

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS

Data de aceite: 03/07/2023

Isabele Barbieri dos Santos

Centro de Experimentação Animal,
Instituto Oswaldo Cruz, Fundação
Oswaldo Cruz,
Rio de Janeiro/RJ
ORCID 0009-0002-6362-6329

1 | CONTEXTO GERAL

O principal objetivo da produção de anticorpos em animais de laboratório é a obtenção de antissoros com título elevado e elevada afinidade para utilização em testes experimentais ou de diagnóstico (UNIÃO EUROPEIA, 2010).

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

EUROPEIA, 2010).

Os anticorpos são produzidos pelo sistema imunológico de um animal numa resposta específica a um desafio por um imunógeno. Os imunógenos (antígenos) são moléculas que podem induzir uma resposta imune e geralmente são proteínas ou carboidratos ou, às vezes, lipídios e ácidos nucleicos. O sistema imune de mamíferos é composto de muitos linfócitos, cada um caracterizado por seu único receptor de antígeno específico. Essa diversidade de receptores é responsável por respostas imunes a uma ampla gama de imunógenos. Os linfócitos B, caracterizados pela presença de receptores específicos de imunoglobulinas em sua superfície, são responsáveis pela produção da resposta humoral (anticorpo). Os anticorpos são secretados a partir de células plasmáticas que se diferenciaram dos linfócitos B após estimulação pelo imunógeno estranho. Cada molécula de anticorpo é capaz de reconhecer um epítipo específico (antigênico local), geralmente 5-6 aminoácidos ou unidades

monossacarídicas que são lineares ou montadas topograficamente, e é capaz de ligação a esse epítopo. Uma resposta humoral policlonal é composta de anticorpos, derivados de vários clones, populações com especificidades variadas (por diferentes epítomos, mesmo na mesma molécula), afinidades e classes e, portanto, oferece uma defesa eficaz contra patógenos. Os antissoros policlonais (pAcps) são difíceis de reproduzir devido à variedade de anticorpos produzidos na resposta policlonal. O nível e a qualidade dos anticorpos produzidos variam de animal para animal e de um único animal ao longo do tempo. Portanto, os pAcps têm uma disponibilidade finita e estão sujeitos a possível mudança de caráter durante o período de produção. Por outro lado, anticorpos monoclonais (mAcps) são derivados de um único clone e, portanto, são específicos para um único epítopo e têm uma definição/afinidade por esse epítopo. Assim, se o mAcp é obtido, pode ser extremamente específico para o imunógeno relevante, e, sob condições adequadas, uma ilimitada produção de um produto constante é possível (CCAC, 2002).

Os antissoros policlonais podem ser obtidos em período relativamente curto (1-2 meses), em contraste com a produção de mAcp padrão, em que os procedimentos podem ser tediosos e exigir 3-6 meses. Anticorpos policlonais mostram diferentes afinidades para diferentes epítomos e, portanto, podem demonstrar excelente encadernação alcançada pela adesão a vários sítios diferentes em um complexo imunógeno ou antígeno. Em contraste, a especificidade de epítopo único de mAcps pode significar que uma ligeira mudança na estrutura do epítopo, por exemplo, por desnaturação de antígeno (como ocorre em experimentos de *immunoblotting* ou por esterilização do imunógeno antes da injeção no animal), pode resultar na perda de anticorpos vinculativos, e, por essa razão, dois ou três mAcps são combinados (CCAC, 2002).

2 | ANTICORPOS POLICLONAIS

Os anticorpos policlonais (pAcps; antissoros) têm uma série de usos em pesquisa, por exemplo: para detecção de moléculas em tipo ELISA ensaios; em Western blots; em imunohistoquímica e imunoprecipitação; imunofluorescência e microscopia imunoeletrônica. Os antissoros são comumente produzidos por injeção do imunógeno de interesse em um animal, muitas vezes em combinação com um adjuvante para aumentar a resposta imune. A resposta de anticorpos pode ser aumentada por injeções de reforço subsequentes do antígeno com ou sem adjuvante. É importante salientar que as emulsões de Freund completo e incompleto não são mais permitidas para obtenção de antissoros policlonais, pois a sua composição à base de lanolina e parafina, bem como na chamada formulação completa, é acrescida de células de *Micobacterium bovis* inativado pelo calor.

