta dos investigadores, incluindo em matéria de boas práticas de manuseamento e utilização de gaiolas seguras, a seleção e o registo exatos dos animais, bem como a implementação de um sistema sólido de informação relativa à gestão da reprodução, deverão minimizar a reprodução «acidental» e salientar a importância da qualidade/deriva genética.

Com o passar do tempo, verificar-se-á uma deriva genética. A atualização regular para uma estirpe de base geneticamente controlada ou das reservas criopreservadas é a melhor prática na gestão de todas as linhagens GA. Ao gerar uma linhagem no estabelecimento próprio ou recorrendo a um fornecedor, há que ter o cuidado de trabalhar com uma estirpe de base definida. Quando se recebem animais ou se trabalha com linhagens antigas, estas devem ser cuidadosamente analisadas antes de serem utilizadas para produzir dados científicos.

A utilização de painéis de integridade genética para avaliar a integridade da estirpe de base é essencial do ponto de vista dos dados científicos, a fim de evitar quaisquer fatores de confusão. Esse cuidado com a qualidade genética deve ser comunicado e publicado, se for caso disso, e incluído na documentação de transferência, com vista a assegurar às instituições ou organizações destinatárias o controlo de qualidade aplicado a qualquer modelo de AGA.

A caracterização genética pode ser realizada de várias formas distintas, desde métodos não invasivos (por exemplo, observação) até métodos altamente invasivos que utilizam a colheita de amostras de tecidos [por exemplo, corte da cauda ou falange (dedo)]. Convém utilizar a metodologia mais refinada, de forma condizente com um resultado científico exato.

Para efeitos de verificação do genótipo, podem ser colhidas amostras de animais que morram ou sejam occisados na colónia, como é o caso dos animais excedentários.

Em alguns casos, mesmo que de forma invasiva, o tecido pode ser obtido como subproduto da marcação de um animal (por exemplo, corte de orelha). Nos termos da diretiva, a marcação do animal para identificação não é abrangida pela definição de procedimento e, por conseguinte, não exige que seja efetuada ao abrigo de uma autorização de projeto.

O relatório da UE sobre a aplicação da diretiva forneceu, pela primeira vez, algumas informações sobre os métodos utilizados para a caracterização genética dos AGA. No entanto, devido à falta de dados de qualidade suficiente sobre outras espécies, só foi possível analisar as informações referentes a murganhos. Os resultados indicaram que, em 2017, mais de metade das amostras de tecido foram obtidas como material excedentário da identificação/marcação do animal (89 % do corte de orelha e 11 % do corte da falange). Uma parte significativa dos animais foi submetida a colheita de amostras invasiva ao abrigo da autorização de projeto, que não era de tecido excedentário da marcação, e afigura-se que a biopsia da cauda é um método comum neste grupo. Parece provável que, em grande parte, este método possa ser imediatamente substituído por um método mais refinado.

A utilização de metodologias não invasivas de colheita de amostras (abaixo do limiar mínimo de dor, sofrimento, angústia ou dano duradouro que exige autorização de projeto) representou menos de 2 % de toda a colheita de amostras, tendo a utilização de material *post mortem* correspondido à maior parte desta categoria, com alguns casos de recurso à observação, à exposição a condições de iluminação específicas ou à colheita de amostras de pelo.

No que diz respeito aos métodos invasivos de colheita de amostras de tecidos ao abrigo da autorização de projeto, a biopsia da cauda seguida da biopsia da orelha foram os mais comuns (65 % e 20 %, respetivamente). Porém, a biopsia da falange distal representou ainda 13 % dos métodos invasivos. É importante observar que alguns Estados-Membros já não autorizam, ou desincentivam fortemente, a utilização da biopsia da falange distal para a colheita de amostras de tecidos. Nos casos em que é necessário efetuar a determinação do genótipo na primeira semana de vida, a amputação da falange distal e a amputação da ponta da cauda podem ser os únicos métodos possíveis para os murganhos. Nos murganhos imaturos, as vias de dor não estão totalmente desenvolvidas. Há que apresentar as razões específicas pelas quais os métodos escolhidos são os mais refinados.

Tal como acontece com todas as tecnologias, quanto mais desenvolvido e comum se tornar o método, mais eficiente será a sua aplicação. É essencial uma produção rápida de resultados para melhorar a gestão das colónias e o planeamento dos estudos, bem como para garantir que os animais sejam utilizados eficazmente numa idade ideal.

Outras questões a equacionar para reduzir e refinar os efeitos no animal incluem:

- a utilização de marcadores fluorescentes (não invasivos) para indicar quando o gene está presente;
- a utilização de tecidos de animais occidados no processo de quarentena ou de rederivação;
- a colheita de amostras de animais reprodutores redundantes abatidos;
- o tecido colhido é o mais pequeno possível;
- a escolha do método analítico:
 - o uma maior exatidão permite uma dimensão muito reduzida da amostra;
 - o a fiabilidade do método elimina a necessidade de um segundo ensaio/colheita de amostras;
- a conservação de uma parte do tecido em caso de necessidade de uma repetição da análise/nova amostra;
- se for necessária, a técnica de biopsia da cauda é realizada antes de a ossificação e a inervação estarem numa fase avançada (animais jovens);
- a utilização de anestesia e/ou analgesia local e/ou geral conforme necessário, a fim de assegurar a metodologia mais refinada para cada método de colheita de amostras de tecidos;
- no caso do peixe-zebra, a determinação do genótipo das larvas permite remover os animais excedentários inadequados antes da alimentação independente;
- uma análise rápida que reduza para um ou dois dias o tempo em que os peixes devem ser mantidos num único alojamento é uma prática de refinamento utilizada por algumas instituições.

Recomendações:

- ☐ Sempre que possível, devem ser utilizados métodos não invasivos de colheita de amostras de tecidos para determinação do genótipo.
- ☐ Quando forem necessários métodos invasivos, há que utilizar os métodos mais refinados (menos severos). A colheita de amostras da cauda pode, quase sempre, ser substituída por um método mais refinado, pelo que será necessária uma justificação muito boa para que possa ser autorizada.
- ☐ A obrigação de refinar os métodos de colheita de amostras de tecidos deve ser sistematicamente tida em conta pelas pessoas responsáveis por colónias, pelos estabelecimentos (por exemplo, órgãos responsáveis pelo bem-estar dos animais) e pelas autoridades encarregadas da avaliação dos projetos.
- ☐ Quando forem utilizados métodos invasivos para a identificação/marcação dos animais (por exemplo, entalhe/punção da orelha), estes devem fornecer tecidos excedentários para efeitos de determinação do genótipo.

- ☐ Os avaliadores dos projetos devem assegurar que é apresentada uma justificação adequada para a utilização de métodos invasivos não destinados à marcação.
- ☐ Os órgãos responsáveis pelo bem-estar dos animais têm um papel a desempenhar na obtenção e partilha de informações sobre novos métodos não invasivos de colheita de amostras de tecidos [por exemplo, colheita de amostras oculares (lágrimas) não invasiva] e técnicas de refinamento dos métodos invasivos de colheita de amostras de tecidos.
- ☐ Quando se utiliza a colheita de amostras de tecidos por um método invasivo, deve ponderar-se a utilização de analgesia/anestesia (tendo em conta os potenciais danos adicionais causados pela aplicação do anestésico/analgésico).
- ☐ A utilização da biopsia da falange distal exclusivamente para efeitos de colheita de amostras de tecidos deve ser descontinuada.
- ☐ Uma vez que a biopsia da cauda, a biopsia da orelha e a remoção de uma parte ou da totalidade de um dígito continuam a ser os métodos mais comumente utilizados na UE, as inspeções devem determinar sistematicamente se estão a ser utilizados os métodos mais refinados de identificação/marcação e de colheita de amostras de tecidos.
- ☐ Os estabelecimentos devem criar sistemas que garantam o envio rápido dos resultados referentes ao genótipo.
- ☐ Os estabelecimentos devem ponderar se é mais eficaz e eficiente a prestação de serviços de determinação do genótipo no âmbito da sua organização ou a utilização de serviços externos profissionais para esse efeito.

5. Avaliação do bem-estar

Uma avaliação exaustiva do bem-estar identificará as preocupações nessa matéria, que podem ser resolvidas através da aplicação de estratégias de refinamento (ou redução), incluindo o estabelecimento de limites críticos humanos.

Uma avaliação do bem-estar fornece informações sobre se são ou não necessários requisitos adicionais em matéria de manuseio e/ou de prestação de cuidados. Além disso, contribui para diferenciar entre linhagens nocivas e não nocivas e para a classificação da severidade das linhagens nocivas na autorização de projeto.

A alteração genética aplicada ao animal pode resultar em fenótipos nocivos inesperados. Perante um efeito/problema de saúde pontual, há que ter em conta se está ou não relacionado com um efeito genético em consequência da manipulação genética. Poderão ser necessários outros diagnósticos e o veterinário designado deve participar nesses debates. No entanto, em muitos casos, os sinais consistentes repetidos que se desenvolvem numa linhagem são sugestivos de origem genética. Além disso, as alterações do ambiente também podem influenciar a natureza e o aparecimento de sinais clínicos e a aplicação de limites críticos humanos.

Recomendações:

- ☐ A natureza e o calendário das avaliações devem basear-se na natureza e no momento de aparecimento esperados do impacto clínico da alteração genética.
- ☐ Devem ser tomadas precauções para monitorizar todos os aspetos do bem-estar dos animais e, nos casos em que tenham impacto no bem-estar dos animais, deve assegurar-se o seu devido registo e gestão.
- ☐ A avaliação deve permitir a separação entre o efeito genético e os efeitos normais de base/maneio, incluindo a função reprodutora, nomeadamente as taxas de perda antes do desmame.
- ☐ A estirpe de base ou a linhagem de referência correspondente deve ser utilizada como modelo de comparação para garantir que os fenótipos não são confundidos por características de base.
- ☐ As avaliações do bem-estar devem ser repetidas em caso de alteração do ambiente (incluindo uma mudança de estabelecimento).
- ☐ As avaliações do bem-estar também devem ser repetidas se forem observados novos sinais persistentes na linhagem (incluindo uma idade diferente dos animais).

A secção relativa aos sistemas de avaliação do bem-estar (ver parte 3 das presentes orientações) apresenta informações mais pormenorizadas sobre o número de animais e os parâmetros clínicos a incluir na avaliação do bem-estar, além de propor modelos normalizados para melhorar a coerência.

6. Reprodução, prestação de cuidados e manutenção e gestão dos excedentes

Minimizar os excedentes

Na UE, em 2017, 12,6 milhões de animais criados para fins científicos foram occisados sem serem utilizados. Quase 49 % eram provenientes da criação de novas linhagens GA ou da manutenção de linhagens GA existentes.

Alguns animais são criados especificamente para utilização dos seus órgãos e tecidos. Porém, com base nas informações atualmente disponíveis de alguns Estados-Membros, esses animais representam cerca de 10 % dos animais criados e occisados sem serem utilizados em procedimentos. Atualmente, não se sabe quantos dos animais criados para utilização dos seus órgãos/tecidos são geneticamente alterados.

As orientações para a gestão otimizada das colónias (por exemplo, o número ideal de pares/trios reprodutores para a manutenção de linhagens GA, incluindo regimes de reprodução, número de ninhadas, etc.) apoiam a minimização do número de animais. Várias organizações e Estados-Membros publicaram orientações úteis sobre como minimizar os excedentes e melhorar a eficiência da reprodução de AGA.

Foram criados instrumentos de autoavaliação para analisar a eficiência de alguns aspetos da reprodução de AGA. Há uma série de fios condutores comuns nas orientações publicadas que se destinam a melhorar a eficiência da produção e a minimizar os excedentes.

A gestão eficaz das colónias inclui um leque de considerações, que devem ser utilizadas para aferir as boas práticas, nomeadamente:

- uma pessoa identificada como principal gestor da colónia para cada colónia;
- revisões regulares do desempenho e da gestão das colónias a nível de cada colónia e a nível do estabelecimento;
- formação e apoio aos gestores de colónias para os dotar das competências de que necessitam, manter as suas competências atualizadas e prestar-lhes assistência em situações difíceis;
- definição de indicadores de desempenho reprodutivo para cada colónia, adequados à estirpe, e monitorização regular/contínua desses indicadores;
- uma metodologia de avaliação das tendências, preferências e fenótipos específicos das estirpes para o planeamento e a criação de condições ideais para essas estirpes;
- ter em conta os requisitos ambientais para cada estirpe e, se necessário, proceder a adaptações específicas;
- ponderação da estratégia ideal para a manutenção das colónias, equilibrando as necessidades genéticas com os condicionalismos práticos;
- apreciação dos controlos ideais para os cruzamentos experimentais;
- evitar a duplicação de colónias, disponibilizando-as entre grupos de investigação;
- cálculo da dimensão das colónias, que deve basear-se no número necessário para satisfazer as necessidades científicas e no desempenho reprodutor da linhagem. As necessidades científicas incluirão a idade, o peso, o sexo e o número exigido num calendário específico. O desempenho reprodutor incluirá uma análise do sucesso do acasalamento, da dimensão da ninhada, das taxas de mortalidade, do genótipo, da vida reprodutora e da estratégia de substituição dos animais reprodutores;
- uma avaliação para determinar se os animais excedentários criados podem ser utilizados noutros estudos, ou como fonte de órgãos/tecidos, particularmente em relação à descendência de tipo selvagem, por exemplo se a descendência de tipo selvagem de uma estirpe de base adequada pode ser utilizada para criar linhagens celulares ou para estudos-piloto noutro projeto. Poderá ser necessário dispor de autorizações adequadas;
- para melhorar a validade científica, ambos os sexos devem ser utilizados sempre que não seja necessário um só sexo para o resultado experimental, reduzindo assim o desperdício de AGA.

A utilização de mutantes condicionais (por exemplo, Cre-Lox) e a utilização de mutantes induzíveis (por exemplo, por tamoxifeno) podem contribuir para o refinamento. O facto de o fenótipo nos mutantes induzíveis poder ser ativado imediatamente antes da utilização prevista e não estar presente durante toda a vida do animal pode contribuir para o refinamento, reduzindo o período durante o qual os animais sentem dor, sofrimento, angústia ou dano duradouro.

Quanto mais complexas ficarem as linhagens (por exemplo, mutações duplas ou triplas), menor será a frequência provável da combinação genética pretendida, o que resulta no conseqüente aumento do número de animais com genótipo inadequado, aumentando o número de animais excedentários. Embora alguns destes outros genótipos sejam frequentemente utilizados como

controles para o genótipo múltiplo de interesse principal, mesmo com uma reprodução otimizada, são expectáveis alguns excedentes nestes casos. Sempre que possível, o programa de reprodução deve incluir a prevenção de rácios mendelianos baixos para os animais a estudar. Deve ponderar-se a fixação de alelos, por exemplo tornando um alelo homozigótico, enquanto o outro permanece heterozigótico, com vista a reduzir o rácio mendeliano de 1 em cada 16 para 1 em cada 4 animais em estudo.

Por último, o arquivo de gâmetas e/ou embriões congelados ajuda a reduzir o número de animais criados para manter linhagens que não estão atualmente a ser utilizadas em procedimentos. Facilita igualmente a partilha de linhagens GA entre os investigadores, proporcionando novas oportunidades de redução.

Recomendações:

- ☐ Convém nomear uma pessoa em cada estabelecimento para garantir que os três R são aplicados de forma eficaz no contexto da criação e da reprodução de AGA.
- ☐ Deve ser nomeado um coordenador de AGA, especialmente em estabelecimentos de maior dimensão com vários programas científicos independentes e/ou instalações para animais, a fim de manter um panorama da procura e da disponibilidade de linhagens GA no estabelecimento.
- ☐ Os sistemas de gestão de colónias devem permitir, e ser utilizados para facilitar, uma melhor correspondência entre a oferta e a procura.
- ☐ Monitorização e melhoria da eficiência da reprodução e criação de linhagens/estirpes GA, através da elaboração de parâmetros de referência internos e da utilização de autoavaliações regulares e periódicas dentro e entre estabelecimentos, por exemplo por órgãos responsáveis pelo bem-estar dos animais.
- ☐ É importante estabelecer uma monitorização regular da qualidade genética para a deteção precoce de, nomeadamente, deriva genética/contaminação acidental, e devem existir estratégias de resolução.
- ☐ Convém utilizar estirpes de base adequadas na criação de novas linhagens, a fim de evitar, tanto quanto possível, a necessidade de retrocruzamentos.
- ☐ A descendência de progenitores geneticamente alterados cujo genótipo seja determinado como sendo de tipo selvagem deve ser equacionada para utilização/reutilização para outros fins, nomeadamente o fornecimento de sangue/tecidos ou para fins educativos ou de formação, com vista a reduzir os excedentes.
- ☐ Quando forem necessários modelos complexos com múltiplas alterações genéticas, há que prestar muita atenção às estratégias de reprodução e assegurar o seu devido planeamento, equacionando a mistura de diferentes bases genéticas, controles e números de animais reprodutores.
- ☐ As linhagens GA devem ser arquivadas sob a forma de gâmetas e/ou embriões congelados quando não forem necessárias para experiências em curso como parte da rotina dos processos ou dos programas científicos do estabelecimento que produzem AGA.

- ☐ As linhagens GA devem ser transferidas entre estabelecimentos utilizando gâmetas e/ou embriões em vez de animais vivos.
- ☐ Há que equacionar a utilização de reprodutores comerciais, uma vez que é possível obter uma redução global economizando na escala da colónia.

Equilíbrio entre o refinamento e a redução

A manutenção de linhagens homozigóticas nocivas reduzirá o número de animais necessários para satisfazer a procura. Embora as linhagens nocivas mantidas em colónias heterozigóticas reduzam o número de animais que sofrem danos, será necessário aumentar o número de animais para manter a colónia. A reprodução de linhagens através do cruzamento entre heterozigotos ou entre heterozigoto e tipo selvagem reduzirá o risco de expressão de um fenótipo nocivo, mas o número de animais será maior. Estes cruzamentos carecem ainda de autorização. Considera-se geralmente que a utilização de mais animais com menores danos é mais ética.

Recomendações:

- ☐ Nos casos em que os problemas de bem-estar sejam observados apenas em animais homozigóticos, deve ponderar-se a utilização de animais heterozigóticos para fins de reprodução. Esta estratégia pode aumentar o número de animais excedentários, mas reduzirá o sofrimento global.
- ☐ Na reprodução de cruzamentos complexos de AGA, o método de produção deve ser cuidadosamente planeado para minimizar os excedentes.
- ☐ Ambos os sexos devem ser utilizados para melhorar a validade científica e reduzir o desperdício, sempre que não seja necessário um só sexo para o resultado experimental.

Criopreservação

A criopreservação oferece vários benefícios no contexto da exploração, proteção e partilha de linhagens GA.

Deve ser equacionada sempre que haja um período em que não sejam necessários animais.

A criopreservação também facilita e promove o intercâmbio de linhagens de forma favorável ao bem-estar, por meio do transporte de gâmetas ou embriões e não de animais vivos. Pode também ser utilizada para melhorar o estado sanitário de uma colónia e, durante a utilização ativa da linhagem, para melhorar a integridade genética. A deriva genética é travada pela criopreservação. Não são necessários animais para a manutenção da linhagem, pelo que a criopreservação contribui para uma redução global dos potenciais excedentes. No entanto, serão necessários alguns animais para restaurar a linhagem.

A criopreservação deve ser parte integrante do plano de emergência da instalação de reprodução de AGA, para que, por exemplo, se uma instalação para animais for destruída num incêndio ou se ocorrer um surto de doença grave na colónia, esteja disponível material suficiente em câmara frigorífica para permitir o estabelecimento de uma nova colónia.

Recomendações:

- ☐ Todas as partes envolvidas na criação e reprodução de AGA devem ter acesso a serviços de criopreservação.
- ☐ Importa ter em conta os números e os custos de bem-estar associados à manutenção das colónias por oposição à criopreservação.
- ☐ É oportuno efetuar uma revisão regular das colónias reprodutoras e das estratégias de criopreservação em vigor nos casos em que as estirpes deixem de ser necessárias.
- ☐ A fim de apoiar o refinamento e a redução, deve ponderar-se a utilização da congelação de esperma em detrimento da congelação de embriões.
- ☐ A criopreservação deve ser utilizada para facilitar a distribuição e a partilha de modelos de AGA.

Parte 3: Sistemas de avaliação do bem-estar das espécies geneticamente alteradas mais comuns

1. Introdução

O facto de uma linhagem ser de fenótipo nocivo ou não nocivo tem consequências diretas nos requisitos regulamentares relativos à reprodução e manutenção da linhagem em causa e nas obrigações de comunicação subsequentes. Estas questões são discutidas mais pormenorizadamente nas partes 1 e 5 das presentes orientações.

É necessária uma avaliação do bem-estar de cada nova linhagem GA criada, para que possam ser fornecidas todas as informações necessárias para a prestação de cuidados e o alojamento adequados para a linhagem em causa. Além disso, a avaliação do bem-estar constitui a base de um documento de transferência, para que todas as informações críticas sejam transmitidas, juntamente com os animais, a um novo estabelecimento ou a um novo grupo científico dentro do mesmo estabelecimento. Por último, em combinação com os efeitos genéticos previstos no animal (por exemplo, maior suscetibilidade à diabetes ou risco de infeção), permite determinar se uma linhagem GA estabelecida pode ser inicialmente classificada como tendo um fenótipo não nocivo ou nocivo.