Todas essas substâncias são extremamente inflamatórias e causam reações doloridas, levando à dor e desconforto ao animal. Pode-se usar emulsões com base de óleos brancos de qualidade farmacêutica (ex: Marcol® - Exxon) e substâncias surfactantes

de aplicação farmacêutica (Span 80®, tween 80®), ou, ainda, óleos biodegradáveis, como o esqualeno (BRASIL, 2022).

As amostras de sangue são obtidas do animal para avaliar o nível de anticorpos produzidos e, uma vez que o título suficientemente alto foi alcançado, o antissoro é preparado por coleta de sangue seguido pela preparação do soro, com posterior purificação dos anticorpos do soro, se necessário. Conhecimento básico dos mecanismos envolvidos na geração de uma imunidade humoral resposta é essencial para o desenvolvimento de protocolos apropriados para partículas imunógenos ou antígenos (HANLY *et al.*, 1995).

3 | ANTICORPOS MONOCLONAIS

Os anticorpos monoclonais podem ter excelentes especificidades e podem ser aplicados para quase qualquer finalidade. A escolha da espécie animal a ser utilizada para a imunização é baseada, em parte, na capacidade de gerar anticorpos de grande especificidade para antígenos geneticamente definidos, que podem necessitar de uma produção em larga escala com desejável reatividade cruzada. A quantidade de anticorpo necessária também deve ser avaliada. Os clones de hibridomas, híbridos de células B de baço e de mieloma de tumores de um animal imunizado, são permissivos para a produção de imunoglobulinas monoclonais, fornecem uma quantidade bastante limitada e essencialmente têm reatividade para apenas um epítipo. No entanto, o investimento inicial na produção de um anticorpo monoclonal é grande, ao passo que quantidades relativamente abundantes de um antissoro policlonal podem ser obtidas a partir de um único coelho ou a partir de vários camundongos ou ratos geneticamente idênticos ou, ainda, cavalos (BRASIL, 2022).

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

4 | MODELOS ANIMAIS PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS

4.1 Seleção e Cuidados de Animais

Na produção de anticorpos policlonais e monoclonais, é obrigatório minimizar a dor e sofrimento dos animais utilizados. Uma consideração cuidadosa deve ser dada à seleção das espécies para serem usadas para produção anticorpo policlonal. Deve-se considerar cuidadosamente a adequação da espécie e estirpe escolhida. O investigador deve considerar

os seguintes fatores: 1) a quantidade de Acp ou antissoro necessária (animais maiores devem ser considerados quando maiores quantidades de Acp são requeridas); 2) a relação filogenética entre as espécies das quais o antígeno proteico é originado e a espécie usada para elevar o Acp; 3) a função efetora dos pAcps feitos pelas espécies que aumentam Acp (como a capacidade de fixação do complemento); e 4) o uso pretendido dos anticorpos (por exemplo, em um ELISA, o anticorpo que se liga ao antígeno precisa ser derivado de uma espécie diferente do anticorpo secundário usado na próxima etapa do ensaio). Diferentes linhagens de espécies também podem reagir de forma diferente, devido à variação genética na apresentação do antígeno no complexo principal de histocompatibilidade das moléculas e nos mecanismos reguladores da resposta imune.

A escolha do animal para a produção de anticorpos depende da quantidade desejada de antissoro, da distância evolutiva entre as espécies, de qual proteína de interesse foi derivada, da espécie do animal a ser imunizado e experiência prévia com os imunógenos. Os coelhos são os animais de escolha, porque eles são geneticamente distintos das fontes de proteínas humanas e de camundongos, os quais possuem as proteínas mais estudadas. Coelhos podem fornecer até 50 ml de soro, sem efeitos prejudiciais significativos aos animais.

É importante usar coelhos livres de doenças para todos os procedimentos imunológicos para reduzir a probabilidade de *Pasteurella multocida*, abscessos nos locais de injeção e para minimizar a probabilidade de reatividade cruzada com outros antígenos que o sistema imunológico dos coelhos pode ter encontrado anteriormente.

Quando for utilizada pequena quantidade de antissoro ou para aqueles que dependem de anticorpos com especificidades precisamente definidas, linhagens puras de animais, camundongos, por exemplo, podem ser o sistema de escolha. Porém, os camundongos são menores, o volume de suspensão de antígeno utilizado para a imunização é significativamente menor e a quantidade de soro que pode ser obtida a partir de uma única punção não é superior a 0,5 ml.

Os ratos e hamsters podem ser usados quando são necessárias quantidades de soro maiores ou quando a maior distância evolutiva é vantajosa. Com punção repetida, pode-se obter até 5 ml de soro a partir dessas espécies. Na presença de adjuvante (emulsões ou hidróxido de alumínio), o antígeno à base de proteína é aplicado por via intramuscular, intradérmica, subcutânea, conforme protocolo sob supervisão de médico veterinário, na espécie escolhida de animal. Imunizações de reforço são iniciadas 4 a 8 semanas após a imunização primária e continua em intervalos de 2 a 3 semanas. Antes da primeira imunização e de cada imunização de reforço, obtém-se o sangue do animal e o soro final é preparado a partir de sangue total.

O coelho é o animal mais comumente empregado na produção de pAbs, pois é de fácil manejo e coleta de sangue, e para a maioria das aplicações produzirão um volume de alto título, alta afinidade, antissoro (STILLS, 1994). Um sangramento típico de um coelho

deve render aproximadamente 250mg de pAcps; um sangramento terminal pode render aproximadamente 1 g de pAcps.

A galinha está filogeneticamente distante de mamíferos e, portanto, pode ser útil para aumentar pAcps para proteínas de mamíferos e, em particular, para proteínas intracelulares, vez que a sequência de aminoácidos de muitas proteínas intracelulares tende a ser conservada entre as espécies de mamíferos. O produto IgY é, para quase todos os fins, equivalente à classe de IgG de mamífero. A galinha pode ser considerada refinamento da técnica, pois pAcps podem ser extraídos da gema do ovo, retirando a necessidade de coleta de sangue. O uso do frango também pode representar uma redução em uso animal, pois as galinhas produzem quantidades maiores de anticorpos do que roedores de laboratório (SVENDSEN BOLLEN *et al.*, 1995; SCHADE *et al.*, 1996).

Normalmente, um único ovo conterà até a 250 mg de pAb na gema (ERHARD *et al.*, 2000). Em geral, as galinhas são potentes produtoras de anticorpos e seus efeitos imunológicos e a capacidade de resposta são semelhante aos dos mamíferos. No entanto, é importante enfatizar que o frango não é adequado para todas as aplicações, e instalações apropriadas para alojar galinhas devem estar disponíveis se elas forem usadas.

Em geral, os roedores são usados com menos frequência do que coelhos para a produção de pAcps, mas podem ser adequados quando pequenos volumes de pAcps são requeridos. Volumes de sangue que podem ser coletados desses animais são consideravelmente menores e, portanto, a coleta de um volume razoável pode exigir punção sob anestesia terminal. O rato pode ser usado quando Acps de restrição a especificidade para proteínas de rato são necessários, ou para a produção de IgE (GARVEY *et al.*, 1977). O hamster é usado para produzir proteína de Acps quando tais pAcps não podem ser prontamente produzidos no rato ou quando uma maior especificidade de pAcps é necessária. Historicamente, a cobaia era comumente usada para a produção de anticorpos, em particular para uso em ensaios de insulina, mas, de outra forma, não parece ter qualquer significado vantajoso sobre o uso de roedores.

Espécies maiores são usadas quando grandes volumes de antissoros são necessários, em particular para a produção comercial. Cavalos, ovinos e caprinos, por exemplo, têm uma longa vida útil, são relativamente fáceis de manusear e podem ser sangrados da veia jugular. A exigência para grandes instalações e a despesa de manter animais maiores limitaram seu uso, principalmente para a produção comercial de antissoros. Importante ressaltar que os cavalos, que têm sido utilizados para produzir antissoros para toxinas e venenos para aplicações clínicas, são particularmente intolerantes a adjuvantes à base de óleo, como Adjuvante Completo de Freund (FCA) e saponina (Quil A). Os anticorpos também podem ser colhidos do leite de gado, ovelha e cabras e representam um meio não invasivo de adquirir repetidamente grandes volumes de pAcps.