O êxito de um sistema de avaliação do bem-estar depende da seleção de indicadores que:

- sejam pronta e fiavelmente reconhecíveis;
- sejam eficazes na realização de boas medições do bem-estar;
- sejam pertinentes para a espécie e estirpe (se for caso disso), a fase de desenvolvimento e o estudo científico;
- sejam práticos de aplicar e não perturbem excessivamente o animal; e
- permitam uma medição, interpretação e análise consistentes.

Uma abordagem comum para registar observações clínicas é, por conseguinte, um objetivo desejável, uma vez que ajuda a criar abordagens consistentes de classificação da severidade. Desta forma, facilita-se a realização de comparações de descobertas clínicas entre estudos e informa-se as partes envolvidas na avaliação da severidade, podendo também ser utilizada para reduzir a severidade.

2. Considerações gerais

Não devem ser criados mais animais para efeitos da avaliação do bem-estar. A avaliação deve basear-se exclusivamente na observação do animal, e os animais não devem ser expostos a quaisquer intervenções ou outras manipulações que possam provocar dor, angústia, sofrimento ou danos duradouros adicionais, acima do limiar de introdução de uma agulha.

A cada nova combinação genética produzida, a linhagem resultante deve ser objeto de uma avaliação sistemática. Em conformidade com a Decisão de Execução (UE) 2020/569 da

Comissão, a criação de uma nova linhagem GA abrange também o cruzamento de linhagens GA existentes com vista a criar uma nova linhagem geneticamente alterada, **para a qual não é possível determinar antecipadamente o carácter não nocivo do fenótipo.**

Sempre que possível, a avaliação do bem-estar deve ser realizada com base num número de animais justificado do ponto de vista científico e estatístico, que não deve ser inferior a 14 animais, nem superior a 1 ninhada/postura. As diferenças de sexo no fenótipo devem ser tidas em conta para o cálculo da dimensão da amostra, se não puderem ser excluídas numa base científica. Se não for conhecida qualquer dependência de género do genótipo, há que avaliar 7 fêmeas e 7 machos. É necessário incluir na avaliação do bem-estar animais de grupos etários representativos e genótipos pertinentes (heterozigóticos e homozigóticos).

Os animais de bases genéticas correspondentes (por exemplo, de tipo selvagem) ou de uma linhagem de referência definida devem servir de controlo.

Cada anomalia fenotípica determinada na linhagem GA deve ser comparada com a ocorrência na linhagem de referência definida. Se a anomalia também ocorrer na estirpe de base, há que ter em conta esse facto. É necessário utilizar ensaios estatísticos para calcular se o nível da anomalia observada na linhagem GA é significativamente mais elevado do que na estirpe de base (ou seja, para determinar se uma anomalia resulta da alteração genética). Nos casos em que um fenótipo possivelmente devido à alteração genética também esteja presente na estirpe de base, é provável que o número de animais avaliados tenha de ser maior.

É importante obter dados a partir de, pelo menos, dois ciclos de reprodução da geração em que a transmissão da alteração genética se encontre estável.

As observações clínicas nem sempre podem identificar de forma fíável todas as questões que suscitam preocupação em resultado da manipulação genética. No entanto, sempre que se espere cientificamente que a alteração genética venha a ter um impacto negativo no bem-estar dos animais, todos os danos devem ser considerados e incluídos na determinação final do carácter nocivo ou não da linhagem. Apenas quando necessário e especificamente justificado numa autorização de projeto, é adequado utilizar métodos invasivos para obter informações suplementares, por exemplo uma amostra de sangue para avaliar os níveis de glicose num modelo presumível de diabetes.

Sempre que disponíveis, devem ser tidos em conta dados adicionais provenientes de outras fontes, como por exemplo os resultados de procedimentos com animais ou de publicações. Se estiverem disponíveis informações adicionais, a avaliação do bem-estar deve ser atualizada para a linhagem em causa.

O grau e a frequência da monitorização podem ter de ser aumentados em relação à monitorização diária de base, em função dos efeitos esperados. Os modelos apresentados nas secções A e B devem ser utilizados como base para a avaliação e devem ser complementados pelos efeitos esperados da manipulação genética ou se for observado um fenótipo inesperado.

Os resultados da avaliação do bem-estar só podem dizer respeito às idades dos animais no momento em que as avaliações são realizadas e ao ambiente específico em que os animais foram avaliados. Se os parâmetros mudarem, por exemplo a idade ou o ambiente (estabelecimento diferente), a avaliação do bem-estar deve ser confirmada por observações adicionais.

É importante que sejam mantidos e revistos registos clínicos e ambientais exatos em caso de mortes, a fim de ajudar a evitar a ocorrência de mais mortes. Se for caso disso (por exemplo, uma taxa de mortalidade superior à prevista), devem ser efetuados exames *post mortem* para ajudar a determinar a causa da morte. Um exame da fertilidade pode também ser útil para avaliar se a alteração genética está ou não a ter um efeito sobre, por exemplo: taxas de conceção; distocia; abortos; nados-mortos.

A avaliação de cada animal deve ser documentada e comunicada através de sistemas de elevada qualidade que permitam uma partilha fácil de informações com terceiros (geralmente com suporte de TI). Contudo, por exemplo, no caso de animais imaturos, como as larvas de peixe, a avaliação em grupo pode ser mais adequada. Para facilitar o registo coerente dos resultados da avaliação, foram elaborados modelos para as espécies GA mais frequentemente utilizadas (ver secção B).

Além disso, é essencial que as informações obtidas durante as avaliações do bem-estar sejam resumidas e comunicadas aquando da transferência de uma linhagem GA para outro grupo de investigação ou para outro estabelecimento, de modo que os princípios dos três R possam ser imediatamente aplicados. O documento de transferência da linhagem AGA contém mais orientações, incluindo um modelo comum para a movimentação nos Estados-Membros e entre eles.

Os resultados da avaliação do bem-estar devem permitir a classificação da linhagem como nociva ou não nociva. No caso de uma linhagem GA ser avaliada como nociva, a avaliação deve indicar a classificação adequada da severidade (ligeira, moderada, severa), com base no anexo VIII da Diretiva 2010/63/UE. Para mais informações, consultar o Documento de trabalho sobre um quadro de avaliação da severidade (2012).

A avaliação do bem-estar deve ser revista e atualizada à medida que fiquem disponíveis mais informações, com retorno de informação adequado para o vendedor, o criador e outros utilizadores, quando conhecidos.

À medida que fiquem disponíveis dados relativos a mais animais, a classificação de severidade da linhagem deve ser revista, em especial nas linhagens classificadas como não nocivas, uma vez que o aumento do número de animais pode evidenciar um fenótipo biologicamente pertinente de baixa penetração, que não é evidente numa amostra de menor dimensão.

A fim de assegurar a coerência da abordagem, a avaliação do bem-estar deve ser efetuada por pessoal competente e experiente que tenha concluído a formação adequada.

3. Secção A do modelo de avaliação do bem-estar para todas as espécies e pontos temporais

Secção A	Modelo de avaliação do bem-estar
Nome das espécies	
Linhagem avaliada – Nome interno	Nome que é utilizado na instalação de alojamento: se aplicável, especificar o número da estirpe
Linhagem avaliada – Nome internacional	O nome deve ser atribuído de acordo com as normas internacionais de nomenclatura ^{6, 7} , quando disponíveis.
Estratégia de reprodução	Indicar o método preferido para a manutenção de colónias, por exemplo heterozigoto x heterozigoto; heterozigoto x tipo selvagem; homozigoto x homozigoto ou qualquer outra forma. Avaliação geral do desempenho reprodutor, por exemplo machos/fêmeas/tamanho médio da ninhada/mortalidade pré-desmame/sucesso na eclosão, em comparação com o controlo de tipo selvagem.
Estirpe de base	Se for conhecida, a estirpe de base deve ser definida, por exemplo ao documentar o nome internacional.
Tipo de alteração genética	Breve descrição do tipo de alteração genética, da técnica utilizada e do regime-alvo ⁸ . Deve ser designada a base genética de tipo selvagem
Informações sobre os animais no momento da avaliação	Idade ou fase de desenvolvimento dos animais, número (indicar se estimado, por exemplo, formas larvares e distribuição sexual)
Informações sobre as condições de alojamento no momento da avaliação	Tipo de alojamento e ambiente, por exemplo, regime de iluminação, temperatura, humidade, enriquecimento ambiental das gaiolas, características da água para as espécies aquáticas (por exemplo, temperatura, pH, amoníaco), localização na unidade animal (por exemplo, nível do suporte da gaiola/tanque), etc.
Outras informações pertinentes para a	Quaisquer outras informações que possam ter afetado a avaliação do bem-estar, nomeadamente trabalho de construção, mudança de pessoal, estado

⁶ International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice & Rat Genome and Nomenclature Committee; [Guidelines for nomenclature of mouse and rat strains](#) (não traduzido para português); (2018).

⁷ Zebrafish Nomenclature Committee (ZNC); [ZFIN Zebrafish Nomenclature Conventions](#) (não traduzido para português) (2019).

⁸ Para o tipo de modificação (incluir o número de cópias, se for conhecido e aplicável), o gene afetado, o padrão de hereditariedade, a ligação sexual, etc. e/ou consultar/anexar descrição pormenorizada - idealmente uma publicação pertinente sobre a geração da linhagem (ver também a secção «Outras informações pertinentes»).

avaliação	sanitário no momento da avaliação
Outras informações pertinentes	Publicações; hiperligações para sítios Web
Classificação da severidade	Com base no anexo VIII da Diretiva 2010/63/UE
Origem	Estabelecimento onde os animais foram gerados ou mantidos mais recentemente
Avaliador(es)	
Data	

4. Secção B do modelo de avaliação do bem-estar para espécies específicas

Sistema de avaliação do bem-estar de roedores geneticamente alterados

Recomendações específicas para a avaliação do bem-estar de roedores:

- Pouco tempo após o nascimento, na altura do desmame e, mais uma vez, após a maturidade sexual, bem como para os animais mais velhos, para os quais se espera doença com manifestação mais tardia.
- Os animais de bases genéticas correspondentes ou de uma linhagem de referência definida servem de controlo. Durante o estabelecimento de uma linhagem, são particularmente adequados animais da mesma ninhada de tipo selvagem, se disponíveis.
- Poderá ser útil gerar uma curva de crescimento para a linhagem.

Nos quadros que se seguem, apresentam-se considerações adicionais para os animais neonatos e para as ninhadas recém-nascidas.

Secção B. Modelo de avaliação do bem-estar dos roedores

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 pelo 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», ou dilatados
		Fechados/semicerrados/inchados
		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
	Respiração	Respiração acelerada (taquipneia)

Funções fisiológicas		Respiração rápida e difícil (hiperpneia)
		Grave dificuldade em respirar (dispneia, arfar)
		Pieira ou outro som ao respirar
	Ingestão de alimentos	Superior/inferior ao normal
	Ingestão de água	Superior/inferior ao normal
	Temperatura corporal	Elevada/baixa; temperatura medida, se disponível (termometria com ou sem contacto); cor das extremidades nos roedores
Sentidos	Sinais de compromisso da visão, da audição ou do equilíbrio	
Meio ambiente	Meio ambiente do compartimento, incluindo qualquer material de cama, materiais de nidificação ou elementos de enriquecimento	Presença e consistência das fezes
		Cama molhada, por exemplo devido a poliúria
		Presença de 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; comportamento ansioso (por exemplo, respostas de fuga marcadas, esconder-se)
		Isolados ou afastados dos outros animais, quando alojados em grupo social
	Comportamentos indesejáveis	Comportamento repetitivo/estereotipado
		Barbeamento (roedores), tricotilomania
		Automutilação
		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: os roedores vocalizam normalmente no espectro ultrassónico, pelo que as vocalizações audíveis são especial motivo de preocupação).</i>
		Mortalidade (ou occisão precoce devido a sinais adversos) antes do tempo de vida previsto ou maior duração de vida
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 esclerose múltipla, poderiam incluir perda de tónus da cauda, fraqueza dos membros posteriores, fraqueza dos membros anteriores, paralisia, perda de função vesical
Observações livres	Um sistema de avaliação do bem-estar deve incluir sempre um espaço onde anotar quaisquer observações dos impactos negativos inesperados para o bem-estar dos animais.	

Considerações adicionais para a avaliação do bem-estar dos animais neonatos até ao desmame

Critérios	O que procurar
Sinais clínicos	por exemplo, deformidades, tamanho, cor da pele, edema crescimento e desenvolvimento anormal/lento (por exemplo, momento de abertura dos olhos; crescimento do pelo)
Sinais comportamentais	por exemplo, aumento da atividade, agressão, vocalização excessiva, letargia/sem reação?

Depósito de leite (apenas para neonatos)	Alguma das crias não demonstra presença de depósito de leite?
Comportamento materno	Algum indício de maus cuidados maternos (por exemplo, canibalismo, crias dispersas na gaiola e não recuperadas, perdas elevadas antes do desmame)?
Ninhada	Dimensão da ninhada; homogeneidade da ninhada

Sistema de avaliação do bem-estar de peixes geneticamente alterados (peixes ósseos, teleósteos)

Recomendações específicas para a avaliação do bem-estar dos peixes:

A principal avaliação do bem-estar das linhagens geneticamente alteradas de peixes deve centrar-se na observação de alterações visíveis nos peixes. Se ficarem disponíveis novos conhecimentos científicos sobre a percepção da dor e os comportamentos dos peixes relacionados com a dor, os mesmos serão tidos em conta em futuras atualizações da avaliação do bem-estar.

O presente documento de orientação aplica-se a todas as espécies de teleósteos. Há que especificar o nome da espécie exata da linhagem avaliada. Recomenda-se que a avaliação do bem-estar dos teleósteos seja efetuada pelo menos em duas fases:

- 1. Estado larvar na fase de alimentação autónoma**
- 2. Animais adultos sexualmente maduros**
- 3. Os animais mais velhos devem ser avaliados quando estiver prevista doença com manifestação mais tardia.**

A avaliação final dos teleósteos geneticamente alterados deve basear-se nas observações efetuadas, pelo menos, nessas fases de desenvolvimento.

O momento em que as larvas se alimentam de forma autónoma depende da espécie de peixe [sugestão de 5 dias após a fertilização (dpf) para o peixe-zebra (*Danio rerio*) (a uma temperatura da água de 28 °C), em conformidade com a Decisão de Execução 2020/569/UE da Comissão, e de 12 dpf para o peixe-arroz-do-japão (*Oryzias latipes*)], podendo variar consideravelmente em função das condições de reprodução (sobretudo a temperatura da água). O princípio a seguir consiste em utilizar o momento em que o intestino está aberto de ponta a ponta e em que o peixe normalmente ingeriria alimentos de forma ativa.

O momento da maturidade sexual depende também das espécies de peixe, bem como das condições de alojamento. Para o peixe-zebra e o peixe-arroz-do-japão, a maturidade sexual pode ser considerada por volta das 12-16 semanas a uma temperatura da água de 28 °C.

A ocorrência de qualquer alteração resultante da manipulação genética pode depender das condições de alojamento específicas de uma determinada instalação. Por conseguinte, as condições de alojamento (incluindo a alimentação) têm de ser tidas em conta na avaliação do bem-estar e devem ser documentadas.

Na avaliação do bem-estar dos teleósteos geneticamente alterados, há que ter em conta os seguintes princípios:

- A avaliação baseia-se exclusivamente na observação dos animais no seu meio ambiente de alojamento (por exemplo, placa de Petri, aquário).

- Para a avaliação dos peixes adultos sexualmente maduros, não é necessário utilizar os mesmos indivíduos utilizados para a avaliação na fase larvar, uma vez que, normalmente, não é possível marcar permanentemente as larvas.
- Todas as alterações devem ser analisadas no que diz respeito à base de tipo selvagem específica e às condições de alojamento de uma determinada instalação, que devem ser ambas documentadas para a avaliação final do bem-estar. Nota: presume-se que as alterações enumeradas nos dois quadros seguintes ocorram apenas ocasionalmente (até 1 %) em peixes de tipo selvagem, se forem mantidos numa instalação em boas condições de manutenção, em conformidade com o anexo III da Diretiva 2010/63/UE. Estes valores podem variar consoante o estabelecimento.
- É necessário utilizar taxas de mortalidade adequadas do tipo selvagem para avaliar a mortalidade em peixes geneticamente alterados ao nível da população.

Secção B. Modelo de avaliação do bem-estar dos peixes

As observações estão estruturadas nas seis categorias seguintes. Note-se que o desenvolvimento dos peixes depende muito da espécie e das condições de alojamento (por exemplo, temperatura da água e alimentação). As alterações observadas devem ser sempre analisadas no que diz respeito à base de tipo selvagem específica e às condições de alojamento de uma determinada instalação.

Larvas/Aspeto/Funções fisiológicas/Comportamentos/Indicadores específicos do procedimento/Observações livres

Categorias de alto nível	Aspetos a considerar aquando da observação dos animais	Indicadores específicos a monitorizar
Larvas	Antes da fase de alimentação autónoma Indicar se são apresentados valores estimados	Dimensão média da postura em número de ovos (ou exemplares).
		Tempo entre a desova e a alimentação autónoma (se a temperatura da água diferir das condições normais de alojamento, há que registar a temperatura exata da água)
		Eclosão em percentagem de todos os ovos de uma postura, de preferência documentada 5 dpf para o peixe-zebra.
		Taxa de sobrevivência das larvas aquando da alimentação autónoma (por exemplo, 5 dpf no caso do peixe-zebra, 12 dpf no caso do peixe-arroz-do-japão), em percentagem de todos os ovos eclodidos.
		À medida que a sobrevivência das larvas se estabiliza numa fase posterior, a taxa de sobrevivência em percentagem de todas as larvas deve ser registada num segundo momento antes da maturação sexual (por exemplo, 28 dpf no caso do peixe-zebra).
	Na fase de alimentação autónoma	Morfologia; por exemplo, desenvolvimento atrasado/anormal, tamanho, pele, barbatanas, qualquer forma de inchaço, flexão anormal, edema cardíaco, bexiga natatória não aberta
	Comportamento e atividade de natação; por exemplo, natação persistente no fundo do tanque ou perto da superfície, posição na água	
Aspetos a considerar aquando da observação de teleósteos adultos sexualmente maduros		

Aspeto	Condição corporal	Variabilidade em comprimento/tamanho manifestamente reduzido/aumentado para a idade (estimada)
		Emaciado
		Obeso/inchado
		Alteração da forma, por exemplo anomalias espinhais
		Barbatanas alteradas ou em falta (especificar quais e como)
		Opérculos alterados ou em falta
	Estado das escamas e da pele	Alterações nas escamas/pele
		Pele avermelhada
		Pigmentação mais clara/escura
		Outras alterações da cor da pele
		Ulcerações
Funções fisiológicas	Respiração	Aumento dos movimentos operculares
		Engolir ar na superfície
	Ingestão de alimentos	Alimentação alterada (especificar)
	Outros	Especificar
Comportamentos	Natação	Aumento/diminuição da atividade (inclusive perante estimulação)
		Nadar em círculos/em espiral
		Roçar na lateral do tanque/piso, esbarrar ao longo do fundo do tanque
		Nadar no fundo do tanque
		Nadar à superfície
	Interação social	Agressão
	Outras questões relativas à população	Perda de comportamento de cardume, segregação do cardume
		Fertilidade especificada para machos e fêmeas. Incluindo a suscetibilidade de ficar com «ovo preso».
		Mortalidade (ou occisão precoce devido a sinais adversos) antes do tempo de vida previsto ou maior duração de vida

Indicadores específicos do procedimento	São identificados com base no projeto individual, nos possíveis efeitos adversos e nos respetivos indicadores esperados	
Observações livres	Um sistema de avaliação da severidade deve incluir sempre um espaço onde anotar quaisquer observações dos impactos negativos inesperados para o bem-estar dos animais.	

Considerações adicionais para a avaliação do bem-estar das formas larvares

A avaliação das larvas é efetuada exclusivamente mediante a observação do animal, em função do tamanho, por microscopia, numa placa de Petri ou num tanque. Há que utilizar um número representativo de larvas (e posturas) para a avaliação do bem-estar. Com o intuito de complementar a avaliação do bem-estar, é importante ter em conta aspetos específicos das larvas antes da fase de alimentação autónoma.

Considerações adicionais para a avaliação do bem-estar das formas adultas sexualmente maduras

A avaliação dos peixes adultos (de preferência) sexualmente maduros deve ser efetuada mediante observação do animal no tanque. Se possível, todos os peixes observados devem ser mantidos num grupo, uma vez que a separação dos peixes para a avaliação causaria *stress* adicional.

Em geral, embora não seja considerada necessária uma avaliação separada dos dois sexos, ambos devem ser incluídos na avaliação. Se houver algum indício de que as anomalias observadas são específicas do sexo, a avaliação do bem-estar dos peixes adultos sexualmente maduros deve ser efetuada separadamente para machos e fêmeas.

Sistema de avaliação do bem-estar de porcos de criação e miniporcos

Recomendações específicas para a avaliação do bem-estar dos porcos de criação e miniporcos:

A avaliação do bem-estar deve incluir animais de grupos etários representativos:

- Pouco tempo após o nascimento, na altura do desmame (4-5 semanas de idade) e, mais uma vez, após a maturidade sexual (aproximadamente 4-6 meses de idade) e em momentos adicionais, conforme considerado adequado, mediante uma análise prospetiva do potencial impacto da alteração genética, por exemplo quando existe um aparecimento da doença dependente da idade.
- No mínimo, devem ser colhidas amostras de 7 machos e 7 fêmeas de mais de uma ninhada (o número de descendentes nas ninhadas de miniporcos é reduzido, e o número de reprodutores geneticamente alterados e o número de animais são, em geral, muito inferiores aos de outras espécies).