Quando as considerações específicas da espécie não são um problema, a espécie deve ser escolhida de forma a minimizar a dor e a angústia, tendo em mente a facilidade

de manuseio para injeção e coleta de amostra de sangue. O requisito esperado do pAcps influenciará o volume de soro necessário e isso afetará a espécie animal e número de animais utilizados. Em geral, os animais adultos jovens são melhores produtores de pAb do que animais mais velhos, pois a função imunológica atinge o pico na puberdade e, em seguida, lentamente declina. Além disso, as fêmeas são preferidas, pois muitas vezes produzem uma forte resposta imune e tendem a ser mais dóceis, de manuseio mais fácil e convivem mais facilmente em grupo (com exceção das fêmeas de hamster). Para maiores espécies de animais de fazenda, machos castrados também podem ser adequados.

Grossman (1989) documentou a produção aumentada de pAcps por adultos fêmeas. Outros fatores que influenciam produção de pAcp incluem: a natureza do imunógeno para ser usado; a via e tempo de administração; o tipo e a qualidade do adjuvante; a natureza da formulação de imunógeno/adjuvante (ou seja, emulsão, formação de lipossomas, formação ou adsorção de complexo imunoestimulatório); o método de coleta de sangue; a tensão, saúde e genética dos animais; a formação, perícia e competência da equipe de cuidados com os animais; e a dieta e habitação. Além disso, deve-se notar que a presença de agentes infecciosos e/ou estresse pode suprimir a resposta imune e, assim, reduzir a quantidades de pAcps produzidas, ou mesmo resultar em nenhuma resposta significativa.

O estado de pré-imunização dos animais, em relação ao imunógeno ou a outros antígenos de reação cruzada a serem administrados, deve ser determinado. Imunógenos específicos Acps pré-existentes podem influenciar tanto a qualidade quanto a quantidade de Acps, especialmente quando é necessário um pAcp mono específico. Geralmente uma pré-imunização (pré-sangramento) com amostra de soro é preparada em quantidade suficiente para ser usada como controle ao longo de todo o teste. Os animais devem ser alojados em condições que melhor atendam às suas necessidades sociais e comportamentais para permitir o comportamento natural, com grupos sendo a habitação preferida. Pesquisadores e sua equipe de apoio devem ter formação adequada e competência para manusear os animais envolvidos na produção de anticorpos. O treinamento e a competência dos pesquisadores e sua equipe com os animais são de grande importância na minimização da dor e/ou sofrimento para os animais. Além de ter conhecimento de bem-estar e manuseio dos animais, a equipe deve entender sobre princípios lógicos de imunologia básica e ser treinada e competente em procedimentos de imunização e na coleta de sangue. Para algumas espécies, isso exigirá conhecimento de procedimentos de anestesia e analgesia. A equipe também deve ser capaz de reconhecer a dor e/ou angústia nas espécies utilizadas (CCAC, 2002; ACLAM, 2006; BRASIL, 2022).

4.2 Parâmetros para avaliação clínica e comportamental

Espera-se apenas ligeira gravidade, graças aos refinamentos nos procedimentos zootécnicos e nos cuidados, às boas práticas de administração e amostragem e à escolha

de um adjuvante minimamente irritante.

O potencial para utilizar adjuvantes minimamente irritantes e agentes anestésicos menos aversivos deveria ser revisto regularmente através de acompanhamento da literatura e de discussão com os colegas. Poderia ser criado um programa de habituação de coelhos jovens ao manuseamento para reduzir ainda mais o estresse (ROWAN, 1992; BRASIL, 2022).

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

| O que este estudo implica que se faça aos animais? | O que sentirão os animais? Que grau de sofrimento poderá causar? O que o poderá agravar? | De que forma será possível reduzir ao mínimo o sofrimento? | |
|---|---|--|---|
| | Efeitos adversos | Metodologia e intervenções | Limites críticos |
| Imunização com antígeno e adjuvante. | Desconforto após a injeção. Podem se desenvolver nódulos não dolorosos em resposta ao adjuvante. Possível (rara) ulceração no local da injeção. | O volume, a formulação e a frequência da injeção serão determinados em conformidade com as orientações de boas práticas (por exemplo, diretiva EU 2013, RN55 CONCEA), normalmente um máximo de quatro locais e 0,25 ml por local. | O animal será submetido a eutanásia sem dor se surgirem sinais de desconforto, dor ou angústia (por exemplo, atenção persistente aos locais de injeção ou nódulos) ou caso se formem úlceras. |
| Recolha de amostras de sangue para avaliar a resposta dos anticorpos. | Captura, manuseamento e contenção, que podem ser desgastantes. Ligeiro desconforto associado à picada da agulha. Baixo risco de hemorragia ou formação de hematoma. | A amostra será de uma veia superficial: Coelhos – orelha; hamsters – plexo gengival; ratos – cauda; camundongos – submandibular. Pequenos volumes de sangue: coelhos -2-5 ml; hamsters e ratos 0,5 ml; camundongos 20-50 microlitros. Apenas para verificar os títulos de anticorpos. Aplicar pressão no local da coleta da amostra. | Se o animal evidenciar estresse exagerado devido ao procedimento, a coleta da amostra será adiada para quando o comportamento do animal regressar ao normal. |
| Sangria sob anestesia geral e analgesia. | Ligeiro desconforto e possível aversão ao agente durante a indução da anestesia. | Agente anestésico e analgésico minimamente aversivo utilizado. | O animal continuará sob anestesia até vir a óbito. |

4.4 Formulário para observação e monitoramento dos principais parâmetros

O êxito de um modelo de formulário para observação clínica/observacional depende

da seleção de indicadores de bem-estar que: sejam pronta e facilmente reconhecíveis; eficazes na realização de boas mensurações do bem-estar; práticos de realizar, que não perturbem excessivamente o animal e permitam uma fácil mensuração, interpretação e análise consistentes.

Uma abordagem comum para registrar observações clínicas é necessária, pois ajuda a desenvolver abordagens consistentes de classificação da severidade. Dessa forma, facilita-se a realização de comparações de sinais clínicos entre estudos e informam-se os envolvidos na avaliação da severidade do estudo.

As observações devem ser estruturadas nas seguintes categorias de alto nível: Aspetto/ Funções fisiológicas/ Meio ambiente/ Comportamentos/ Indicadores específicos do procedimento e Observações livres.

5 | PONTO FINAL HUMANITÁRIO EM MODELOS PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS

5.1 Exemplo de ficha de pontuação para coelhos submetidos à produção de anticorpos policlonais

a. Ficha 1: Escore clínico-comportamental

| ESCORE CLÍNICO-COMPORTAMENTAL | |
|--|-----------|
| ASPECTO | PONTUAÇÃO |
| PESO CORPORAL | |
| 5-10% de perda de peso | 1 |
| 11-15% de perda de peso | 2 |
| 16-20% de perda de peso | 3 |
| 20% + de perda de peso | E |
| POSTURA | |
| Desloca-se lentamente | 1 |
| Fica deitado com abdômen em contato com o piso na maior parte do tempo | 2 |
| Não se desloca durante a maior parte do tempo | E |
| ALTERAÇÃO DE TEMPERATURA CORPORAL Faixa normal: 36,5°C (35°C -37,9°C) | |
| Até 2°C acima da faixa normal | 1 |
| Até 3°C acima da faixa normal | 2 |
| > 3° da faixa normal | E |
| Hipotermia < 35°C | E |
| ATIVIDADE | |
| Pouco se movimenta, altera postura, apresenta movimentos de cabeça e pescoço e não exerce atividade normal | 2 |
| Está imóvel e não exerce atividade normal | E |