Secção B. Modelo de avaliação do bem-estar dos porcos de criação e miniporcos

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	Desvios em relação à curva de crescimento
		Obeso ou de maior tamanho
		Magro ou de menor tamanho
		Desvios na pontuação da condição corporal
	Estado do pelo e da pele	Desvio na cor da pele
		Desvios na textura da pele
		Desvios na qualidade do pelo (por exemplo, pelagem espessa)
		Perda de pelo ou alopecia
		Pele solta devido, por exemplo, a desidratação ou inanição
		Lesões cutâneas - inchaço; crostas; úlceras; feridas
		Dermatite ou eczema
	Corrimento	Ocular; nasal; urogenital ou diarreia
	Olhos	Microftalmia
		Inchados ou fechados/semicerrados
		Lesões/ferimentos oculares (por exemplo, ulceração da córnea ou sinal de cegueira)
	Boca	Salivação
		Maloclusão/sobrecrescimento dentário
Outros	Malformações (por exemplo, deformação esquelética ou anomalias como hidrocefalia)	
	Anomalias morfológicas, neurológicas ou musculoesqueléticas	
	Parte do corpo inchada (por exemplo, abdómen distendido) ou tumores	
Funções fisiológicas	Respiração	Respiração acelerada (taquipneia)

		Respiração rápida e difícil (hiperpneia)
		Dificuldade em respirar (dispneia, arfar)
		Pieira ou outro som ao respirar
	Ingestão de alimentos	Superior/inferior ao normal
	Ingestão de água	Superior/inferior ao normal
	Temperatura corporal	Elevada/baixa; temperatura medida, se disponível (por exemplo termometria com contacto ou sem contacto);
	Sentidos	Sinais de compromisso da visão, da audição ou do equilíbrio
Meio ambiente	Meio ambiente do compartimento, incluindo qualquer material de cama, materiais de nidificação ou elementos de enriquecimento	Presença e consistência das fezes
		Urinação excessiva
		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	Se o animal apresenta o repertório completo de comportamentos adequados à estirpe; incluindo interação social, fossar, caminhar, correr, dormir
		Isolados ou afastados dos outros animais, quando alojados em grupo social
	Comportamentos indesejáveis	Comportamento repetitivo/estereotipado
		Inatividade prolongada
		Aumento da agressão contra humanos ou outros animais
	Postura e mobilidade	Postura anormal (por exemplo, leitões com pernas abertas)
		Marcha anormal; claudicação; ausência de movimento/letargia/relutância em mover-se se estimulado
		Movimentos descoordenados ou diminuídos ou dificuldades de orientação
		Abdómen encolhido; cabeça tombada
	Outros	Rigidez ou tremores
		Convulsões/espasmos
		Vocalização; espontânea ou invocada

		Mortalidade (ou ocorrência precoce devido a sinais adversos) antes do tempo de vida previsto ou maior duração de vida
Indicadores específicos do procedimento	São identificados com base no projeto individual, nos possíveis efeitos adversos e nos respectivos indicadores esperados	
Observações livres	Um sistema de avaliação da severidade deve incluir sempre um espaço onde anotar quaisquer observações dos impactos negativos inesperados para o bem-estar dos animais.	

Considerações adicionais para a avaliação do bem-estar dos animais neonatos

CRITÉRIOS	O QUE PROCURAR
Cor e aspeto da pele dos neonatos	Algum leitão mostra evidências de cor anormal da pele (por exemplo, anemia, má circulação)? Têm pele solta (indicação de desidratação ou inanição)? Têm um aspeto «peludo» (indicação de dificuldade em manter a temperatura corporal normal)?
Atividade dos neonatos	Alguma atividade anormal? Os neonatos estão ativos e circulam livremente? Estão a respirar normalmente? Têm uma postura anormal (por exemplo, leitões com pernas abertas)?
Interação dos neonatos com as porcas e comportamento de aleitamento	Os neonatos receberam colostro? Estão interessados em amamentar e conseguem fazê-lo, e parecem ter um consumo normal de leite? Estão isolados da porca ou da fonte de calor? Há lutas e agressões durante a amamentação? Algum indício de maus cuidados maternos?
Ninhada	A gestação foi levada a termo? A parição foi normal? Há alguma anomalia em relação ao tamanho e à homogeneidade da ninhada, bem como ao desenvolvimento e ao crescimento dos leitões?

Sistema de avaliação do bem-estar de galinhas geneticamente alteradas

Recomendações específicas para a avaliação do bem-estar das galinhas:

É importante incluir animais de grupos etários representativos.

- Ter em conta as taxas de sucesso de eclosão.
- Pouco tempo após a eclosão (geralmente na incubadora) e outros momentos adequados^{*)}, adultos, envelhecidos ou na idade máxima
- No mínimo, colheita de amostras de 7 machos e 7 fêmeas de mais de uma postura de ovos
- Comparação efetuada, sempre que possível, com animais similares que não sejam GA.

^{*)} e em momentos adicionais, conforme considerado adequado, mediante uma análise prospetiva do potencial impacto da alteração genética, por exemplo quando existe um aparecimento da doença dependente da idade.

É importante saber se a ave é de uma linhagem poedeira ou de frango de carne, uma vez que tal afetará a alimentação e o fenótipo, podendo, na verdade, exigir diferenças ambientais e alterações alimentares em função destes fatores.

Secção B. Modelo de avaliação do bem-estar das galinhas

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/confirmação/crescimento	Malformações, desenvolvimento anormal, deformação esquelética, pernas abertas
		Desvios em relação ao crescimento e ao tamanho previsto
		Condição corporal - específica conforme seja poedeira/frango de carne
		Perda/aumento de peso
	Estado das penas e da pele	Desenvolvimento anormal das penas
		Mau estado das penas/erichadas/sujas
		Áreas de perda de penas, maior arranque de penas do que o previsto
		Desidratação - perda de elasticidade da pele
		Lesões cutâneas - fragilidade/inchaço; crostas; úlceras; feridas
	Corrimento	Ocular; nasal; cloacal
	Olhos	Encovados ou «baços»
		Fechados/semicerrados/inchados
		Lesões/ferimentos oculares (por exemplo, ulceração da córnea)
	Bico/digestivo	Problemas no papo, por exemplo obstrução do papo
		Deformação do bico, da crista ou da barbela.
Outros	Coloração e conformação da barbela e da crista - pálida/vermelha/cianótica; firme ou macia	
	Parte do corpo inchada, por exemplo, abdómen distendido	
Funções fisiológicas	Respiração	Respiração acelerada (taquipneia)
		Respiração rápida e difícil (hiperpneia)
		Dificuldade em respirar (dispneia, arfar)
		Pieira ou outro som ao respirar

	Ingestão de alimentos/água	Superior/inferior ao normal Capacidade para encontrar alimentos e água após a eclosão, conforme previsto; necessidade de assistência ou de manutenção com controlos (como companheiros)
	Temperatura corporal	Elevada/baixa; temperatura medida, se disponível (por exemplo termometria com contacto ou sem contacto); cor das extremidades
	Sentidos	Sinais de compromisso da visão, da audição ou do equilíbrio
	Reprodução	Taxa anormal de embriões viáveis na miragem (inferior aos 90 % previstos) Taxa fraca de eclosão devido à incapacidade de quebrar os ovos (presos na casca) Desempenho de postura da galinha, início da idade de postura, taxa de produção de ovos durante o período de postura, deformidades dos ovos, consistência da casca, deterioração dos ovos.
Meio ambiente	Meio ambiente do compartimento, incluindo qualquer material de cama, materiais de nidificação ou elementos de enriquecimento	Presença e consistência das fezes
		Sujidade excessiva/invulgar do substrato
		Se os animais estão a utilizar os elementos de enriquecimento, por exemplo, banho de areia, poleiro
Comportamentos	Interação social	Exibe normalmente todo o repertório de comportamentos adequados à estirpe, incluindo arranjar as penas com o bico, caminhar, correr, esgravatar, banho de pó, empoleirar-se, «voo» curto, forragear
		Atividade invulgar, por exemplo hiperatividade.
		Mudança em relação ao temperamento normal -
		Isoladas ou afastadas das outras aves, quando alojadas em grupo social.
	Comportamentos indesejáveis	Interações apreensivas/agressivas com outras aves; comportamento ansioso (por exemplo, respostas de fuga marcadas, esconder-se)
		Maior vocalização no manuseamento
		Comportamento repetitivo/estereotipado
		Arranque de penas

		Inatividade prolongada [pode indicar <i>stress</i> crónico ou depressão (anedonia) e/ou doença/dor], especialmente se associada a uma postura encolhida e/ou a penas eriçadas ou desgrenhadas.
		Aumento da agressão contra humanos ou outros animais
	Postura e mobilidade	Postura anormal, encolhida
		Dificuldade de orientação
		Marcha anormal; claudicação; ausência de movimento/letargia/relutância em mover-se se estimulado
	Outros	Tremores
		Rigidez
		Convulsões/espasmos
		Vocalização; espontânea ou invocada.
		Mortalidade (ou occisão precoce devido a sinais adversos) antes do tempo de vida previsto ou maior duração de vida
Indicadores específicos do procedimento	São identificados com base no projeto individual, nos possíveis efeitos adversos e nos respetivos indicadores esperados.	
Observações livres	Um sistema de avaliação da severidade deve incluir sempre um espaço onde anotar quaisquer observações dos impactos negativos inesperados para o bem-estar dos animais.	

Parte 4: Transferência de informações sobre o bem-estar dos animais geneticamente alterados

1. Princípios fundamentais

Quando os animais geneticamente alterados são transferidos dentro e entre instituições, é importante que as informações específicas sobre as suas necessidades de bem-estar os acompanhem. Desta forma, qualquer pessoa que preste cuidados ou utilize os animais poderá compreender as características específicas dos animais (ou estirpes ou linhagens) que recebe, juntamente com quaisquer requisitos especiais que possam ter no que se refere ao seu bem-estar, para poder aplicar imediatamente refinamentos.

A forma como estas informações são transferidas pode assumir vários formatos, nomeadamente um documento em papel, um ficheiro eletrónico ou uma base de dados. O importante é que forneça informações adaptadas e significativas e seja facilmente acessível a todas as pessoas que cuidam de um AGA em qualquer local, para que cada animal (ou lote de animais) receba cuidados coerentes ao longo de toda a sua vida.

Que informações devem ser transferidas com os animais?

É necessário incluir nos documentos de transferência todos os dados pertinentes sobre a geração, reprodução, nomenclatura e base genética (**parte A da avaliação do bem-estar**), bem como uma descrição clara do fenótipo ou quaisquer outras características observadas durante a avaliação do bem-estar (**parte B da avaliação do bem-estar**).

Aquando da transferência de animais de linhagens não nocivas, é particularmente importante que sejam comunicadas informações sobre as condições em que a classificação original foi feita, nomeadamente o estado sanitário ou as condições ambientais, uma vez que estas alterações podem influenciar as consequências da alteração genética para o bem-estar do animal, resultando na reclassificação de não nocivas para nocivas.

A fim de facilitar práticas adequadas de alojamento, prestação de cuidados e monitorização, é também essencial que as informações sobre potenciais problemas de bem-estar relacionados com os fenótipos, com os respetivos requisitos em matéria de prestação de cuidados e manejo, sejam documentadas juntamente com as possíveis estratégias de refinamento (**parte C – Requisitos de prestação de cuidados e de manejo**) e fornecidas com os animais.

Há que incluir as informações que se seguem relativamente a qualquer genótipo que possa surgir (ou seja, heterozigotos e homozigotos) em resultado da reprodução dos animais que são transferidos para um novo meio ambiente.

É necessário fornecer informações pertinentes sobre:

- **Fenótipos** - se observados durante o período de cativeiro, incluindo a fase do ciclo de vida/idade dos animais envolvidos;

- **Prestação de cuidados aos animais** - questões relacionadas com o manejo que afetariam a saúde dos animais e quaisquer cuidados especiais necessários aos animais (por exemplo, suplementos, enriquecimento, etc.);
- **Esterilidade** - preocupações relacionadas com a fecundidade, ninhadas ou criação;
- **Pormenores da estirpe** - nomenclatura, base genética, informações sobre o genótipo.

2. Secção C - Modelo de transferência para os requisitos de prestação de cuidados e manejo de animais geneticamente alterados

Secção C - Requisitos de prestação de cuidados e manejo						
<p>Breve explicação do fenótipo, incluindo medidas corretivas e limites críticos</p> <p>Incluir anomalias fenotípicas e características observáveis que podem ocorrer, especificando a idade de ocorrência (por exemplo, pouco tempo após o nascimento/eclosão, no desmame, na alimentação autónoma ou durante a maturação sexual, na idade adulta ou durante a reprodução (não desenvolvimento dos ovos, abortos, fetos anormais, etc.)</p>						
	Idade	Que tipo de sinais	Potenciais implicações para o bem-estar	Possíveis tratamentos, intervenções e estratégias de refinamento	Alojamento ou cuidados específicos	Limite crítico humano
<p>Sinais clínicos</p> <p>Incluindo o aspeto, as funções fisiológicas e a monitorização do meio ambiente</p>						

Sinais comportamentais						
Desempenho reprodutor, incluindo a viabilidade das crias/descendência						
Morte prematura						

Parte 5: Comunicação de informações sobre animais geneticamente alterados

1. Quadro jurídico geral

As obrigações gerais de comunicação de informações são estabelecidas no artigo 54.º da diretiva. Os requisitos pormenorizados são estabelecidos na Decisão de Execução (UE) 2020/569 da Comissão.

A diretiva prevê dois tipos de obrigações de comunicação de informações que incidem sobre os AGA:

- 1) Comunicação anual de dados estatísticos que incluem dados sobre as utilizações dos animais, nomeadamente para efeitos de criação e manutenção de AGA. As atividades abrangidas pela definição de «procedimento» exigem uma autorização de projeto, e os animais utilizados no âmbito de projetos, em geral, são abrangidos pelas obrigações de comunicação de dados estatísticos anuais.

Os requisitos pormenorizados constam do anexo III da Decisão de Execução (UE) 2020/569 da Comissão.

- 2) Além disso, de cinco em cinco anos, os Estados-Membros devem recolher informações sobre a execução da diretiva. Tal abrange duas categorias específicas de dados dos criadores e utilizadores de AGA sobre a criação e manutenção de AGA, abrangendo o último ano do ciclo quinquenal de comunicação de dados:
 - todos os outros animais que não tenham sido contabilizados na comunicação de dados estatísticos anuais, incluindo os resultantes da criação e manutenção de linhagens GA (animais criados, occisados e não utilizados), e
 - informações representativas sobre os métodos de colheita de amostras de tecidos para efeitos de caracterização genética (determinação do genótipo) - estes animais podem ou não ter sido incluídos nos relatórios estatísticos anuais, dependendo do tipo de método de colheita de amostras de tecidos utilizado (ver página 81).

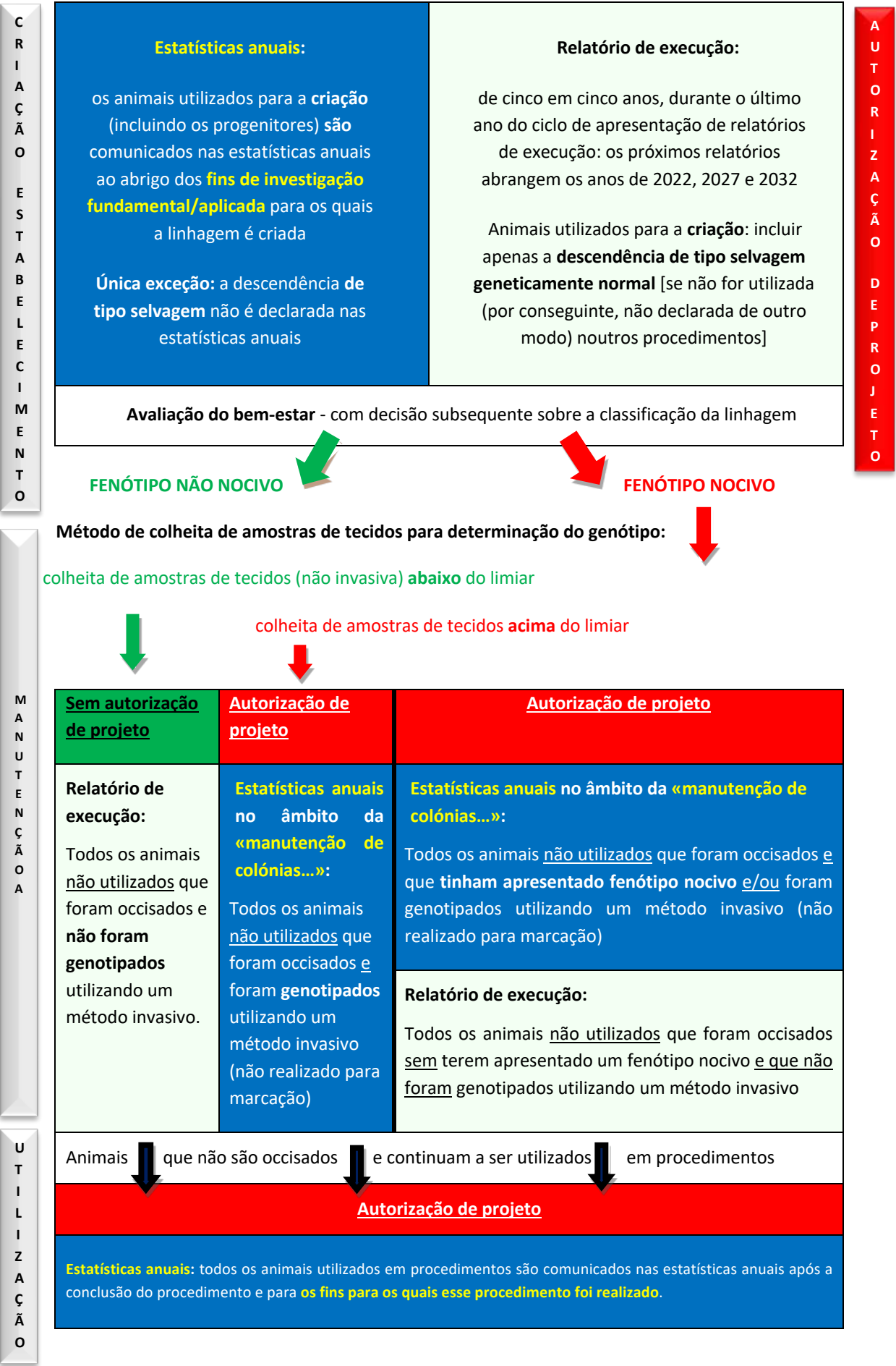
Os requisitos pormenorizados constam do anexo II da Decisão de Execução (UE) 2020/569 da Comissão.

2. Fluxograma dos requisitos de comunicação de dados estatísticos e de execução para a criação, manutenção e utilização de AGA

O fluxograma da página seguinte apresenta um resumo dos requisitos de comunicação de dados estatísticos anuais (caixas a azul-escuro) e de execução quinquenais (caixas a verde-claro).

O fluxograma pode ser transferido em formato de cartaz no seguinte endereço:

https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pubs_posters_en.htm



3.1. Comunicação de dados estatísticos anuais

Requisitos legais relativos aos AGA e requisitos de comunicação de dados estatísticos anuais

O anexo III da Decisão de Execução (UE) 2020/569 da Comissão prevê:

- na parte A, as categorias de dados a utilizar;
- na parte B, instruções gerais e instruções para as categorias de dados especificadas.

Para efeitos da comunicação de dados estatísticos anuais, os animais só devem ser declarados **uma vez** no final de um procedimento - geralmente pelo titular do projeto que conclui a «utilização». Para efeitos de comunicação de dados estatísticos, é importante distinguir entre «utilização», «utilização continuada» e «reutilização» (mais informações no [Documento de trabalho sobre artigos específicos da Diretiva 2010/63/UE](#)⁹).

Comunicação de informações sobre os animais utilizados para a criação de linhagens GA

Todas as linhagens GA são encomendadas para um determinado fim científico. Os procedimentos relacionados com a criação de novas linhagens GA devem ser declarados em relação ao domínio de investigação específico para o qual a linhagem é criada. Por conseguinte, devem ocorrer debates e haver troca de documentação entre os requerentes da linhagem e os criadores das novas linhagens, a fim de garantir a exatidão da comunicação de informações por parte do líder de projeto.

- «Criação» é o desenvolvimento de uma nova linhagem de AGA através de uma alteração genética deliberada/intencional (por exemplo, inserção/supressão/edição genética, mutagénese química ou outra manipulação de um gâmeta ou embrião, ou através do cruzamento de duas linhagens preexistentes)

Conforme descrito na parte 1, secção 3, das presentes orientações, a criação de uma nova linhagem GA é, em princípio, considerada um procedimento. Os animais utilizados na criação são declarados nos dados estatísticos anuais, exceto quaisquer descendentes que sejam genotipados por métodos não invasivos e que se revelem de tipo selvagem, ou seja, não sejam portadores da mutação genética. Esses animais de tipo selvagem só serão declarados no relatório de execução quinquenal - ver página 75.

Constituem exceções os casos em que se efetua o cruzamento/retrocruzamento de **duas linhagens de fenótipo não nocivo** e em que se pode **esperar razoavelmente** que a nova linhagem **não** resultará num fenótipo nocivo; nestas circunstâncias, pode não ser aplicável o requisito de autorização de projeto e, subsequentemente, estes animais não são declarados nos relatórios estatísticos anuais - **salvo** se tiverem sido utilizados métodos invasivos de determinação do genótipo.

Ao comunicar os animais no relatório estatístico anual, é importante considerar separadamente cada um dos progenitores e a descendência, uma vez que cada um deles pode ser declarado de

⁹ https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/Consensus_document.pdf.

forma diferente consoante, por exemplo, o genótipo e o fenótipo demonstrados, bem como o destino (ver quadro *infra*).

Comunicação de informações sobre os animais utilizados para a manutenção de linhagens GA

Uma vez estabelecida a linhagem, após a conclusão da avaliação do bem-estar e da categorização de nociva/não nociva e da severidade (incluindo a consideração dos heterozigotos e homozigotos), a comunicação de informações deve ser realizada na categoria «Manutenção de colónias de animais geneticamente alterados estabelecidos, não utilizados noutros procedimentos», a menos que sejam transferidos para utilização continuada em procedimentos científicos que exijam o genótipo em causa.

Os animais de uma linhagem classificada como **não nociva** serão declarados no relatório estatístico anual quando forem utilizados métodos invasivos de determinação do genótipo e o animal for occisado, e quando o animal for mantido vivo e tiver um genótipo **não pretendido**. Este caso é declarado como primeira utilização. Os animais com o **genótipo pretendido** que continuem a ser utilizados em procedimentos científicos que exijam esse genótipo só serão declarados no final do procedimento integral dessa utilização continuada.

Os animais de uma linhagem estabelecida classificada como **nociva** estarão sujeitos a comunicação nas estatísticas anuais, ou seja, os animais que exprimam danos e/ou que tenham sido submetidos a métodos invasivos de determinação do genótipo e occisados nesse ano sem serem subsequentemente utilizados num procedimento científico.

O quadro da página seguinte contém informações pormenorizadas sobre os requisitos de comunicação de informações.

Comunicação de informações sobre animais que circulam entre procedimentos, projetos, estabelecimentos e/ou Estados-Membros

Nos casos em que animais circulam entre projetos e/ou entre estabelecimentos (nos Estados-Membros ou entre eles), a fim de permitir a comunicação de informações exatas no final de vida/procedimento («utilização»), é necessário fornecer informações com os animais transferidos sobre se os mesmos:

- Foram submetidos a qualquer procedimento no primeiro estabelecimento;
 - a declarar pelo destinatário se forem utilizados num procedimento científico, no final desse procedimento;
 - [N.B.: os animais que não tenham sido submetidos a qualquer procedimento no estabelecimento destinatário não são declarados nas estatísticas anuais, mas têm de ser declarados pelo estabelecimento onde foram occisados, caso tenham sido occisados no ano de registo do relatório de execução quinquenal - ver secção 3.2];
- Estão sujeitos a utilização continuada (por exemplo, foram genotipados com recurso a um método invasivo para confirmar o genótipo correto e são transferidos para utilização num procedimento científico que exige esse genótipo);
 - a declarar pelo destinatário no final do procedimento;

- Concluíram uma «utilização» (por exemplo, genotipados com recurso a um método invasivo que determinou que o animal não tem o genótipo pretendido) e estão a ser transferidos para reutilização.
 - a declarar tanto pelo primeiro utilizador autorizado que genotipou os animais na primeira utilização, como pelo destinatário no final da reutilização.

Os dois quadros seguintes enumeram os procedimentos típicos no âmbito da manutenção de AGA e fornecem um esquema de decisão para determinar se o animal deve ou não ser declarado nas estatísticas anuais, na secção relativa à manutenção.

1. O primeiro quadro apresenta os animais criados a partir de uma linhagem GA estabelecida de **fenótipo não nocivo**.
2. O segundo quadro apresenta os animais criados a partir de uma linhagem GA estabelecida de **fenótipo nocivo**.

1. ANIMAIS DA MANUTENÇÃO DE UMA LINHAGEM DE FENÓTIPO NÃO NOCIVO EXISTENTE

Qual é o genótipo do animal?	O animal sofreu efeitos adversos devido ao genótipo?	O animal foi genotipado utilizando um método invasivo de colheita de amostras de tecidos não utilizado para ID? ¹⁰⁾	O genótipo é confirmado como esperado?	O animal foi submetido a outros procedimentos que não a manutenção ou colheita de amostras de tecidos? ¹¹⁾	O animal foi occisado durante o ano de referência sem ser utilizado noutros procedimentos?	O animal tem de ser declarado nas estatísticas anuais pelo titular do projeto (estabelecimento) para a manutenção da linhagem GA?	Observações	Severidade efetiva declarada
Não geneticamente alterado	Não	Não	Não exigido	Não	Sim	NÃO	Declarado apenas uma vez a cada 5 anos como parte do relatório de execução	Não exigido
Não geneticamente alterado	Não	Sim	Não exigido	Não	Sim	SIM	Embora as informações sobre a severidade da colheita de amostras de tecidos em isolamento só sejam exigidas no ano anterior ao relatório de execução quinquenal, recomenda-se a anotação do método de colheita de amostras de tecidos com a respetiva severidade, a fim de facilitar a elaboração do relatório de execução quinquenal	A maior severidade alcançada em resultado da colheita de amostras de tecidos
Geneticamente alterado	Não	Não	Irrelevante	Não	Sim	NÃO	AGA não nocivo - Declarado apenas uma vez a cada 5 anos como parte do relatório de execução	Não exigido
Geneticamente alterado	Inesperadamente Sim	Não	Irrelevante	Não	Sim	NÃO	Se ocorrerem efeitos adversos em vários animais, a avaliação do bem-estar dos animais deve ser repetida, devendo ser equacionada, se for caso disso, a reclassificação da linhagem de não nociva para nociva.	Não exigido

¹⁰⁾ Refere-se a todos os métodos invasivos de colheita de amostras de tecidos em que o tecido não é obtido a partir da marcação do animal.

¹¹⁾ No caso raro em que a transferência de embriões é apenas necessária para remover o(s) organismo(s) comensal(ais) de uma colónia de reprodução (ou seja, não para melhorar a saúde ou o bem-estar da colónia, mas necessária para fins científicos), os procedimentos envolvidos (por exemplo, transferência de embriões, superovulação, se necessário) devem ser incluídos nas estatísticas anuais, sendo a severidade registada como a maior severidade alcançada em resultado do referido procedimento.

							Em caso de reclassificação para linhagem nociva, será necessária uma autorização de projeto para a manutenção da linhagem. - Declarado apenas uma vez a cada 5 anos como parte do relatório de execução	
Geneticamente alterado	Inesperadamente Sim	Sim	Irrelevante	Não	Sim	SIM	Se ocorrerem efeitos adversos em vários animais, a avaliação do bem-estar dos animais deve ser repetida, devendo ser equacionada, se for caso disso, a reclassificação da linhagem de não nociva para nociva. Em caso de reclassificação para linhagem nociva, será necessária uma autorização de projeto para a manutenção da linhagem	
Geneticamente alterado	Não	Sim	Irrelevante	Não	Sim	SIM	Recomenda-se a anotação do método de colheita de amostras de tecidos com a respectiva severidade, a fim de facilitar a elaboração do relatório de execução quinquenal que será exigido para estes animais, para além das estatísticas anuais	A maior severidade alcançada em resultado da colheita de amostras de tecidos
Geneticamente alterado	Não	Sim	Sim	Não	Não	NÃO	A colheita de amostras de tecidos por um método invasivo (quando o fenótipo esperado é confirmado e o animal não é occisado) constitui a primeira parte de uma utilização continuada ; <u>o utilizador final irá declarar o animal nas estatísticas anuais</u> quando a utilização final estiver concluída	A severidade da colheita de amostras de tecidos deve ser comunicada ao utilizador final, a fim de ser tida em conta na severidade efetiva final declarada
Geneticamente alterado	Não	Sim	Genótipo não adequado	Não	Não	SIM	A colheita de amostras de tecidos por um método invasivo (quando o fenótipo esperado não é confirmado e o animal não é occisado) é considerada a primeira utilização desse animal; qualquer utilização posterior é considerada reutilização . Recomenda-se a anotação do método de colheita de amostras de tecidos com a respectiva severidade, a fim de facilitar a elaboração do relatório de execução quinquenal	A maior severidade alcançada em resultado da colheita de amostras de tecidos

2. ANIMAIS DA MANUTENÇÃO DE UMA LINHAGEM DE FENÓTIPO NOCIVO EXISTENTE

Qual é o genótipo do animal?	O animal sofreu efeitos adversos devido ao genótipo?	O animal foi genotipado utilizando um método invasivo de colheita de amostras de tecidos? ¹²⁾	O genótipo é confirmado como esperado?	O animal foi submetido a outros procedimentos que não a manutenção ou colheita de amostras de tecidos? ¹³⁾	O animal foi occisado durante o ano de referência sem ser utilizado noutros procedimentos?	O animal tem de ser declarado nas estatísticas anuais pelo titular do projeto (estabelecimento) para a «manutenção» de AGA?	Observações	Severidade efetiva declarada
Não geneticamente alterado	Não	Não	Não exigido	Não	Sim	NÃO	Declarado apenas uma vez a cada 5 anos como parte do relatório de execução	Não aplicável
Não geneticamente alterado	Não	Sim	Não exigido	Não	Sim	SIM	Recomenda-se a anotação do método de colheita de amostras de tecidos com a respetiva severidade, a fim de facilitar a elaboração do relatório de execução quinquenal	A maior severidade alcançada em resultado da colheita de amostras de tecidos
Geneticamente alterado	Não	Não	Irrelevante	Não	Sim	NÃO	Declarado apenas uma vez a cada 5 anos como parte do relatório de execução	Não aplicável
Geneticamente alterado	Sim	Não	Irrelevante	Não	Sim	SIM		Maior severidade alcançada em resultado dos efeitos adversos associados ao genótipo
Geneticamente alterado	Não	Sim	Irrelevante	Não	Sim	SIM	Recomenda-se a anotação do método de colheita de amostras de tecidos com a respetiva severidade, a fim de facilitar a elaboração do relatório de execução quinquenal	A maior severidade alcançada em resultado da colheita de amostras de tecidos
Geneticamente alterado	Sim	Sim	Irrelevante	Não	Sim	SIM	Recomenda-se a anotação do método de colheita de amostras de tecidos com a respetiva severidade, a fim de facilitar a elaboração do relatório de execução quinquenal	Maior severidade alcançada, tendo em conta o resultado tanto dos efeitos adversos associados ao genótipo como o da colheita de amostras de tecidos

¹²⁾ Refere-se a todos os métodos invasivos de colheita de amostras de tecidos em que o tecido não é obtido a partir da marcação do animal.

¹³⁾ No caso raro em que a transferência de embriões é apenas necessária para remover o(s) organismo(s) comensal(ais) de uma colónia de reprodução (ou seja, não para melhorar a saúde ou o bem-estar da colónia, mas necessária para fins científicos), os procedimentos envolvidos (por exemplo, transferência de embriões, superovulação, se necessário) devem ser incluídos nas estatísticas anuais, sendo a severidade registada como a maior severidade alcançada em resultado do referido procedimento.

Geneticamente alterado	Não	Sim	Sim	Não	Não	NÃO	<p>O animal não é occisado, mas foi submetido a colheita de amostras de tecidos por um método invasivo que constitui a primeira parte de uma utilização continuada; o utilizador final irá declarar o animal nas estatísticas anuais quando a utilização estiver concluída.</p>	<p>O animal pode ou não ter sofrido efeitos adversos em resultado do genótipo. A maior severidade, tendo em conta os efeitos do genótipo e da colheita de amostras de tecidos, deve ser comunicada ao utilizador final, a fim de ser tida em conta na severidade efetiva final declarada</p>
Geneticamente alterado	Sim	Sim	Sim	Não	Não	NÃO	<p>O animal não é occisado, mas foi submetido a colheita de amostras de tecidos por um método invasivo que constitui a primeira parte de uma utilização continuada; o utilizador final irá declarar o animal nas estatísticas anuais quando a utilização estiver concluída.</p>	<p>O animal pode ou não ter sofrido efeitos adversos em resultado do genótipo. A maior severidade, tendo em conta os efeitos do genótipo e da colheita de amostras de tecidos, deve ser comunicada ao utilizador final, a fim de ser tida em conta na severidade efetiva final declarada</p>
Geneticamente alterado	Não	Sim	Genótipo não adequado	Não	Não	SIM	<p>A colheita de amostras de tecidos por um método invasivo (quando o fenótipo esperado não é confirmado e o animal não é occisado, mas é mantido vivo para utilização num estudo diferente que exige esse genótipo, ou num estudo em que o genótipo não é importante) é considerada a primeira utilização desse animal; qualquer utilização posterior é considerada reutilização.</p> <p>Recomenda-se a anotação do método de colheita de amostras de tecidos com a respetiva severidade, a fim de facilitar a elaboração do relatório de execução quinquenal</p>	<p>A maior severidade alcançada em resultado da colheita de amostras de tecidos</p>

3.2. Relatório de execução de cinco em cinco anos

Requisitos legais relativos aos AGA e aos relatórios de execução dos Estados-Membros

O anexo II da Decisão de Execução (UE) 2020/569 da Comissão exige a apresentação de relatórios de cinco em cinco anos em duas áreas distintas que envolvem AGA, designadamente:

- animais criados, occisados e não utilizados, resultantes da criação ou manutenção de linhagens GA;
- animais que foram submetidos a colheita de amostras de tecidos, independentemente do método utilizado para a obtenção dos tecidos.

Os requisitos legais pormenorizados constam do anexo II, parte C.2 e parte D.3.1, da Decisão de Execução (UE) 2020/569 da Comissão.

Animais criados, occisados e não utilizados

De cinco em cinco anos, a diretiva exige uma contagem exata de todos os animais necessários para apoiar a investigação e os ensaios na UE. Essa contagem é obtida, por um lado, através de dados estatísticos anuais relativos ao ano em causa, que incluem todos os animais que foram utilizados em procedimentos; por outro lado, para determinar o número total, a contagem é efetuada de cinco em cinco anos, contabilizando todos os outros animais criados, occisados e não utilizados em procedimentos. Esta categoria abrange tanto os animais convencionais como os animais provenientes da criação e manutenção de linhagens GA.

Em comparação com os dados de 2017, os futuros relatórios exigem que os animais occisados para obtenção de órgãos/tecidos sejam identificados separadamente.

É importante notar que as informações fornecidas para esta categoria de dados são comunicadas não só pelos **utilizadores, mas também pelos criadores dos animais**.

Ao declarar animais provenientes da criação e reprodução de linhagens GA para efeitos do relatório de execução, é importante considerar separadamente cada um dos progenitores e a descendência, uma vez que cada um deles pode ser declarado de forma diferente consoante o genótipo e o fenótipo demonstrados.

Na reprodução de uma linhagem GA, a menos que tenha sido confirmado (por exemplo, mediante a determinação do genótipo ou a cor do pelo) que não é GA, a linhagem deve ser declarada como GA.

Os Estados-Membros utilizam métodos diferentes para a recolha destes dados. Por razões de clareza para o criador e a comunidade de utilizadores, alguns Estados-Membros optaram por recolher estes dados todos os anos.

A Comissão Europeia criou um instrumento facultativo para ajudar a recolher estes dados com exatidão, utilizando um modelo Excel («Modelo de dados do utilizador/criador para o relatório de execução do Estado-Membro», tipo de registo IR2). Este instrumento pode ser utilizado para registar os dados anuais.

Os requisitos de comunicação de informações são especificados no quadro da página 79. No entanto, uma vez que os instrumentos de comunicação de informações podem variar de país para país, o quadro faz referência apenas aos instrumentos disponibilizados pela Comissão.

Recomendações:

- Os Estados-Membros devem assegurar que as respetivas autoridades competentes e a comunidade científica tenham conhecimento e disponham dos instrumentos corretos e atualizados para a recolha de dados relativos aos animais criados, occisados e não utilizados antes do início do 5.º ano do ciclo quinquenal de apresentação de relatórios.

Colheita de amostras de tecidos

Em contraste com a *contagem exata* de todos os animais criados, occisados e não utilizados, os Estados-Membros são obrigados a fornecer dados *representativos* sobre a colheita de amostras de tecidos. O relatório sobre a colheita de amostras de tecidos não visa identificar o número total de animais que foram objeto desse procedimento. Em vez disso, permite efetuar uma análise a nível da UE sobre o tipo de espécies, as proporções dos diferentes métodos de colheita de amostras de tecidos utilizados e as respetivas severidades, a fim de avaliar os progressos na aplicação dos três R para efeitos de colheita de amostras de tecidos.

A forma como os «dados representativos» são interpretados e recolhidos varia consideravelmente de um Estado-Membro para outro. Para reduzir a confusão entre a comunidade de utilizadores e simplificar os requisitos de comunicação de informações, alguns Estados-Membros optaram por recolher todos os dados anualmente e junto de todos os criadores e utilizadores. Outros Estados-Membros recolheram dados relativos apenas ao último ano do ciclo quinquenal de apresentação de relatórios. Em alguns casos, foram recolhidos dados de todos os estabelecimentos, enquanto noutros apenas foram recolhidos dados de um número representativo de estabelecimentos. Por vezes, foram recolhidos dados parciais (por exemplo, durante seis meses do período de referência) de todos os estabelecimentos pertinentes. Os relatórios de execução quinquenais subsequentes devem enumerar os critérios utilizados pelos Estados-Membros para a seleção e a apresentação de dados que garantam a representatividade das informações fornecidas. Os Estados-Membros devem determinar e informar atempadamente a comunidade científica sobre quais serão esses critérios.

Tal como acontece com os dados relativos aos animais criados, occisados e não utilizados, **tanto os utilizadores como os criadores dos animais** comunicam informações sobre a colheita de amostras de tecidos.

Ao contrário da comunicação de informações sobre os animais criados, occisados e não utilizados, alguns animais que são declarados ao abrigo da colheita de amostras de tecidos podem também ser incluídos no relatório estatístico anual, quer quando um animal tenha sido submetido a outros procedimentos científicos (mesmo que a amostra de tecidos tenha sido colhida utilizando um método não invasivo, ou se tiver sido utilizado tecido excedentário da marcação para caracterização genética), quer em consequência da utilização de um método invasivo de colheita de amostras de tecidos do animal.

São necessárias informações relativas a todas as espécies que tenham sido objeto de colheita de amostras de tecidos. Para cada espécie, devem ser comunicados os números envolvidos por tipo de método utilizado e, no caso de um método invasivo, a respetiva distribuição das severidades.

A fim de facilitar a recolha de dados sobre os métodos de colheita de amostras de tecidos e as respetivas severidades, a Comissão Europeia criou dois instrumentos facultativos complementares para o efeito:

- No que diz respeito aos **animais declarados nas estatísticas anuais**, campos facultativos adicionais (X-Z) no modelo Excel de relatório estatístico anual, a fim de recolher informações sobre a colheita de amostras de tecidos; e

X	Y	Z
Method of tissue sampling	Specify other method	Severity of genotyping
[IG1] Invasive genotyping: blood sampling		
[IG2] Invasive genotyping: ear biopsy		
[IG3] Invasive genotyping: tail biopsy		
[IG6] Invasive genotyping: fin biopsy		
[IG4] Invasive genotyping: toe clipping		
[IG5] Invasive genotyping: other		
[ST1] Surplus tissue from the marking of an animal via ear punc		
[ST2] Surplus tissue from the marking of an animal via toe clipp		

- No que diz respeito aos **animais que não são declarados nas estatísticas anuais**, pode ser utilizada uma folha de cálculo Excel facultativa para dados adicionais do utilizador («Modelo de dados do utilizador/criador para o relatório de execução do Estado-Membro», tipo de registo IR1), a fim de registar a colheita de amostras de tecidos por um método não invasivo e a utilização de material excedentário da identificação/marcação do animal.

A	J	K
Entry data		
Record type *	Method of tissue sampling	Specify other method
[IR1] Tissue sampling (non-invasive genotyping or from surplus tissue)	[ST1] Surplus tissue from the marking of an animal via ear punch	
	[ST2] Surplus tissue from the marking of an animal via toe clipping	
	[NG1] Non-invasive genotyping: hair sampling	
	[NG2] Non-invasive genotyping: observation under special lighting	
	[NG3] Non-invasive genotyping: post mortem	
	[NG4] Non-invasive genotyping: other	

Estes instrumentos complementares, quando utilizados em conjunto, promoverão a exatidão da comunicação de informações. Em caso de omissão de algum dos instrumentos, deve ser disponibilizado outro instrumento nacional para assegurar que todas as informações necessárias são registadas e comunicadas para o relatório de execução.

Se os instrumentos acima referidos forem utilizados num Estado-Membro, o quadro seguinte demonstra qual dos instrumentos deve ser utilizado em cada ocasião, como comunicar a severidade efetiva relacionada com a colheita de amostras de tecidos e quem a deve comunicar.

**COMUNICAÇÃO DE MÉTODOS DE AMOSTRAGEM DE TECIDOS PARA EFEITOS DO RELATÓRIO DE EXECUÇÃO QUINQUENAL
UTILIZANDO OS INSTRUMENTOS DISPONIBILIZADOS PELA COMISSÃO EUROPEIA**

Método de determinação do genótipo	O animal é occisado após a colheita de amostras de tecidos	O animal é utilizado num procedimento (inicial/continuado/outro) ¹⁾ após a colheita de amostras de tecidos		Comunicação de informações através da folha Excel facultativa ¹⁴ - tipo de registo: colheita de amostras de tecidos [R1]	Comunicação de informações ao adicionar dados pertinentes no relatório estatístico anual - colunas X-Z	Observações
		Pelo mesmo estabelecimento	Por outro estabelecimento			
Método não invasivo ou a partir de tecido excedentário da marcação do animal ²⁾	Sim	Não	Não	SIM		Declarado pelo estabelecimento em que o animal foi genotipado e occisado.