| APETITE | |
|---|------------------|
| Diminuição moderada de ingestão | 1 |
| Diminuição moderada de ingestão | 1 |
| Diminuição da defecação | 1 |
| Ausência de ingestão | E |
| Ausência de defecação | E |
| INTERAÇÃO | |
| Ausência de interação com objetos de enriquecimento ambiental | 1 |
| Ausência de curiosidade | 1 |
| Ausência de farejamento | 1 |
| Ausência de comportamento de autolimpeza | 1 |
| EXPRESSÃO FACIAL | |
| Apresenta olhos semicerrados | 1 |
| Apresenta olhos fechados | E |
| Apresenta orelhas fletidas em algum momento | 3 |
| Apresenta orelhas fletidas a maior parte do tempo | E |
| COMPORTAMENTO | |
| Faz menção de se levantar, porém permanece deitado | 2 |
| Retrai-se e fecha os olhos | 2 |
| Apresenta tremores com maior frequência na cabeça e orelhas | 2 |
| ATENÇÃO À ÁREA DE INOCULAÇÃO | |
| Lambe a área afetada | 1 |
| Pressiona o local da inoculação contra o piso ou gaiola | 2 |
| Mantém o membro suspenso (caso a inoculação seja no membro) | 3 |
| LESÕES NA ÁREA DE INOCULAÇÃO | |
| Úlcera | 3 |
| Abscesso | E |
| Tomar as seguintes ações de acordo com a pontuação total de escores obtidos na tabela acima | |
| Aumentar a frequência do monitoramento dos animais para 2 vezes ao dia | 4 |
| Implementar, se possível, intervenção clínica de cuidados veterinários | 5 – 7 |
| Eutanásia | 8 |
| Eutanásia - Quaisquer desses parâmetros sozinhos indicam grandes alterações fisiológicas com indicativo de dor e distresse ao animal, levando a intenso sofrimento. | E |
| | PONTUAÇÃO |

b Ficha 2 - Acompanhamento diário

| FICHA DE ACOMPANHAMENTO DIÁRIO | | | | |
|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Nº DO ANIMAL: DATA: | Dia 1 | Dia 2 | Dia 3 | Dia 4 |
| ASPECTO | | | | |
| Peso corporal | | | | |
| Postura | | | | |
| Alteração da temperatura corporal | | | | |
| Atividade | | | | |
| Apetite | | | | |
| Interação | | | | |
| Expressão facial | | | | |
| Comportamento | | | | |
| Atenção à área de inoculação | | | | |
| Lesões na área de inoculação | | | | |
| PONTUAÇÃO TOTAL | | | | |
| | | | | |
| Outras observações | | | | |

5.2 Exemplo de ficha de pontuação para camundongos submetidos a produção de anticorpos policlonais

a. Ficha 1: Escore clínico-comportamental

| ESCORE CLÍNICO-COMPORTAMENTAL | |
|---|-----------|
| ASPECTO | PONTUAÇÃO |
| PESO CORPORAL | |
| 5-10% de perda de peso | 1 |
| 11-15% de perda de peso | 2 |
| 16-20% de perda de peso | 3 |
| 20% + de perda de peso | E |
| ESTADO DO PELO | |
| Ligeira piloereção | 1 |
| Piloereção moderada | 2 |
| Piloereção intensa | 3 |
| ALTERAÇÃO DE TEMPERATURA CORPORAL Faixa normal: 36,5°C (35°C -37,9°C) | |
| Até 2°C acima da faixa normal | 1 |
| Até 3°C acima da faixa normal | 2 |
| > 3° da faixa normal | E |
| Hipotermia < 35°C | E |

| EXPRESSÃO FACIAL | |
|---|-------|
| Redução da órbita ocular até 50% com ou sem secreção | 2 |
| Surgimento de rugas entre a narina e a comissura medial do olho do mesmo lado | 3 |
| Rotação das orelhas para fora ou para trás, aumentando o espaço entre elas | 3 |
| Quando o formato do globo ocular passar de redondo a elíptico com surgimento de ruga ao redor dos olhos e redução de 50% da área ocular ou mais com ou sem secreção | E |
| ALTERAÇÃO COMPORTAMENTAL | |
| Parar de correr | 1 |
| Estacionário sem ser provocado | 2 |
| Estacionário mesmo provocado | E |
| ATENÇÃO À ÁREA DE INOCULAÇÃO | |
| Lambe a área afetada | 1 |
| Pressiona o local da inoculação contra o piso ou gaiola | 2 |
| Mantém o membro suspenso (caso a inoculação seja no membro) | 3 |
| LESÕES NA ÁREA DE INOCULAÇÃO | |
| Úlcera | 3 |
| Abscesso | E |
| Tomar as seguintes ações de acordo com a pontuação total de escores obtidos na tabela acima | |
| Aumentar a frequência do monitoramento dos animais para 2 vezes ao dia | 4 |
| Implementar, se possível, intervenção clínica de cuidados veterinários | 5 – 7 |
| Eutanásia | 8 |
| Eutanásia - Quaisquer desses parâmetros sozinhos indicam grandes alterações fisiológicas com indicativo de dor e distresse ao animal, levando a intenso sofrimento. | E |