¹⁴ Folha Excel facultativa intitulada «Modelo de dados do utilizador/criador para o relatório de execução do Estado-Membro».

Método não invasivo ou a partir de tecido excedentário da marcação do animal ²⁾	Não	Sim	Não		SIM	As informações relativas à colheita de amostras de tecidos são adicionadas utilizando as colunas X-Y no relatório estatístico anual, quando a utilização do animal em causa num procedimento estiver concluída
Método não invasivo ou a partir de tecido excedentário da marcação do animal ²⁾	Não	Não	Sim		SIM	A comunicação do método de colheita de amostras de tecidos é efetuada pelo estabelecimento em que o animal foi objeto da colheita de amostras de tecidos
Método invasivo de colheita de amostras de tecido - não a partir de tecido excedentário da marcação do animal	Sim	Não	Não		SIM	A colheita de amostras de tecidos é declarada como a única utilização no relatório estatístico anual, na secção de manutenção ou criação - a severidade efetiva da colheita de amostras de tecidos será declarada nas colunas «T» e «Z» ³⁾
Método invasivo de colheita de amostras de tecido - não a partir de tecido excedentário da marcação do animal	Não	Sim numa utilização continuada que exija o genótipo em causa	Não		SIM	Serão declaradas 2 severidades para este animal: a utilização principal e a colheita de amostras de tecidos. A severidade efetiva de todo o procedimento (incluindo o impacto da determinação do genótipo por um método invasivo) é declarada na coluna «T». A severidade na coluna «Z» deve referir-se apenas à severidade efetiva da colheita de amostras de tecidos ³⁾
Método invasivo de colheita de amostras de tecido - não a partir de tecido excedentário da marcação do animal	Não	Sim noutro procedimento, que não exija o genótipo específico	Não		SIM	A colheita de amostras de tecidos por um método invasivo é a primeira «utilização» e a utilização posterior é considerada «reutilização». O primeiro utilizador tem de declarar a severidade efetiva da colheita de amostras de tecidos nas colunas «T» e «Z». A colheita de amostras de tecidos é declarada como primeira utilização no relatório estatístico anual, na secção de manutenção ou criação ³⁾ .
Método invasivo de colheita de amostras de tecido - não a partir de tecido excedentário da marcação do animal	Não	Não	Sim, numa utilização continuada que exija o genótipo em causa		SIM	A colheita de amostras de tecidos só é declarada no final de todo o procedimento pelo estabelecimento que concluiu essa «utilização». Serão declaradas 2 severidades para este animal: a utilização principal e a colheita de amostras de tecidos. A severidade efetiva de todo o procedimento (incluindo o impacto da determinação do genótipo por um método invasivo) é declarada na coluna «T». A severidade na coluna «Z» deve referir-se apenas à colheita de amostras de tecidos ³⁾ . As informações sobre a colheita de amostras de tecidos por um método invasivo (método e severidade efetiva) devem ter sido recebidas juntamente com o animal.

Método invasivo de colheita de amostras de tecido - não a partir de tecido excedentário da marcação do animal	Não	Não	Sim, noutro procedimento, que não exija o genótipo específico		SIM	A colheita de amostras de tecidos é declarada como a «primeira utilização» pelo estabelecimento em que o animal foi submetido à colheita de amostras de tecidos (na secção de criação ou manutenção) - a severidade efetiva nas colunas «T» e «Z» refere-se, por conseguinte, à severidade efetiva da colheita de amostras de tecidos ³⁾ . A informação de que o animal já concluiu a primeira utilização deve acompanhar o animal. Aplicam-se as condições de reutilização.
---	-----	-----	--	--	-----	---

1. Primeira utilização: a colheita de amostras de tecidos foi efetuada por um método não invasivo ou utilizando tecidos excedentários da marcação de um animal, pelo que a colheita de amostras não é considerada um procedimento e qualquer procedimento posterior será considerado como uma primeira utilização;

Utilização continuada: o animal foi submetido a colheita de amostras de tecidos através de um método invasivo, o genótipo pretendido foi confirmado e o animal foi utilizado (= utilização continuada) num procedimento que exigia esse genótipo;

Reutilização noutro procedimento: o animal foi submetido a colheita de amostras de tecidos por um método invasivo (= primeira utilização), sendo posteriormente utilizado num procedimento que não exigia o genótipo pretendido.

2. A colheita de amostras de tecidos por um método não invasivo e a utilização de tecidos excedentários da marcação de um animal não são consideradas um procedimento/utilização de um animal.
3. A severidade efetiva declarada na coluna «Z» deve referir-se apenas à severidade efetiva da colheita de amostras de tecidos, em contraste com a severidade efetiva declarada na coluna «T», que deve refletir a maior experiência de severidade do animal durante toda a sua utilização (ou seja, incluindo os impactos do genótipo, da determinação do genótipo e a severidade observada durante outros elementos do procedimento).

Recomendações:

- Os Estados-Membros devem determinar e informar atempadamente as respetivas autoridades competentes e a comunidade científica sobre quais serão os critérios dos «dados representativos» para a recolha de dados sobre a colheita de amostras de tecidos;
- Os Estados-Membros devem assegurar que as respetivas autoridades competentes e a comunidade científica dispõem de informações e instrumentos atualizados referentes aos requisitos para a recolha de dados sobre a colheita de amostras de tecidos.

Apêndices

Apêndice I: Exemplos de bases de dados de linhagens GA

Hiperligações verificadas em março de 2020.

1. Lista não exaustiva de exemplos de bases de dados de linhagens GA:

- <http://www.informatics.jax.org/>
- <https://www.infrafrontier.eu/>
- <https://archive.har.mrc.ac.uk/index>
- <https://www.mousephenotype.org/>
- <http://zfin.org/>
- <https://www.xenbase.org/gene/static/geneNomenclature.jsp>

2. Sítio Web para procurar genes humanos e doenças genéticas: <https://omim.org>

Apêndice II: Pedido e avaliação de projetos para a criação e manutenção de linhagens GA

Introdução

Os artigos 36.º a 44.º da Diretiva 2010/63/UE estabelecem os requisitos aplicáveis à proposta, à avaliação e à autorização de projetos.

A **parte A** do presente apêndice (baseada no anexo VI da diretiva) destina-se tanto aos requerentes como aos avaliadores dos projetos. Estabelece os requisitos de informação de especial relevância a ter em conta num pedido de criação e/ou manutenção de linhagens GA.

O artigo 37.º estabelece os elementos que têm de ser incluídos num pedido de autorização de projeto, a saber:

- A proposta do projeto;
- Um resumo não técnico do projeto; e
- Informação sobre os elementos previstos no anexo VI da diretiva.

A **parte B** do presente apêndice destina-se principalmente aos avaliadores de projetos. Centra-se no processo de avaliação do projeto, salientando as principais considerações e a forma como estas podem ser abordadas durante a avaliação. Esta parte é igualmente do interesse dos requerentes de projetos, uma vez que permite uma melhor compreensão dos aspetos a considerar durante o processo de avaliação para garantir o cumprimento das obrigações decorrentes da diretiva.

Podem ser consultadas mais informações sobre os requisitos da diretiva no [Documento de trabalho sobre a avaliação de projetos e a avaliação retrospectiva](#).

Parte A: Exemplos ilustrativos das principais informações necessárias num pedido de projeto de AGA

A proposta do projeto

A proposta define as principais questões científicas que serão abordadas, incluindo o objetivo do projeto (conforme estabelecido no artigo 5.º). A proposta do projeto constitui a apresentação à autoridade competente das informações pormenorizadas sobre os trabalhos previstos e do pedido de autorização para os mesmos. Se for caso disso e permitido no Estado-Membro em causa, há que equacionar a utilização de projetos genéricos múltiplos (https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/Consensus_document.pdf) e de procedimentos administrativos simplificados, conforme previsto no artigo 40.º, n.º 4, e no artigo 42.º, respetivamente.

Para reproduzir e manter apenas linhagens GA de fenótipo não nocivo, mas utilizando métodos invasivos de colheita de amostras de tecidos, é necessária uma autorização de projeto. Tal

projeto pode ser simples, centrando-se principalmente no refinamento e na classificação prospetiva da severidade dos procedimentos.

Os projetos de criação e manutenção de AGA são geralmente necessários para fins de investigação básica ou aplicada, devendo indicar o estado atual dos conhecimentos nos quais se pretendem basear. Se for caso disso, devem incluir os objetivos alcançados por projetos anteriores e os objetivos específicos que pretendem alcançar. O caso científico deve ser apresentado de forma concisa e sustentado por referências fundamentais/análise bibliográfica. Embora não seja possível apresentar objetivos científicos pormenorizados nos casos em que estejam a ser produzidas linhagens GA para terceiros, o requerente deve obter informações sobre as linhagens a gerar e a sua finalidade junto dos utilizadores/compradores dos animais, se tal não for do seu conhecimento.

A proposta explicará as razões pelas quais não é possível alcançar os objetivos científicos sem a utilização de AGA, a forma como esses animais serão utilizados e por que motivo são necessárias as novas linhagens GA, fornecendo ainda confirmação de que não existem outras linhagens adequadas disponíveis. Poderá ser necessário criar um sistema para os projetos de serviços (ver *infra*) em que as informações sejam fornecidas pelos clientes e revistas.

O resumo não técnico do projeto

O modelo de resumo não técnico do projeto consta do anexo I, parte A, da Decisão de Execução (UE) 2020/569 da Comissão, e as orientações para a sua apresentação poderão ser consultadas posteriormente em

https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pubs_guidance_en.htm.

Lista dos elementos referidos no artigo 37.º, n.º 1, alínea c), e no anexo VI

O quadro *infra* enumera os elementos do anexo VI que devem ser tidos em conta num pedido de projeto. Estes são mais aprofundados seguidamente no contexto dos AGA, a fim de assegurar que o pedido fornece aos avaliadores do projeto informações suficientes para poderem equacionar se a autorização deve ser recomendada.

	Elemento do anexo VI	Pontos onde são abordados mais abaixo
I.	Importância e justificação:	1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 2, 3
	a) Da utilização de animais, incluindo a sua origem, número estimado, espécie e fases do ciclo da vida;	
	b) Dos procedimentos.	1, 2
II.	Aplicação de métodos de substituição, redução e refinamento da utilização de animais em procedimentos.	1f, 1g, 1h, 3
III.	Utilização prevista de anestesia, analgésicos e outros métodos para aliviar a dor.	3c(i)

IV.	Medidas adotadas para reduzir, evitar e aliviar qualquer tipo de sofrimento do animal, desde o seu nascimento até à morte, quando adequado.	3c, 1f, 1g, 1h
V.	Utilização de limites críticos humanos.	3c(v)
VI.	Estratégia de experimentação ou de observação e modelos estatísticos utilizados para reduzir ao mínimo o número de animais, a sua dor, sofrimento e angústia e o impacto ambiental, quando adequado.	3, 4, 5
VII.	Reutilização de animais e o seu efeito cumulativo para o animal.	3b(iv), 3c(vii)
VIII.	Proposta de classificação da severidade dos procedimentos.	4
IX.	Medidas para evitar a duplicação injustificada de procedimentos, quando adequado.	3a(i)
X.	Condições de alojamento, criação e prestação de cuidados aos animais.	3c(iv)
XI.	Métodos de occisão.	3c(vi)
XII.	Competência das pessoas envolvidas no projeto.	6a, 6b

Os elementos que se seguem abrangem tanto a criação como a manutenção de linhagens GA, com o intuito de poderem ser combinados no mesmo projeto, devendo ser utilizados conforme adequado. A sua apresentação não corresponde à ordem da lista *supra*, sendo apresentados por uma ordem que poderá ser mais facilmente seguida aquando da elaboração de um pedido de projeto.

Atualmente, na Europa, a criação, reprodução e utilização de AGA podem ser descritas como estando inseridas nos quatro tipos de categorias seguintes:

- 1. Projeto científico**, que inclui a **reprodução, manutenção e utilização** de animais, e **pode incluir a criação de novas linhagens** (incluindo o cruzamento de linhagens GA existentes). O requerente disporá de todas as informações pertinentes e os processos de pedido e de avaliação devem ser simples.
- 2. Projeto de prestação de serviços do tipo A - Reprodução e manutenção de linhagens GA nocivas estabelecidas para fornecimento a grupos de investigação científica**, por exemplo, murganhos ob/ob e lepr. Estas linhagens serão muitas vezes reproduzidas e mantidas numa base comercial, **frequentemente fora do estabelecimento de utilização**. Os efeitos adversos das linhagens serão conhecidos, pelo que os danos são facilmente tidos em conta.
- 3. Projeto de prestação de serviços do tipo B** - Neste caso, **a criação, reprodução e manutenção de AGA são realizadas como um serviço centralizado dentro de um estabelecimento de investigação**. Todas as informações pertinentes estão prontamente disponíveis junto do cientista que encomendou o projeto e o retorno de informação ao prestador de serviços é simples.
- 4. Projeto de prestação de serviços do tipo C** - Neste caso, um grupo com elevado nível de especialização está sediado num estabelecimento, que é **externo ao utilizador**

científico/estabelecimento de investigação, e pode ser inteiramente comercial. Juntamente com o pedido de criação de novas linhagens de animais são enviadas as construções genéticas, e são realizadas todas as atividades necessárias para produzir uma linhagem GA estabelecida, que é então geralmente enviada ao utilizador para reprodução e manutenção. A principal função deste tipo de projeto é **a criação de novas linhagens a partir de construções genéticas**.

Esta lista de tipos de projetos não se destina a ser exaustiva, podendo ser observadas outras combinações de processos.

O texto que se segue aborda, por um lado, os projetos científicos e, por outro, os projetos de serviços.

1. Importância e justificação dos procedimentos

São necessárias informações de base para compreender o contexto do pedido nos domínios científicos em causa (ou, menos frequentemente, o quadro regulamentar).

- a. O objetivo geral da criação e/ou manutenção de linhagens GA deve ser claro, de modo que as realizações prováveis constituam a base para a avaliação dos benefícios suscetíveis de advir do projeto. Assegure que as informações de base são específicas e fornecem uma panorâmica do domínio de utilização, indicando a necessidade científica, médica, veterinária ou forense subjacente. Utilize referências (e/ou orientações regulamentares) e resultados de trabalhos anteriores para apoiar os principais pontos.

No caso de projetos de serviços, descreva o serviço que irá prestar e de que forma a prestação do serviço beneficiará os utilizadores, em termos de vantagem acrescida em relação à prestação pelos próprios. Devem ser claros os objetivos pertinentes para o projeto, podendo ser necessário obter informações junto dos clientes para determinar o objetivo, bem como provas de que existe uma expectativa razoável de que a criação dos animais trará benefícios.

- b. **Objetivo** - para os projetos de criação e manutenção de AGA, os procedimentos só podem ser autorizados para objetivos específicos (artigo 5.º da diretiva). Com base nas informações constantes do pedido, deve ser evidente quais destes objetivos são aplicáveis:
 - a) Investigação fundamental;
 - b) Investigação translacional ou aplicada tendo em vista um dos seguintes objetivos:
 - i) prevenção, profilaxia, diagnóstico ou tratamento de doenças, de problemas de saúde ou de outras situações anormais ou dos seus efeitos nos seres humanos, nos animais ou nas plantas,
 - ii) avaliação, deteção, regulação ou alteração das condições fisiológicas nos seres humanos, nos animais ou nas plantas, ou
 - iii) o bem-estar dos animais e a melhoria das condições de produção dos animais criados para fins agrícolas;
 - c) Qualquer dos objetivos da alínea b), no âmbito do desenvolvimento, da produção ou do controlo da qualidade, da eficácia e da segurança de medicamentos, géneros alimentícios, alimentos para animais e outras substâncias ou produtos;

- d) Proteção do ambiente natural no interesse da saúde ou do bem-estar do homem ou dos animais;
- e) Investigação destinada à conservação das espécies;
- f) Ensino superior ou formação para aquisição, manutenção ou melhoria das qualificações profissionais;
- g) Inquéritos no domínio da medicina legal.

Os objetivos que constam das alíneas d) a g) são muito pouco frequentes no que diz respeito à utilização de AGA. Se pretender criar AGA para efeitos das alíneas d) a g), é aconselhável contactar a sua autoridade nacional/regional/competente para determinar se o objetivo foi atribuído corretamente. Para os projetos que abrangem apenas a manutenção de linhagens existentes, há que selecionar «manutenção» no resumo não técnico do projeto e na comunicação de dados estatísticos. No entanto, é importante que o domínio geral de utilização seja explicado no contexto do pedido de projeto, bem como no resumo não técnico do projeto.

c. Objetivos do projeto

No caso de um projeto científico, importa indicar claramente os objetivos científicos do projeto. A grande maioria (> 95 %) das novas linhagens GA são produzidas para fins de investigação fundamental (as restantes para investigação translacional/aplicada). Estas linhagens são utilizadas para apoiar projetos autorizados a investigar objetivos específicos numa disciplina científica. Um exemplo deste tipo poderia ser um projeto de neurologia para investigar os genes envolvidos na desmielinização (degeneração nervosa), com a intenção de criar estratégias de tratamento de doenças debilitantes, como a esclerose múltipla. Tal projeto pode solicitar autorização para o desenvolvimento de uma série de novas linhagens GA a fim de investigar a patogénese (causas) da desmielinização. Poderia ainda incluir todos os procedimentos necessários à criação, manutenção e subsequente utilização científica desses animais, no âmbito de um programa de trabalho definido.

Para um projeto científico, o pedido teria de abordar questões como:

- Por que razão são necessários os animais/as linhagens em causa?
- Os motivos para a escolha da espécie
- Para que estudos serão utilizados?
- Que resultados/objetivos científicos serão alcançados através da produção destes animais?
- Por que razão é necessário cada um dos procedimentos solicitados para a criação, reprodução/manutenção das linhagens GA em causa.

Em alternativa, no caso dos projetos de serviços, o pedido terá de definir os objetivos em torno da prestação de serviços de elevada qualidade, a fim de permitir que terceiros apresentem benefícios científicos.

- d. Quando os conhecimentos especializados necessários para o desenvolvimento de AGA estiverem disponíveis (quer no estabelecimento de investigação num projeto de serviços do

tipo B, quer noutra estabelecimento num projeto de serviços do tipo C), pode existir um pedido de projeto para gerar novas linhagens GA com vista a satisfazer as necessidades de múltiplos grupos de investigação. Há que ponderar a utilização destes conhecimentos especializados para prestar um serviço eficiente que satisfaça as necessidades tanto da comunidade científica interna como da comunidade científica em geral. Para um projeto de serviços, o pedido deve abordar questões como:

- A procura do serviço;
- As espécies que serão oferecidas e a experiência pertinente com cada uma delas;
- De que forma o requerente determinará qual será a utilização e a finalidade dos animais (antes da criação/manutenção);
- Quais as vantagens que este serviço proporcionaria aos utilizadores finais;
- Por que razão é necessário cada um dos procedimentos solicitados para a criação, reprodução/manutenção das linhagens GA em causa.

e. Sempre que adequado e permitido no Estado-Membro em causa, os projetos de AGA podem ser autorizados como projetos genéricos múltiplos, conforme previsto no artigo 40.º. No entanto, os projetos genéricos múltiplos também têm de assegurar que, para cada nova linhagem, o objetivo dos procedimentos, tal como exigido pelo artigo 5.º da diretiva (ver ponto 1b *supra*), possa ser corretamente identificado nos termos da autorização e documentado. No caso dos projetos de serviços, há que descrever no pedido o processo operacional interno para a encomenda de novas linhagens do cliente, incluindo a organização, a gestão e a análise dos pedidos no estabelecimento. Os processos em causa devem demonstrar uma boa governação e controlo de qualidade do processo interno de tomada de decisões. Nestes casos, o processo interno assegura a governação do desenvolvimento da nova linhagem, a fim de garantir que os processos locais sejam suficientes para cumprir os requisitos da autorização de projeto. Uma boa manutenção de registos é essencial, bem como a garantia de que os registos da tomada de decisões para cada linhagem serão posteriormente disponibilizados e abertos para consulta/revisão pela autoridade competente, com vista a assegurar a eficácia contínua da supervisão interna. É importante que o número total previsto de animais e as respetivas severidades sejam totalmente abrangidos pelo pedido e subsequente autorização. Após a criação e o estabelecimento de novas linhagens, é frequentemente necessário manter estas linhagens estabelecidas. Por conseguinte, é oportuno equacionar um projeto combinado de criação e manutenção, antes de os animais serem transportados para utilização continuada num projeto de utilizador. Quando for necessária apenas a manutenção de linhagens estabelecidas, estas podem ser reproduzidas e mantidas num projeto de reprodução/manutenção especializado (projeto de serviços do tipo A), antes de serem fornecidas a um utilizador diferente para utilização continuada no âmbito do respetivo projeto autorizado. A autorização do serviço pode ser um projeto genérico múltiplo, mas é improvável que a autorização de projeto do utilizador final o seja.

f. No caso de projetos científicos, há que ponderar se seria mais eficaz se as linhagens fossem produzidas num local de criação especializado onde a eficiência poderia ser maior, não

sendo assim necessário incluir no projeto de utilização científica procedimentos de vasectomia, superovulação ou transferência de embriões.

- g.** No caso de projetos científicos em que as linhagens não sejam criadas no mesmo estabelecimento de investigação, importa ter em conta as pressões causadas pelo transporte, que devem ser minimizadas sempre que os gâmetas/embriões não possam ser importados/trazidos do outro estabelecimento. A qualidade da fonte deve ser elevada quando se utiliza um serviço especializado, mas o cliente deve aplicar as devidas diligências.
- h.** É importante incluir a discussão sobre a possibilidade de ocorrência de efeitos fora do alvo e a estratégia de observação para os detetar (parte 2, secção 2).

2. Relevância e impacto dos potenciais benefícios

Os pedidos devem indicar claramente:

- a.** Quais serão os benefícios da produção das linhagens GA?
- b.** Quem beneficiará com os resultados?
- c.** De que modo se materializará esse benefício ou qual será o impacto dos resultados **deste projeto**?
- d.** Quando (sempre que possível) serão os benefícios alcançados?

Quando é solicitada uma autorização de projeto destinada a produzir linhagens GA múltiplas, talvez diversas, para diferentes fins de investigação (normalmente projetos de serviços), incluindo projetos genéricos múltiplos, os principais benefícios podem ser a prestação de um serviço eficiente e eficaz de elevada qualidade aos clientes por especialistas altamente experientes que forneçam AGA precisos e de elevada qualidade, com minimização dos danos para o bem-estar e do número de animais.

No caso dos pedidos de criação (e manutenção) de linhagens GA para fins de investigação fundamental (projetos científicos), deve haver um compromisso de divulgação dos resultados.

No caso dos pedidos de autorização de serviços, deve haver um compromisso no sentido de minimizar os excedentes e partilhar as linhagens, sempre que possível.

3. Adoção/inclusão de métodos de substituição, redução e refinamento da utilização de animais em procedimentos

A parte 2 do presente documento de orientação contém informações pormenorizadas sobre os meios de abordar os três R. É essencial que o requerente demonstre no pedido que todos os aspetos pertinentes foram tidos em conta.

Seguem-se exemplos dos principais elementos.

a. Substituição.

O pedido deve indicar claramente por que razão a utilização dos animais é necessária, que alternativas foram equacionadas e por que razão não podem ser utilizadas. Esta secção deve também contextualizar o trabalho com animais no âmbito do programa científico global, ou seja, que alternativas estão a ser utilizadas para os aspetos do projeto e quais as suas contribuições.

Por exemplo, pode incluir:

- i. Para evitar duplicações desnecessárias, que pesquisa foi/continuará a ser efetuada para identificar se as linhagens estão/ ficam disponíveis noutra local.
- ii. Ponderação da utilização de tipos de animais não abrangidos pelo âmbito de aplicação da diretiva, como *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*.

b. Redução

Esta secção deve incluir a tomada em consideração de estratégias experimentais ou observacionais/de reprodução, a fim de minimizar o número de animais. Os modelos estatísticos raramente desempenham um papel na **fase de criação** de AGA. No entanto, uma boa gestão das colónias que concilie a oferta com a procura é fundamental para a redução. Exemplos de questões a abranger:

- i. Ponderação da tecnologia genética mais adequada para alcançar os objetivos científicos de forma mais eficiente;
- ii. De que forma a monitorização do número de animais, gâmetas, descendentes, etc., será utilizada para criar e reproduzir animais de forma eficiente;
- iii. Ponderação da criopreservação para reduzir a exigência de manutenção de tantos animais vivos;
- iv. Pormenores sobre qualquer proposta de reutilização de animais e o seu efeito cumulativo nos animais - por exemplo, descendência de tipo selvagem que foi genotipada com recurso a um método invasivo, que é depois utilizada para superovulação com vista a obter óvulos de tipo selvagem para manipulação genética;
- v. Utilização de animais para extração de órgãos/tecidos;
- vi. Clarificação do método utilizado para estimar o número especificado de animais solicitados, nomeadamente número de linhagens a reproduzir/criar, número de destinatários cirúrgicos solicitados, etc.

c. Refinamento

Não serão suficientes observações genéricas de que serão aplicados refinamentos. Os requerentes devem explicar de que forma a utilização de animais será refinada nos procedimentos planeados, incluindo a redução, prevenção e atenuação de qualquer forma de sofrimento dos animais, desde o seu nascimento até à morte, quando adequado, nomeadamente:

- i. A utilização prevista de anestesia, analgésicos e outros métodos para aliviar a dor nos procedimentos cirúrgicos necessários para a criação de uma nova

- linhagem GA: por exemplo, vasectomia, transferência cirúrgica de embriões;
- ii. Fases do ciclo de vida a utilizar - incluindo a utilização de fêmeas muito jovens na reprodução/colheita de óvulos;
 - iii. Escolha dos métodos de colheita de amostras de tecidos - utilização de tecidos excedentários da marcação ou, quando são propostos métodos invasivos, justificação das razões pelas quais os métodos não invasivos não são adequados e que métodos de anestesia/analgesia local serão utilizados;
 - iv. Condições de alojamento, maneo e prestação de cuidados aos animais - por exemplo, os animais imunocomprometidos serão mantidos em condições de barreira, a fim de reduzir a probabilidade de infeção, utilização de alimentos específicos, por exemplo alimento humedecido, durante mais tempo para as crias que se prevê serem mais pequenas do que o normal para a idade, aumento da temperatura do alojamento para os animais glabros (sem pelo);
 - v. Utilização de limites críticos humanos - particularmente importantes para os fenótipos nocivos, em especial nos casos em que os danos têm um impacto elevado. Os limites críticos humanos relacionados com a idade podem ser significativos - por exemplo, occisar antes dos 6 meses de idade quando o [fenótipo] é observado pela primeira vez;
 - vi. Métodos de occisão - a escolha dos métodos de occisão deve ser refinada ao máximo, por exemplo, o método do anexo IV utilizado para occisar as mães recetoras após o desmame das ninhadas produzidas por implantação cirúrgica. Em alguns casos, quando são necessários tecidos de AGA, pode ser necessário incluir numa autorização de reprodução e manutenção um método não enumerado no anexo IV, a título de exceção, se se tratar da única «utilização». Para os métodos não enumerados no anexo IV, deve ser fornecida uma justificação específica, por exemplo a utilização de fixação por perfusão é necessária para preservar a microanatomia em alguns casos científicos;
 - vii. Outros destinos dos animais - destino dos animais reprodutores reformados, reutilização de animais de tipo selvagem;
 - viii. Descrição dos processos em vigor para assegurar a adoção de novas técnicas de refinamento durante a vigência do projeto.

4. Classificação de severidade dos procedimentos:

Uma vez concluídos os procedimentos, juntamente com todos os refinamentos a aplicar, deverá ser possível atribuir severidades prospetivas a cada procedimento.

No caso de projetos científicos, a severidade prospetiva incluirá a ponderação da severidade da utilização continuada, bem como dos impactos da linhagem propriamente dita. Em alguns casos em que não haja reprodução ou manutenção na autorização, deve ser discutido o processo

de obtenção da severidade até ao ponto de fornecimento pelo criador, uma vez que se trata de uma consideração necessária para declarar a severidade efetiva no final do procedimento.

O pedido deve incluir informações sobre os procedimentos que serão utilizados durante a criação e manutenção de linhagens GA, os efeitos adversos que podem ser causados e os métodos que serão utilizados para minimizar os efeitos nos animais.

Para os projetos de serviços do tipo A, há que ter em conta os danos causados pela determinação invasiva do genótipo que não é utilizada para efeitos de identificação, e o impacto no bem-estar causado pela manutenção das próprias linhagens GA.

Para os projetos de serviços dos tipos B e C, para além dos danos descritos relativamente aos projetos de serviços do tipo A destinados à reprodução e manutenção, há que ter em conta os danos decorrentes dos procedimentos de criação (incluindo a imprevisibilidade dos danos nas novas linhagens GA).

Cada procedimento deve ter uma proposta de classificação de severidade, que reflita a maior severidade esperada. As informações sobre o gene-alvo devem permitir uma decisão informada quanto ao cenário mais desfavorável provável para cada animal. Só quando não for possível tomar uma decisão informada é que a atribuição cautelosa da severidade prospetiva deve ter a classificação «severa», mas os limites críticos iniciais devem ser descritos para reduzir os danos ao mínimo necessário.

Relativamente aos procedimentos que irão ser aplicados aos animais, são necessárias informações sobre:

- Frequência/duração dos procedimentos;
- Probabilidade de efeitos adversos;
- Nível de severidade e metodologias para minimizar essa severidade;
- Regime de monitorização; protocolos de avaliação do bem-estar;
- Limites críticos humanos e acionadores de intervenções.

Para os procedimentos normalmente exigidos, tais como transferência de embriões, superovulação, implantação cirúrgica de embriões e descendentes produzidos com fenótipo nocivo ou colheita de amostras de tecidos por um método invasivo, há que explicar os potenciais efeitos adversos e os métodos utilizados para os reduzir, como a analgesia, e assegurar a utilização dos métodos mais refinados.

Ao criar novas linhagens, importa ter em conta os potenciais efeitos adversos na descendência. Estes efeitos podem ser antecipados utilizando informações sobre os genes que irão ser alterados ou com base em informações de outras linhagens com alterações semelhantes. No entanto, podem surgir efeitos adversos inesperados em algumas linhagens - quando estes excederem a severidade prevista, poderá ser necessário alterar o projeto.

As severidades devem ser atribuídas em conformidade com os respetivos critérios de atribuição da secção II e exemplos do anexo VIII, bem como com as orientações do quadro de avaliação da severidade da UE, que incluem um exemplo de caso de AGA ([Modelo 6, página 80](#)).

Para além das severidades máximas para cada procedimento (classificação prospetiva da severidade), é importante demonstrar quais são os danos realisticamente esperados de todo o projeto, tendo em conta o projeto no seu todo e todos os procedimentos, facilitando assim a realização da avaliação dos danos e benefícios por parte do avaliador do projeto. O quadro do resumo não técnico do projeto pode constituir um meio útil para resumir estas informações:

Que espécies e número de animais está previsto utilizar? Quais são as categorias de severidade previstas e o número de animais em cada uma delas (por espécie)?	Espécie	Número total estimado	Número estimado por severidade			
			Não recuperação	Ligeira	Moderada	Severa
	Murganho	5 400	0	5 000	300	100
	Peixe-zebra	10 500	0	7 500	2 500	500

5. Impacto ambiental

Reduzir o impacto ambiental, quando adequado - além de não libertar AGA, este aspeto é raramente importante para este tipo de projeto.

6. Análise dos danos e benefícios

A análise dos danos e benefícios realizada pelos avaliadores inclui uma determinação da probabilidade de os benefícios propostos serem alcançados com êxito. É necessário demonstrar no pedido que os benefícios superam os danos.

- a. O domínio da alteração genética de animais está em rápida evolução e exige conhecimentos e competências específicos por parte das pessoas envolvidas no projeto, além de requisitos gerais de competência, que fornecem as informações necessárias para permitir a avaliação da probabilidade de êxito. Tal inclui competências, conhecimentos e experiência para executar o projeto de forma eficiente e eficaz, incluindo a experiência que permitirá a escolha de métodos de manipulação/edição genética e a manutenção da integridade das linhagens uma vez estabelecidas. O historial anterior do grupo de investigação e a qualidade e fiabilidade do trabalho que culminou no projeto são importantes. Embora não seja necessária experiência prévia, a probabilidade de êxito de um novo investigador é menor, o que deve ser tido em conta pelos avaliadores na análise dos danos e benefícios ao considerarem os conhecimentos especializados disponíveis para o projeto. Os novos investigadores no domínio em causa não serão impedidos de obter autorizações, desde que a probabilidade de êxito daquilo que solicitam seja suficientemente elevada. Os pedidos de projetos de serviços, incluindo os classificados como projetos genéricos múltiplos, devem demonstrar que existem

competências e experiência suficientes para tomar decisões sobre se o trabalho solicitado por terceiros (para o tipo B, dentro, e, para o tipo C, fora do estabelecimento) pode ser legitimamente realizado no âmbito do projeto proposto (consultar, na secção 1, exemplos dos tipos de decisões que podem ter de ser tomadas pelo requerente).

- b.** É também provável que os resultados positivos sejam maiores se o projeto dispuser de recursos adequados, em termos de pessoal, instalações e financiamento.

- c.** A demonstração de que os benefícios irão superar os danos é mais simples para os pedidos em áreas científicas específicas. Poderá ser mais difícil se o pedido disser respeito a um projeto genérico múltiplo. Neste caso, há que demonstrar o valor do próprio serviço, juntamente com os benefícios prováveis para a ciência das linhagens GA que serão incluídas no quadro de autorização do projeto.

Parte B: Exemplo ilustrativo da avaliação de propostas de projetos de AGA

Trata-se de um processo de duas etapas. Quando o avaliador emite um parecer sobre o pedido, deve verificar se as informações acima referidas estão incluídas no mesmo. Esta é a verificação descrita no ponto 1 *infra*. Quando todas as informações estiverem incluídas, pode avançar-se para a avaliação (no ponto 2 *infra*); no entanto, se não houver informações suficientes, não é possível realizar uma avaliação completa. Para cada secção pertinente, o avaliador deve remeter para os elementos acima referidos, a fim de assegurar que a qualidade das informações fornecidas permite tomar uma decisão sobre cada critério e que cumpre os requisitos legais. As considerações e os resultados a seguir apresentados variam em função dos tipos de autorizações descritos na parte A. Em alguns casos, as questões e os exemplos de resultados da avaliação aplicam-se a todos os tipos. São apresentados alguns exemplos em que existem diferenças.

1. A avaliação do projeto deve **verificar** se o projeto preenche os seguintes critérios:

	Critérios exigidos na avaliação do projeto:	Considerações sobre como os avaliadores dos projetos podem cumprir os requisitos de verificação	Exemplos de resultados da avaliação que abordam os principais elementos exigidos
a)	O projeto é justificado do ponto de vista científico ou educativo, ou é exigido por lei;	No caso de projetos científicos, o avaliador do projeto necessita de informações suficientes para poder decidir se a ciência vale a pena. OU No caso de projetos de serviços, incluindo projetos genéricos múltiplos, os avaliadores necessitam de informações suficientes sobre: - como será determinada a justificação da utilização de animais durante o ciclo de vida do projeto numa base linhagem/grupo por linhagem/grupo, e - como serão estabelecidos os benefícios científicos (ou outros) e	Este projeto fornecerá animais com mutações em vias que são conhecidas ou presumidas como estando associadas ao desenvolvimento de desmielinização. Os animais produzidos desta forma serão utilizados para descrever mais pormenorizadamente as vias, na esperança de que possam ser identificados alvos terapêuticos para desenvolvimento futuro. Prevê-se que vários destes alvos sejam identificados no período de cinco anos do projeto. Estes alvos serão divulgados a outros cientistas e potenciais empresas farmacêuticas/biotecnológicas mediante publicação em revistas científicas. Existe um elevado nível de financiamento cientificamente avaliado para este trabalho. O grupo tem efetuado publicações em revistas de alta qualidade e demonstrou bons progressos nos últimos cinco anos, o que sugere que a probabilidade de realização é elevada. OU

		<p>- o benefício resultante de um serviço especializado para terceiros.</p>	<p>No caso de um projeto de serviços do tipo A, as linhagens a reproduzir e manter são todas linhagens estabelecidas relacionadas com a obesidade. É assumido o compromisso de que os animais só serão fornecidos a estabelecimentos autorizados que comprovem ter uma autorização de projeto para este trabalho mediante o fornecimento do número de autorização do projeto. Este grupo tem experiência em processos de reprodução eficientes que adequam a oferta à procura.</p> <p>OU</p> <p>No caso de projetos de serviços dos tipos B e C, o requerente é um especialista de renome no domínio da tecnologia transgénica e contribuiu para a elaboração de orientações sobre as melhores práticas neste domínio. Todos os procedimentos solicitados foram executados nos últimos dez anos e existem provas de refinamentos e medidas que reduziram o número de excedentes. Este grupo efetuou grandes melhorias na garantia da qualidade das linhagens e da integridade genética. Foram descritos sistemas de boa governação para garantir que cada nova linhagem não está já disponível noutra local e que os benefícios da produção de cada linhagem superarão os danos que deverão ser causados pelos procedimentos de criação necessários. A produção de cada linhagem é financiada pelo cliente, que deverá ser um cientista/utilizador legítimo com uma elevada expectativa de resultados científicos de qualidade. Os modelos de registos dos processos internos devem gerar todas as informações necessárias para a tomada de decisões e consta que estarão disponíveis para consulta.</p>
b)	Os objetivos do projeto justificam a utilização de animais; e	Neste caso, a decisão inclui uma consideração dos benefícios esperados e uma determinação da potencial utilização de alternativas.	Tendo em conta que a desmielinização provoca uma série de doenças que induzem deficiências desde tenra idade e, muitas vezes, morte prematura, e a oportunidade proporcionada por este projeto de identificar potenciais alvos terapêuticos para

			<p>melhorar os resultados, justifica-se a criação, reprodução, manutenção e utilização de animais geneticamente alterados para esse efeito.</p> <p>O requerente demonstrou através de pesquisas, e os avaliadores concordam, que não existem métodos alternativos que possam substituir a utilização de animais geneticamente alterados neste projeto.</p>
c)	<p>O projeto é concebido de modo a permitir que os procedimentos sejam realizados da forma mais humana e mais respeitadora do ambiente possível.</p>	<p>O avaliador tem de estar certo de que não existem quaisquer refinamentos que possam ser incluídos (alcançando, na mesma, os resultados científicos/educativos/regulamentares). Os impactos ambientais não deverão ser pertinentes para este tipo de projeto.</p>	<p>Foram fornecidas informações suficientes sobre a monitorização dos animais para deteção de sinais relacionados com a desmielinização, e foram incluídos limites críticos adequados para a avaliação a realizar (ver <i>infra</i>).</p>
<p><i>Em alguns casos, as versões iniciais do projeto não conterão informações suficientes para poder verificar estas questões. Nesse contexto, há que enviar ao requerente observações específicas relativas às deficiências e um convite para que complemente/altere o pedido. Na maioria dos casos, essas observações devem ser combinadas com quaisquer informações adicionais que sejam necessárias para permitir a conclusão da avaliação do projeto.</i></p>			

2. A avaliação do projeto comporta, nomeadamente, o seguinte:

	Elementos exigidos na avaliação do projeto:	Exemplos de considerações sobre como o avaliador do projeto pode cumprir os requisitos de avaliação	Exemplos de resultados da avaliação que abordam os principais elementos exigidos
a)	Uma avaliação dos objetivos do projeto, dos benefícios científicos previstos ou do seu valor educativo;	<p>O avaliador do projeto deve determinar, com base nas informações constantes do pedido, se a ciência vale a pena. Por exemplo: a criação dos AGA descritos permitirá obter informações sobre o processo ou as consequências da doença? É provável que, se houvesse conhecimentos disponíveis, tal levaria a um avanço no sentido de terapêuticas para os doentes com esta doença? Os modelos são suscetíveis de ter validade? O que se perderia se este trabalho não fosse realizado?</p> <p>OU</p> <p>No caso de projetos de serviços, incluindo projetos genéricos múltiplos, quais são as vantagens da utilização de um serviço centralizado?</p> <p>A criação e a manutenção serão mais eficazes e eficientes se forem realizadas desta forma? Haverá vantagens para os animais em termos de bem-estar?</p> <p>O processo de tomada de decisão sobre as linhagens a produzir é sólido? Se a justificação da utilização de animais será determinada numa base linhagem/grupo por linhagem/grupo, e como serão estabelecidos os benefícios científicos (ou outros) de cada linhagem.</p>	<p><i>No caso de um projeto científico:</i></p> <p>Este projeto criará linhagens de murganhos GA que serão utilizadas para investigar as vias relacionadas com a deposição de mielina e/ou os processos inflamatórios conexos. Esperam-se avanços no conhecimento que sirvam de base para potenciais tratamentos. Embora não se preveja o desenvolvimento de tratamentos no decurso deste projeto, deverão ser adicionados conhecimentos significativos à literatura, o que permitirá que outros se concentrem em alvos prováveis suscetíveis de melhorar a qualidade e o tempo de vida destes doentes a longo prazo.</p> <p><i>Ou</i></p> <p><i>No caso de um projeto de serviços:</i></p> <p>As competências desta equipa deverão proporcionar um serviço eficiente e eficaz de criação e manutenção de linhagens GA de elevada qualidade, que constituirão a base para o desenvolvimento da ciência, tanto básica como aplicada a áreas terapêuticas específicas. Consta que cada linhagem só será produzida após uma análise cuidadosa dos benefícios específicos (no contexto da área terapêutica definida) suscetíveis de ocorrer, e os objetivos da produção serão definidos conforme enunciado no artigo 5.º, podendo ser subseqüentemente comunicados, tal como especificado na Decisão de Execução (UE) 2020/569 da Comissão.</p>
b)	Uma avaliação da conformidade do projeto com o requisito de	Cada um destes deve ser considerado separadamente. O requerente faz referência a quaisquer bases de dados mencionadas na <i>(parte 2; anexo 1)</i> ou demonstra de	