b. Ficha 2 - Acompanhamento diário

| FICHA DE ACOMPANHAMENTO DIÁRIO | | | | |
|---------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Nº DO ANIMAL: DATA: | Dia 1 | Dia 2 | Dia 3 | Dia 4 |
| ASPECTO | | | | |
| Peso corporal | | | | |
| Estado do pelo | | | | |
| Alteração da temperatura corporal | | | | |
| Expressão facial | | | | |
| Alteração comportamental | | | | |
| Atenção à área de inoculação | | | | |
| Lesões na área de inoculação | | | | |
| PONTUAÇÃO TOTAL | | | | |
| | | | | |
| Outras observações | | | | |

REFERÊNCIAS

ACLAM Task Force Members; KOHN, D. F.; MARTIN, T. E.; FOLEY, P. L.; MORRIS, T. H.; SWINDLE, M. M.; VOGLER, G. A.; WIXSON, S. K. Public statement: guidelines for the assessment and management of pain in rodents and rabbits. **J Am Assoc Lab Anim Sci.** 2007 Mar;46(2):97-108.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). **Resolução nº 55, de 5 de outubro de 2022.** Atualiza o texto da Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica - DBCA. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações, 07 out. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea/arquivos/arquivo/legislacao/resolucao-normativa-no-55-de-5-de-outubro-de-2022.pdf>. Acesso em: 11 dez. 2022.

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE, 2002. **Guidelines on:** antibody production. Disponível em: <http://www.cccac.ca>.

ERHARD, M. H.; MAHN, K.; SCHMIDT, P.; OLTMER, S.; PREISINGER, R.; ZINSMEISTER, P.; STANGASSINGER, M. Evaluation of various immunization procedures in laying hens to induce high amounts of specific egg yolk antibodies. **Alternatives to Laboratory Animals** 28:63-80, 2000.

GARVEY, J. S.; CREMER, N. E. & SUSSDORF, D. H. **Methods in Immunology**, 3rd Edn. Reading MA: W.A. Benjamin, Inc, 1977.

GROSSMAN, C. J. Possible underlying mechanisms of sexual dimorphism in the immune response, fact and hypothesis. **Journal of Steroid Biochemistry** 34:241-251, 1989.

HANLY, W. C.; ARTWOHL, J. E. & BENNETT, B. T. Review of polyclonal antibody production procedures in mammals and poultry. **Institute for Laboratory Animal Research Journal** 37:93-118, 1995.

ROWAN, A. The Principles of Humane Experimental Technique W M S Russell and R L Burch (1992[1959]). **Universities Federation for Animal Welfare:** Potters Bar. 238 pp. UK. Animal Welfare, 1(4), 304-305. ISBN 0 900767 78 2. 1992. doi:10.1017/S0962728600015335.

SCHADE, R.; STAAK, C.; HENDRIKSEN, C.; EHARD, M.; HUGL, H.; KOCH, G.; LARSSON, A.; POLLMANN, W.; REGENMORTEL, V.; PIJKE, E.; SPIELMANN, H.; STRAUGHAN, D. The production of avian (egg yolk) antibodies-IgY: The report and recommendations of ECVAM Workshop 21. **Alternatives to Laboratory Animals** 24(6): 925-934, 1996.

STILLS, H. F. Polyclonal Antibody Production. *In: The Biology of the Laboratory Rabbit*, 2nd Edn. (eds. P.J. Manning, D.H. Ringler & C.E. Newcomer). San Diego CA: Academic Press. 1994, p. 435-448.

SVENDSEN BOLLEN, L.; CROWLEY, A.; STODULSKI, G.; HAU, J. Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG. A comparison of titre and avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvants. **J Immunol Methods.** 1996 May 27;191(2):113-20. doi: 10.1016/0022-1759(96)00010-5.

UNIÃO EUROPEIA. Diretiva 2010/63/UE on the protection of animals used for scientific purposes. Working document on a severity assessment framework. **Brussels**, 11-12 July 2012. Disponível em: https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/guidance/severity/en.pdf