	<ul style="list-style-type: none"> i. substituição ii. redução iii. refinamento 	<p>outra forma que tem conhecimento dos 3R neste domínio?</p> <ul style="list-style-type: none"> i. Foram efetuadas pesquisas quanto a linhagens preexistentes? Foram apresentados argumentos a favor da necessidade da criação? Os avaliadores têm conhecimento de métodos alternativos pertinentes que não sejam excluídos pelo requerente por serem alegadamente inadequados? Na opinião dos avaliadores, o requerente apresenta argumentos completos e válidos de que os animais são necessários? ii. O requerente indica adequadamente de que forma irá assegurar que a oferta satisfaça a procura? Há reflexões sobre estratégias de gestão das colónias, sugerindo que o controlo de qualidade será sólido e que os animais excedentários serão minimizados e/ou reutilizados, quando adequado? <ul style="list-style-type: none"> <u>No caso de projetos científicos:</u> o texto apresentado no pedido dá garantias de que será utilizado o menor número de animais para obter uma base científica sólida? OU <u>No caso de projetos de serviços,</u> o texto apresentado no pedido dá garantias de que será utilizado o menor número de animais para fazer corresponder a oferta à procura? iii. As considerações no ponto 1(c) já terão verificado que serão utilizados os métodos mais 	<ul style="list-style-type: none"> i. <u>No caso de um projeto científico:</u> este grupo está a realizar um trabalho extenso com linhas celulares e culturas mistas, mas como o tecido nervoso é uma interação complexa de tipos de células, mesmo as técnicas multicelulares estruturalmente orientadas <i>in vitro</i> não podem, neste momento, replicar todos os componentes em estudo. <p><u>Para todos os tipos de projetos:</u> o grupo fez referência a bases de dados que serão pesquisadas quanto a linhagens preexistentes.</p> ii. <u>Para todos os tipos de projetos:</u> foram descritas estratégias que sugerem que serão tomadas todas as medidas adequadas, como a gestão da reprodução das colónias e da estirpe de base, para reduzir o número de animais ao mínimo necessário, assegurando simultaneamente a integridade genética e a redução da deriva genética nas linhagens produzidas. <p><u>No caso de projetos científicos e projetos de serviços dos tipos B e C:</u> a criopreservação é discutida. Resulta claramente dos dados de produção (criação) que os sistemas são tão eficientes como outros grupos ou, em muitos casos, melhores. Há evidências, ao longo dos últimos cinco anos, de atualização e melhoria das práticas para aumentar a eficiência e reduzir os excedentes. Prevê-se a manutenção desta abordagem ao longo dos próximos cinco anos.</p> iii. <u>No caso de um projeto científico:</u> sempre que esteja prevista a utilização de linhagens GA desmielinizadas, é expectável uma fraqueza, a menos que seja controlada/evitada pelas substâncias em estudo modificadoras da doença propostas. Para os animais de controlo e os casos em que o produto em estudo é ineficaz, foi descrito o faseamento e as fases estão
--	--	---	--

		<p>humanos. Esta secção deve dar seguimento a esta questão e os avaliadores devem poder determinar os impactos esperados de cada um dos procedimentos incluídos. O requerente deverá ter explicado os procedimentos e os seus efeitos adversos nos animais, para que seja possível determinar os danos globais causados aos animais.</p> <p><u>Para todos os projetos:</u> o avaliador deve determinar se está prevista a aplicação de refinamentos suficientes à reprodução de animais com fenótipos nocivos. O avaliador deve ter em conta a probabilidade de efeitos adversos inesperados nas novas linhagens GA.</p> <p><u>No caso de projetos de serviços dos tipos B e C e projetos científicos pertinentes:</u> o avaliador deve determinar se está prevista a aplicação de refinamentos suficientes à superovulação, à vasectomia ou ao transplante de embriões nos recetores; tem ainda de compreender a proporção dos animais que irão sofrer e em que medida e duração, tendo em conta os refinamentos e os limites críticos a aplicar. Poderá ser útil consultar a página 25 do Documento de trabalho sobre a avaliação de projetos e a avaliação retrospectiva.</p> <p>Estes conhecimentos devem ser integrados na secção seguinte, permitindo a determinação da classificação de severidade.</p>	<p>alinhadas com os resultados científicos exigidos para cada um dos objetivos, com a occisão aquando do aparecimento de fraqueza dos membros anteriores, demonstrada pela reduzida força de preensão, prevista para 80 % dos animais destas linhagens GA. 20 % dos animais serão mantidos até aos primeiros sinais definitivos de fraqueza dos membros posteriores. Nenhuma das fases terá qualquer impacto observável na capacidade de o animal se alimentar, beber ou se limpar. Quando se verificar fraqueza dos membros posteriores, a locomoção será reduzida. Será efetuada monitorização quatro vezes por dia quando se verificar fraqueza dos membros anteriores, de modo a assegurar uma duração limitada (não superior a 18 horas) da fraqueza dos membros posteriores.</p> <p>Os impactos da administração dos produtos em estudo devem ser ligeiros e transitórios graças apenas ao método de administração, tendo em conta as informações pormenorizadas disponíveis sobre a segurança dos agentes terapêuticos em estudo.</p> <p>E/OU</p> <p><u>No caso de projetos científicos e de serviços:</u> o genótipo da maioria dos animais reprodutores não deverá causar danos, desde que a barreira de biossegurança descrita no pedido permaneça intacta, o que, historicamente, se tem verificado. Alguns animais apresentariam fraqueza se fossem mantidos por mais de seis meses; contudo, prevê-se que os animais para utilização sejam transferidos para o projeto/protocolo X às seis semanas de idade, sendo normais até essa altura, conforme verificado na avaliação durante o período de cativeiro. Os animais reprodutores desta linhagem serão substituídos até aos seis meses de idade.</p> <p>Está prevista a conservação dos relatórios de bem-estar dos AGA para cada linhagem com um fenótipo nocivo, assegurando uma boa monitorização e comunicação.</p>
--	--	--	---

			<p><u>No caso de projetos científicos e projetos de serviços dos tipos B e C:</u></p> <p>Por estar prevista a utilização de monitorização da escala de expressões faciais com analgesia adequada, conforme determinado pelo veterinário designado, é de esperar um bom controlo da dor para todos os animais, pelo que os impactos da implantação e da vasectomia devem ser reduzidos, com plena recuperação dos comportamentos normais no prazo de 24 horas.</p> <p>A superovulação provoca dor momentânea no animal a cada injeção, mas o impacto deve ser mínimo.</p>
c)	Uma avaliação e atribuição da classificação da severidade dos procedimentos;	O requerente deve emitir um parecer sobre a classificação prospetiva da severidade de cada um dos procedimentos. Os avaliadores do projeto devem verificar ou determinar e reatribuir severidades a cada um dos procedimentos (ou séries de procedimentos), de modo a alinhá-las com o anexo VIII, adaptadas ao caso específico em questão em conformidade com a secção II do referido anexo, e com quaisquer orientações suplementares da UE e/ou dos Estados-Membros. Quando se tratar de um processo de verificação, há que confirmar se as atribuições apresentadas estão corretas.	<p>Nós [os avaliadores] concordamos com a opinião do requerente relativamente às severidades atribuídas à maior parte dos procedimentos enumerados. No entanto, houve algum debate sobre a severidade provável de algumas das linhagens desmielinizantes, em especial quando a alteração e as intervenções induzem progressão para o estado clínico grave. Os argumentos apresentados relativamente à monitorização, ao faseamento e à aplicação de limites críticos iniciais nas diferentes fases convenceram-nos e, tendo em conta as informações comparativas pertinentes constantes do anexo VIII, as orientações da UE sobre exemplos de severidade e o artigo de Zintzsch¹⁵, consideramos que deve ser atribuída ao procedimento X uma severidade prospetiva moderada e não severa como atribuída pelo requerente. Concordamos que os procedimentos Y e Z devem ser severos. O pessoal (científico e técnico) tem um elevado nível de experiência nestes sinais e prevê-se que a deteção descrita seja boa.</p> <p>OU</p> <p>No caso de um projeto de serviços do tipo B:</p>

¹⁵ Zintzsch A, Noe E, Reißmann M, Ullmann K, Krämer S, Jerchow B, Kluge R, Gösele C, Nickles H, Puppe A, Rüllicke T; [Guidelines on severity assessment and classification of genetically altered mouse and rat lines](#) (não traduzido para português); (2017).

			<p>Concordamos com a opinião do requerente relativamente às severidades atribuídas aos procedimentos enumerados. As linhagens mantidas não excederão a severidade moderada, uma vez que qualquer linhagem que se preveja tornar-se grave será transferida para o utilizador com mais de 6 semanas de antecedência em relação ao aparecimento previsto de sinais mais significativos. Foi assumido o compromisso de que as remessas de animais serão acompanhadas de avaliações do bem-estar, a fim de permitir a apresentação de relatórios adequados pelo utilizador final. Os efeitos adversos inesperados resultarão em ocisão por métodos humanos.</p>
d)	<p>Uma análise dos danos e benefícios do projeto, destinada a determinar se os danos causados aos animais em termos de sofrimento, dor e angústia são justificados pelos resultados esperados, tendo em conta as considerações de ordem ética, e se, em última análise, podem beneficiar o homem, os animais ou o ambiente;</p>	<p>Esta análise deve ser efetuada após a conclusão de TODOS os outros aspetos da avaliação, uma vez que exige a assimilação de todas as informações.</p> <p>Os avaliadores devem consultar as páginas 27-30 do Documento de trabalho sobre a avaliação de projetos e a avaliação retrospectiva. Os avaliadores devem assegurar que os benefícios relacionados com o domínio científico do programa são realistas e específicos dos procedimentos descritos em matéria de criação, reprodução e utilização de AGA (quando incluídos).</p> <p>Se for caso disso, deve ser efetuada uma avaliação das vantagens de um serviço centralizado que utilize os conhecimentos especializados e o historial do grupo, comparativamente a outros grupos geralmente menos qualificados que realizam a criação, reprodução e manutenção.</p> <p>O avaliador do pedido de projeto deve ter em conta os danos que os animais podem vir a sofrer durante a execução do projeto.</p> <p>Os danos acima referidos devem ser considerados no que diz respeito aos seguintes elementos:</p>	<p>No caso de um projeto científico:</p> <p>Este requerente nunca foi titular de uma autorização, mas trabalhou noutra grupo com experiência no domínio e espécies em causa, aumentando assim a probabilidade de êxito. Recebeu toda a formação exigida, conforme estabelecido no documento «Quadro para a educação e a formação». A equipa é pequena, mas esperamos que os objetivos, tal como descritos, possam ser alcançados. As pesquisas sobre o requerente na PubMed revelam algumas publicações neste domínio, nomeadamente em duas revistas de alto impacto.</p> <p>O nível descrito de monitorização e utilização de fichas de pontuação deve garantir a aplicação de limites críticos adequados para limitar os danos ao máximo descrito no pedido. O requerente comprometeu-se a formar novo pessoal no faseamento da doença e a supervisioná-lo diretamente até ter as competências necessárias.</p> <p>Propõe-se a utilização de até 5 400 murganhos e 10 000 peixes-zebra neste projeto, ~400 para procedimentos cirúrgicos e os restantes para reprodução. Apenas cerca de 20 % dos animais reprodutores deverão apresentar sinais moderados e 4 % poderão ser severos, com uma grande percentagem a parecer normal na avaliação durante o período em cativeiro.</p>

		<ul style="list-style-type: none"> - Probabilidade de efeitos adversos na descendência, especialmente na criação; - Regime de monitorização; protocolos de avaliação do bem-estar, tendo em conta os refinamentos propostos; - Nível de severidade e metodologias para minimizar essa severidade; - Limites críticos humanos e acionadores de intervenções; - Frequência/duração dos procedimentos; <p>Os avaliadores devem também ter em conta o número total de animais solicitados, o número que se prevê vir a sofrer com a severidade prospetiva (máxima) e as proporções que sofrerão, em menor grau, para avaliar os danos totais prováveis do projeto.</p> <p>A probabilidade de êxito deve ser avaliada tendo em conta os conhecimentos e as competências disponíveis, bem como a probabilidade de o grupo aplicar os refinamentos e efetuar a devida monitorização. O historial de publicações e/ou de produção de AGA é pertinente. São propostos desenvolvimentos inovadores que possam ter menor êxito do que os métodos estabelecidos? Em alguns casos, embora a probabilidade de êxito seja inferior, o impacto potencial dos benefícios em caso de êxito pode ser muito elevado - por exemplo, técnicas inovadoras.</p>	<p>Na nossa opinião, os benefícios do maior conhecimento do efeito da manipulação da via P no processo de desmielinização por parte dos cientistas neste domínio, que será divulgado através de publicações, apresentações e colaborações, superam os danos previstos, conforme descritos.</p> <p>No caso de um projeto de serviços do tipo B:</p> <p>Este requerente tem um bom historial na garantia de uma produção eficaz e eficiente de linhagens solicitadas pelos clientes. Os clientes que retornam atestam esta qualidade, especialmente tendo em conta que existem opções mais baratas. As pesquisas realizadas na PubMed em relação a um pequeno número das linhagens criadas e fornecidas nos últimos cinco anos mostram que existe uma produção científica de elevada qualidade em revistas de prestígio, beneficiando a comunidade científica em diversos domínios. O grupo participou na formação de cientistas no domínio da integridade genética e no modo de reprodução de linhagens, a fim de garantir uma base científica mais sólida.</p> <p>Trata-se de uma equipa de elevada qualidade com capacidade comprovada para produzir resultados, que fornece linhagens GA de forma eficiente e eficaz a pessoas menos capazes de fornecer essas linhagens de elevada qualidade. O nível de monitorização, formação e utilização de fichas de pontuação garante a aplicação de limites críticos adequados para limitar os danos ao máximo descrito no pedido. Propõe-se a utilização de até 5 400 murganhos e 10 000 peixes-zebra neste projeto, ~400 para procedimentos cirúrgicos e os restantes para reprodução. Apenas cerca de 20 % dos animais reprodutores deverão apresentar sinais moderados e 4 % poderão ser severos, com uma grande percentagem a parecer normal na avaliação durante o período em cativeiro.</p> <p>No caso de um serviço, capacidade comprovada para produzir resultados, fornecendo linhagens GA de forma eficiente e eficaz a pessoas menos capazes de fornecer essas linhagens de elevada qualidade. O nível de</p>
--	--	--	--

			<p>monitorização, formação e utilização de fichas de pontuação garante a aplicação de limites críticos adequados para limitar os danos ao máximo descrito no pedido. Propõe-se a utilização de até 5 400 murganhos e 10 000 peixes-zebra neste projeto, ~400 para procedimentos cirúrgicos e os restantes para reprodução. Apenas cerca de 20 % dos animais reprodutores deverão apresentar sinais moderados, com uma grande percentagem a parecer normal na avaliação durante o período em cativeiro.</p> <p>Na nossa opinião, os benefícios para a ciência, para a redução e para o bem-estar dos animais, decorrentes da utilização desta equipa de alta qualidade para a prestação do serviço em causa a outros cientistas, superam os danos esperados, conforme descritos.</p>
e)	Uma avaliação das justificações científicas a que se referem os seguintes artigos:		
	Artigo 6.º - Métodos de occisão	É pouco provável que sejam exigidas justificações/isenções específicas, que sejam diferentes das exigidas em qualquer projeto.	
	Artigo 7.º - Espécies ameaçadas de extinção	Não deverá ser pertinente para os projetos de AGA.	
	Artigo 8.º - Primatas não humanos	Pouco comum, mas, se solicitado, é necessária uma justificação cuidadosa (ver https://ec.europa.eu/info/sites/default/files/research_and_innovation/ege/ege_ethics_of_genome_editing_opinion_publication.pdf).	
	Artigo 9.º - Animais capturados no meio selvagem	Não pertinente para estes projetos.	
	Artigo 10.º - Os animais enumerados no anexo I devem	Se solicitado, é necessária uma justificação cuidadosa.	

	ser criados para serem utilizados em procedimentos, salvo justificado em contrário		
	Artigo 11.º - Animais errantes ou assilvestrados	Não deverá ser pertinente para os projetos de AGA.	
	Artigo 12.º - Os procedimentos devem ser realizados num estabelecimento	Não há razão para que este tipo de projeto seja realizado fora de um estabelecimento. Existe outra legislação que exige o confinamento de AGA.	
	Artigo 14.º - Utilização de anestesia e analgésicos	Estes podem ser especificamente abrangidos na secção relativa ao refinamento e/ou na secção relativa aos efeitos adversos dos protocolos. Os avaliadores do projeto devem determinar se é claro que será utilizada anestesia e analgésicos para procedimentos cirúrgicos utilizados na criação (recetores de embriões, vasectomia). Também para a determinação do genótipo, a menos que o método seja momentâneo e a administração de analgesia/analgésicos fosse mais traumática.	Foram apresentadas descrições claras dos tipos de anestesia/analgésicos, bem como dos regimes de monitorização, incluindo as escalas de expressões faciais. Foi indicado que os conselhos do veterinário designado foram seguidos numa base casuística. O veterinário demonstrou conhecimentos adequados e atualizados das práticas modernas neste domínio, o que oferece garantias de que os animais serão submetidos a regimes anestésicos e analgésicos ideais. Equacionou-se a utilização de anestesia para a marcação da orelha, mas foi considerada mais traumática do que o procedimento propriamente dito neste caso, em que pessoal experiente realiza um único corte da orelha por método de punção; concordamos com este parecer.
	Artigo 16.º - Reutilização	Todos os animais criados para utilização serão transferidos para um protocolo de utilização (utilização continuada e não reutilização). Poderá ocorrer reutilização, nomeadamente de animais genotipados utilizando um método invasivo, mas que se revelam de tipo selvagem e não são necessários como controlos. Tratar-se-ia de redução se estes animais pudessem ser	Excepcionalmente, está prevista a reutilização de alguns animais de tipo selvagem. Embora o genótipo seja determinado por corte da orelha, este grupo utiliza <i>chips</i> de ID para facilitar a comunicação da monitorização contínua, pelo que o método de colheita de amostras de tecidos para determinação do genótipo é considerado uma utilização. Os animais de tipo selvagem aos quais tenha sido atribuída uma severidade efetiva ligeira e cuja reutilização esteja prevista serão observados pelo veterinário

		utilizados para um fim diferente. Se tal for solicitado, deve ser claramente demonstrado que as condições previstas no artigo 16.º serão respeitadas (restrições de severidade e determinação por um veterinário).	designado, que informará se o estado geral de saúde dos animais foi totalmente restabelecido. Apenas os animais que preencham estes dois critérios podem ser reutilizados em procedimentos de severidade não superior a moderada. Este processo está em conformidade com os requisitos legais e pode ser autorizado.
	Artigo 33.º - Devem ser cumpridos os requisitos em matéria de alojamento e cuidados a prestar	<p>Além da conformidade com o anexo III da diretiva para todos os animais, há que descrever e justificar qualquer proposta de alojamento individual para murganhos vasectomizados.</p> <p>É importante declarar que todos os animais que estejam ou possam estar imunocomprometidos serão mantidos em gaiolas individualmente ventiladas (GIV) (método mais refinado), se for caso disso.</p> <p>É necessário incluir quaisquer requisitos específicos em matéria de manejo e/prestação de cuidados que sejam pertinentes para as linhagens GA específicas a autorizar.</p>	<p>Consta que todos os animais serão mantidos de acordo com as normas do anexo III, com as seguintes exceções: o alojamento individual de machos adultos maduros vasectomizados foi justificado pelo facto de a separação durante o acasalamento poder não permitir a recombinação de grupos de irmãos nos períodos em que não se encontram em pares reprodutores. Concordamos que tal pode ser necessário para alguns indivíduos e que o grupo de investigação está a tomar todas as medidas que pode para manter o alojamento social sempre que possível.</p> <p>Prevê-se o alojamento individual de alguns animais após a atribuição do estudo. O emparelhamento com animais de tipo selvagem está a ser tentado no âmbito dos critérios de conceção experimental, mas este processo ainda não foi aperfeiçoado, pelo que, de momento, poderão justificar-se alguns alojamentos individuais neste contexto. Não será por um período superior a três semanas, uma vez que os limites críticos científicos serão alcançados nesse espaço de tempo.</p> <p>Sabe-se que as crias homozigóticas da linhagem X são particularmente pequenas, pelo que o desmame não ocorrerá antes do dia 28.</p>
f)	Uma decisão sobre a necessidade de o projeto ser avaliado retrospectivamente, e quando.	Normalmente, não será necessário para este tipo de projeto. No entanto, se for necessário um protocolo de reprodução severa, será exigida uma avaliação retrospectiva.	<p>No caso de um projeto científico: a avaliação retrospectiva (AR) é necessária devido ao procedimento Y severo.</p> <p>No caso de um projeto de serviços: não é necessária uma avaliação retrospectiva (AR). [Na condição de que não estejam previstos procedimentos severos, o que é normalmente o caso.]</p>

Apêndice III: Bibliografia

Referências que podem ser úteis para a análise de aspetos do presente documento.

- Benavides F, Rüllicke T, Prins JB, Bussell J, Scavizzi F, Cinelli P, Herault Y, Wedekind D; [Genetic quality assurance and genetic monitoring of laboratory mice and rats: FELASA Working Group Report](#) (não traduzido para português); *Lab Anim* 54(2) 135–148 (2020).
- Bonaparte D, Cinelli P, Douni E, Héroult Y, Maas M, Pakarinen P, Poutanen M, Santos Lafuente M, Scavizzi F, Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group; [FELASA guidelines for the refinement of methods for genotyping genetically-modified rodents: a report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group](#) (não traduzido para português); *Lab Anim* Jul 47(3):134-45 (2013).
- Bussell J, Wells SE; [Talking welfare: the importance of a common language](#) (não traduzido para português); *Mamm Genome* 26: 482–485 (2015).
- Cui Y, Xu J, Cheng M, Liao X & Peng S; [Review of CRISPR/Cas9 sgRNA Design Tools](#) (não traduzido para português); *Interdiscip Sci* 10, 455–465 (2018).
- Egel M & Walker R; [Replacement or Reduction of Gene-Edited Animals in Biomedical Research: A Comparative Ethics and Policy Analysis](#) (não traduzido para português); *N. C. Law Rev.* 97, 1241 (2019).
- Comissão Europeia; [Relatório de 2019 relativo a dados estatísticos sobre a utilização de animais para fins científicos nos Estados-Membros da União Europeia em 2015-2017](#); (2020).
- Comissão Europeia; [Documento de trabalho dos serviços da Comissão SWD\(2017\) 353 final/2](#) (não traduzido para português); (2017).
- Comissão Europeia; [Relatório relativo à aplicação, nos Estados-Membros da União Europeia, da Diretiva 2010/63/UE relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos](#); (2020).
- Comissão Europeia; [Exemplos que ilustram o processo de classificação da severidade, de avaliação quotidiana e de avaliação da severidade efetiva](#); (2013).
- Comissão Europeia; [Working document on genetically altered animals](#) (não traduzido para português); (2013).
- Comissão Europeia; [Decisão de Execução 2012/707/UE da Comissão, com a redação que lhe foi dada pela Diretiva 2014/11/UE](#); (2012).
- Federal Institute for Risk Assessment; [Severity Assessment of genetically altered mice and rats - Version 2: Recommendation no. 002/2016 by the National Committee \(TierSchG\)](#) (não traduzido para português); (2016).
- Federal Institute for Risk Assessment; [Severity assessment of genetically altered fish \(bony fish, teleost fish\): Recommendation No. 001/2015 by the National Committee \(TierSchG\)](#) (não traduzido para português); (2015).
- Fentener van Vlissingen J M, Borrens M, Girod A, Lelovas P, Morrison F e Torres YS; [The reporting of clinical signs in laboratory animals, FELASA Working Group Report](#) (não traduzido para português); *Lab Anim* 49: 267–283 (2015).
- Grune B, Hensel A, Schönfelder G; [Rules for assessing pain in lab animals](#) (não traduzido para português); *Nature* volume 512, p. 28 (2014).

- Hawkins P, Morton DB, Burman O, Dennison N, Honess P, Jennings M, Lane S, Middleton V, Roughan J V, Wells S, Westwood K, UK Joint Working Group on Refinement BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW; [*A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: eleventh report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement*](#) (não traduzido para português); Lab Anim 45(1):1-13 (2011).
- International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice & Rat Genome and Nomenclature Committee; [*Guidelines for nomenclature of mouse and rat strains*](#) (não traduzido para português); (2018).
- International Society for Transgenic Technologies (ISTT); [*Advanced Protocols for Animal Transgenesis*](#) (não traduzido para português); Springer-Verlag (2011).
- International Society for Transgenic Technologies (ISTT); [*Statement of Principles - Achieving the 3Rs through responsible work with animals*](#) (não traduzido para português); (2018).
- Naranjo A, Pintado B y el grupo de trabajo SECAL; [*Guía práctica para la implementación de la Directiva 2010/63 aplicada a los animales genéticamente alterados*](#); *Animales de Laboratorio* (não traduzido para português) (2017).
- 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*](#); (2012).
- Netherlands National Committee for the protection of animals used for scientific purposes (NCad); [*Genetically modified animals killed in stock*](#) (não traduzido para português); (2015).
- Research Animals Department da RSPCA; [*Implementing the 3Rs*](#) (não traduzido para português); (2014).
- Rose M, Everitt J, Hedrich H, Schofield J, Dennis M, Scott E, Griffin G, ICLAS Working Group on Harmonization; [*ICLAS Working Group on Harmonization: international guidance concerning the production care and use of genetically-altered animals*](#) (não traduzido para português); Lab Anim Jul;47(3):146-52 (2013).
- Tröder S, Ebert L, Butt L, Assenmacher S, Schermer B, Zevnik B; [*An optimized electroporation approach for efficient CRISPR/Cas9 genome editing in murine zygotes*](#) (não traduzido para português); Plos One (2018).
- UK Home Office; [*Efficient Breeding of Genetically Altered Animals Assessment Framework*](#) (não traduzido para português); (2018).
- Wells DJ, Playle LC, Enser WEJ, Flecknell PA, Gardiner MA, Holland J, Howard BR, Hubrecht R, Humphreys KR, Jackson IJ, Lane N, Maconochie M, Mason G, Morton R, Raymond V, Robinson V, Smith, Watt; [*Assessing the welfare of genetically altered mice*](#) (não traduzido para português); Lab. Anim. 40: 111–114 (2006).
- Zintzsch A, Noe E, Reißmann M, Ullmann K, Krämer S, Jerchow B, Kluge R, Gösele C, Nickles H, Puppe A, Rüllicke T; [*Guidelines on severity assessment and classification of genetically altered mouse and rat lines*](#) (não traduzido para português); Lab. Anim. 51: 573–582 (2017).
- Zintzsch A; Noe E; Grimm H; [*Navigating Uncertainties: How to Assess Welfare and Harm in Genetically Altered Animals Responsibly-A Practical Guideline*](#) (não traduzido para português); Animals 2020 10(5) 857.

Apêndice IV: Glossário

Termos	Significado
Início associado à idade	Idade em que aparecem pela primeira vez num indivíduo sinais de uma doença ou distúrbio.
Alelo	Cada uma das formas possíveis do mesmo gene que ocupa um determinado locus num cromossoma.
AWB	Órgão responsável pelo bem-estar dos animais
Estirpe de base	A estirpe de murganho de tipo selvagem utilizada para criar os gâmetas/embriões para alteração genética e que é utilizada para retrocruzamento.
AC	Autoridade competente
Comensal	Organismo que vive associado a outro, retirando benefícios, mas não o prejudicando ou beneficiando.
Linhagem condicional	Linhagem GA que contém mutações que podem ser introduzidas/ativadas de forma espacialmente restrita (por exemplo, utilizando tecnologia CRE-LOX; ver <i>infra</i>).
Convencional	Específico do contexto. No caso do alojamento de animais, tratar-se-ia de gaiolas abertas por cima com níveis inferiores de controlo de higiene e de rastreio sanitário, excluindo, por exemplo, gaiolas individualmente ventiladas, rederivação.
Criação de novo AGA	O desenvolvimento de uma nova linhagem GA através de uma alteração genética deliberada/intencional (por exemplo, inserção/supressão/edição genética, mutagénese química ou outra manipulação de um gâmeta ou embrião, ou talvez através do cruzamento de duas linhagens preexistentes).
CRE-LOX	Técnica de biologia molecular utilizada para efetuar supressões, inserções, translocações e inversões em locais específicos do genoma. Permite a edição específica em termos de tecidos e/ou tempo, contrariamente à CRISPR-Cas9. Exige o cruzamento de duas linhagens GA para ativar a alteração genética.
CRISPR-Cas9	Técnica de biologia molecular que permite a edição do genoma específica do local em praticamente qualquer organismo.

Criopreservação	Estratégia de preservação de amostras de materiais genéticos de animais (geralmente esperma, óocitos ou embriões) a temperaturas muito baixas.
Dpf	Dias após a fertilização.
ADN	Ácido desoxirribonucleico - a substância que compõe os genes.
Biopsia da falange distal	Remoção de uma única falange distal de um dos dedos, utilizada em circunstâncias limitadas e justificadas para a determinação do genótipo e a identificação de animais imaturos.
Distocia	«Parto difícil ou obstruído»: quando o feto não sai da pélvis durante o parto devido a fatores físicos, apesar da contração do útero.
Biopsia da orelha	Colheita de tecido da orelha
Entalhe/punção da orelha	Técnica de identificação/determinação do genótipo de roedores utilizando um punção especial, quer para produzir um pequeno entalhe (de 0,5 a 2 mm) perto do bordo da orelha, quer para fazer um furo no meio da orelha. A posição da marca determina o número de ID com um esquema predeterminado (por exemplo, o esquema descrito por Hogan <i>et al.</i> em «Manipulating the Mouse Embryo - A Laboratory Manual, CSH laboratory Press 1994» permite a identificação de até 99 animais diferentes).
Células EE	As células estaminais embrionárias (células EE ou CEE) são células estaminais pluripotentes derivadas da massa celular interna de um blastocisto, um embrião pré-implantado em fase inicial.
GTP	Grupo de trabalho de peritos
Linhagem estabelecida	Uma nova estirpe ou linhagem de animais geneticamente alterados é considerada «estabelecida» quando a transmissão da alteração genética for estável, o que ocorrerá no mínimo após duas gerações, e se tiver sido concluída uma avaliação inicial do bem-estar, juntamente com a determinação se a linhagem é nociva ou não nociva.

AGA	Os animais geneticamente alterados incluem os geneticamente modificados (transgênicos, com inativação de genes ou com outras formas de alteração genética) e os mutantes por fenômeno natural ou induzido.
Gâmetas	Os gâmetas são as células reprodutivas maduras de um organismo (espermatozoides, óvulos).
Caracterização genética	A detecção e descrição da presença de determinadas características genéticas (por exemplo, alelos) num organismo.
Integridade genética	A qualidade atribuída a uma população de modelos animais quando a sua composição genética for fiel à linhagem original. A manutenção da integridade genética de um modelo de investigação animal é essencial para melhorar a reprodutibilidade entre experiências de investigação. A integridade pode ser ameaçada devido a contaminação genética, deriva genética, seleção não intencional e rotulagem incorreta. A integridade pode ser assegurada através da monitorização genética [os métodos incluem marcadores bioquímicos, análises fenotípicas e, mais recentemente, análises de ADN com microssatélites e de polimorfismos de nucleótido único (PNU)] e da gestão adequada das colónias.
Painel de integridade genética	Conjunto de pontos definidos e únicos em todo o genoma da estirpe de base necessária, a controlar através de monitorização genética para avaliar a integridade genética. As bases e sequências serão distribuídas uniformemente nos cromossomas autossómicos.
Determinação do genótipo	O processo de determinação das diferenças na composição genética (genótipo) de um indivíduo, examinando a sequência de ADN do indivíduo com recurso a ensaios biológicos e comparando-a com uma sequência de referência. A determinação do genótipo não é um método de identificação.
PFV	Proteína fluorescente verde: frequentemente utilizada como repórter da expressão (por exemplo, num determinado tipo de célula, uma vez que a PFV pode ser visualizada por microscopia de fluorescência).

Linhagem nociva	Linhagem animal com fenótipo nocivo.
Fenótipo nocivo	Um animal ou linhagem suscetível de sentir, em consequência da alteração genética, dor, sofrimento, angústia ou dano duradouro equivalente ou superior ao provocado pela introdução de uma agulha em conformidade com as boas práticas veterinárias.
Heterozigoto	Um indivíduo com alelos diferentes num determinado locus.
Homozigoto	Um indivíduo com o mesmo alelo no locus correspondente nos cromossomas homólogos.
Hidrocefalia	Uma doença na qual ocorre a acumulação de líquido cefalorraquidiano no interior do cérebro . Normalmente, esta doença causa um aumento da pressão no interior do crânio .
Linhagem imunocomprometida	Linhagem geneticamente alterada para ser incapaz de desenvolver uma resposta imunológica normal à presença de antigénios estranhos.
Linhagem induzível	Linhagem geneticamente alterada para conter informação genética silenciosa que possa ser induzida (ou seja, ativada) pelo cientista de forma limitada no tempo. O gene de interesse só é expresso após ativação, mediante administração de um agente indutor específico (por exemplo, tetraciclina) ao animal. Até que o gene seja expresso desta forma, não se produzem efeitos adversos da manipulação genética.
PI	Específico do contexto. Propriedade intelectual ou intraperitoneal.
Isogénica	Diz-se que duas linhagens são isogénicas quando têm exatamente a mesma composição genética. Também se aplica a casos com a mesma composição genética, mas com um gene diferente (o que é estudado).
GIV	Gaiolas individualmente ventiladas.
FIV	Fertilização <i>in vitro</i> .
Linhagem antiga	Linhagem animal mais antiga que foi produzida de uma forma que não podia garantir a monoclonalidade.
Estudos ao longo da vida	Observações científicas e de bem-estar relativas a animais de tipo selvagem de controlo e GA

	durante todo o ciclo de vida previsto dos animais de tipo selvagem de controlo.
Linhagem	Sequência de gerações de indivíduos que transmitem e herdam uma série de fatores genéticos que determinam as características individuais.
Lepr	Os murganhos homozigóticos para a mutação espontânea da diabetes (Leprdb) manifestam obesidade mórbida, hiperglicemia crónica, atrofia das células beta pancreáticas e tornam-se hipoinsulinémicos.
EM	Estado-Membro
Rácio mendeliano	O rácio de ocorrência de vários fenótipos em quaisquer caracteres cruzados, sob o controlo de um marcador genético num único locus (caráter mendeliano). Exemplo: quando dois progenitores (geração P) que diferem numa característica genética para a qual são homozigóticos (portadores do mesmo alelo em ambos os cromossomas) acasalam, todos os descendentes da primeira geração (F1) são iguais à característica examinada no genótipo (todos são heterozigóticos) e fenótipo, apresentando a característica dominante. Quando os indivíduos da geração F1 são cruzados, os descendentes da geração F2 diferem em genótipo e fenótipo. Numa herança dominante/recessiva, em média, 25 % são homozigóticos com a característica dominante, 50 % são heterozigóticos, mostrando a característica dominante no fenótipo (portadores genéticos), e 25 % são homozigóticos com a característica recessiva e, por conseguinte, exprimem a característica recessiva no fenótipo. O rácio genotípico é de 1: 2: 1; o rácio fenotípico é de 3: 1.
Microftalmia	Perturbação do desenvolvimento em que um ou ambos os olhos são anormalmente pequenos.
Mosaicismo	Presença de duas ou mais linhagens celulares com genótipos diferentes no mesmo indivíduo. O mosaicismo pode surgir num único indivíduo em resultado de uma mutação pós-zigótica. Em alternativa, o mosaicismo pode advir da introdução de células EE num blastocisto, o que

	resulta no desenvolvimento de um indivíduo composto por células de diferentes linhagens.
Projeto genérico múltiplo	Consta do documento de trabalho sobre artigos específicos da Diretiva 2010/63/UE, artigo 40.º: «algumas classes de projetos implicam a aplicação de uma série de procedimentos normalizados para um determinado fim. Estes são, por vezes, referidos como "projetos genéricos múltiplos". Os procedimentos estão geralmente bem estabelecidos e as consequências prováveis para os animais são bem compreendidas e podem ser devidamente minimizadas. É pouco provável que surjam questões novas ou controversas durante a avaliação do projeto. Tal como no caso do procedimento administrativo simplificado ao abrigo do artigo 42.º, os procedimentos considerados no âmbito de projetos genéricos múltiplos são necessários para satisfazer os requisitos regulamentares OU necessários para efeitos de produção OU de diagnóstico com métodos estabelecidos.»
Animais «virgens»	Animais utilizados num contexto experimental que não foram anteriormente utilizados.
PCN	Ponto de contacto nacional
NSET	Transferência não cirúrgica de embriões. Técnica que envolve a inserção de um tubo flexível macio através do colo do útero nos murganhos fêmeas para implantar embriões (blastocistos) no útero.
RNT	Resumo não técnico do projeto: a fim de assegurar que o público é informado, têm de lhe ser disponibilizadas, em linguagem não profissional, informações objetivas relativas aos projetos que utilizam animais vivos. (Diretiva 2010/63/UE, artigo 43.º)
Murganho OB/OB ou obeso	Um murganho mutante que come excessivamente devido a mutações no gene responsável pela produção de leptina e se torna profundamente obeso. Trata-se de um modelo animal da diabetes tipo II.
Efeito fora do alvo	Efeito fora do alvo: alterações genéticas não específicas e não intencionais, incluindo a atividade do gene num tecido não alvo, ou

	disrupção de um gene completamente diferente por inserção aleatória de material genético no mesmo, causando a sua disrupção.
Fenótipo	As propriedades físicas observáveis de um organismo, nomeadamente o seu aspeto, desenvolvimento e comportamento.
Penetrância do fenótipo	A proporção de indivíduos que apresentam uma característica específica (fenótipo) associada a um alelo.
Procedimento	<p>O artigo 3.º da Diretiva 2010/63/UE define <i>Procedimento</i> como «qualquer utilização, invasiva ou não invasiva, de um animal para fins experimentais ou outros fins científicos, [...], suscetível de lhe causar um nível de dor, sofrimento, angústia ou dano duradouro equivalente ou superior ao provocado pela introdução de uma agulha em conformidade com as boas práticas veterinárias».</p> <p>Desta forma, a diretiva considera a criação e manutenção de um animal geneticamente alterado como um «<i>procedimento</i>» científico, se o nascimento ou a incubação do animal for suscetível de lhe causar dor, sofrimento, angústia ou dano duradouro equivalente ou superior ao provocado pela introdução de uma agulha em conformidade com as boas práticas veterinárias.</p>
Classificação da severidade do procedimento	<p>Consta do relatório final (2009) do grupo de trabalho de peritos sobre a classificação da severidade dos procedimentos científicos realizados em animais: «A cada procedimento deve ser atribuída uma categoria de severidade. Tal contribuirá para a análise dos danos e benefícios do projeto.</p> <p>A severidade de um procedimento é determinada pelo grau previsível de dor, sofrimento, angústia ou dano duradouro sentido por cada animal durante o procedimento. O procedimento consiste numa combinação de um ou mais atos técnicos realizados num animal que lhe possam causar dor, sofrimento, angústia ou dano duradouro. A atribuição da categoria de severidade tem em conta todas as intervenções ou manipulações a que um animal é submetido num determinado procedimento. A categoria de</p>

	severidade é atribuída com base nos efeitos mais severos suscetíveis de serem sentidos por um animal após aplicação de todas as técnicas de refinamento apropriadas.»
Rederivação	Remoção de organismos adventícios, tais como vírus, bactérias e parasitas, de linhagens de modelos animais, geralmente envolvendo a superovulação de unidades populacionais infetadas e a reimplantação de embriões em mães de substituição com elevado estado sanitário.
Gene repórter	Os genes repórteres são genes que permitem a deteção ou medição da expressão genética. Podem ser fundidos em sequências reguladoras ou genes de interesse para reportar a localização ou os níveis de expressão. Os genes repórteres incluem genes que codificam a proteína fluorescente e enzimas que convertem substratos invisíveis em produtos luminescentes ou corados.
Linhagem repórter	Linhagem animal portadora de um gene repórter para poder acompanhar a expressão genética <i>in vivo</i> .
Avaliação retrospectiva	Uma avaliação, realizada pela AC no final do projeto, dos seguintes elementos: a) Se os objetivos do projeto foram alcançados; b) Os danos infligidos aos animais, incluindo o número e as espécies de animais utilizados, e a severidade dos procedimentos; e c) Os elementos que podem contribuir para melhorar a aplicação do requisito de substituição, redução e refinamento. Ver Diretiva 2010/63/UE, artigo 39.º.
Projeto de serviços	Projeto de prestação de serviços a outros utilizadores científicos para criar e caracterizar linhagens GA até ao seu estabelecimento, e/ou para reproduzir e manter linhagens GA nocivas estabelecidas destinadas a grupos de investigação científica.
Estirpe	Sinónimo de «linhagem».
Superovulação	O processo de induzir numa fêmea a libertação de mais óvulos do que o habitual.
Linhagem suprimida	Linhagem na qual foi desativada uma atividade genética (em contraste com a «linhagem induzida»).

Biopsia/corte da ponta da cauda	Um procedimento mais antigo para a determinação do genótipo de animais transgênicos, que implica o corte da porção distal da cauda do animal.
TALEN	As nucleases efetoras semelhantes a ativadores de transcrição (TALEN) são enzimas de restrição que podem ser concebidas para cortar sequências específicas de ADN.
Três R/3R	Substituição, redução, refinamento
Utilização, reutilização e utilização continuada	<p>- A «utilização» de um animal no âmbito de um projeto estende-se desde o momento em que o procedimento (ou o primeiro procedimento/técnica de uma série) lhe é aplicado até ao momento em que as observações ou a recolha de dados (ou outros produtos) para um determinado fim científico (geralmente uma única experiência ou ensaio) são concluídas.</p> <p>- «Reutilização» é um termo que indica a utilização posterior de um animal que já tenha completado um procedimento (ou uma série de procedimentos/técnicas) para um fim científico específico. O artigo 16.º relativo à reutilização define-a como uma utilização caso outro animal que não tenha sido anteriormente sujeito a nenhum procedimento possa ser igualmente utilizado. O artigo 16.º define também as circunstâncias em que um animal pode ser reutilizado.</p> <p>- «Utilização continuada» é um termo não incluído na diretiva que pode ser utilizado para descrever a situação em que a única «utilização» de um animal se estende por mais do que um projeto ou por diferentes procedimentos no âmbito do mesmo projeto. É explicado de forma mais pormenorizada no anexo III da Decisão (UE) 2020/569, parte B.2.2.3. Este sistema pode simplificar os pedidos de projetos e evitar repetições desnecessárias. A utilização continuada é comum nos AGA, desde um procedimento de «reprodução» até um procedimento de «utilização».</p>
Vasectomia	Procedimento cirúrgico para esterilizar um animal, durante o qual o cordão espermático é

	cortado para impedir a passagem do esperma; os testículos não são removidos.
Avaliação do bem-estar	Uma avaliação global do bem-estar permite identificar as preocupações em matéria de bem-estar. Identificará a necessidade de manio/prestação de cuidados especializados e poderá contribuir para a discriminação entre linhagens nocivas e não nocivas. Ver definição mais pormenorizada na secção 5, parte 2, das presentes orientações. Para mais informações sobre o modo de realização da avaliação do bem-estar, consultar a parte 3 das presentes orientações.
Tipo selvagem (pode ser abreviado como TS nos documentos de investigação)	Um animal que não foi objeto de qualquer alteração genética.
ZFN	As nucleases dedos de zinco (ZFN) são proteínas sintéticas utilizadas na recombinação genética.

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://op.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.



Serviço das Publicações
da União Europeia