

CONTROLE DE QUALIDADE E SEGURANÇA

Data de aceite: 03/07/2023

Murilo Vieira da Silva

Universidade Federal de Uberlândia,
Uberlândia – MG
ORCID 0000-0002-3397-0113

Rodrigo Müller

Instituto de Tecnologia em
Imunobiológicos -Bio-Manguinhos –
Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro
– RJ
ORCID 0000-0002-5828-6254

O uso de animais para fins científicos é uma prática de longa data na investigação biológica e medicina. As notáveis semelhanças anatômicas e fisiológicas, além do compartilhamento de genes entre humanos e animais, particularmente mamíferos, levaram os pesquisadores a investigarem uma grande variedade de mecanismos e avaliar novas terapias em modelos animais experimentais antes de aplicar suas descobertas aos humanos e outros animais, garantindo, assim, além da eficácia, a segurança desses produtos (BARRÉ-SINOUSI; MONTAGUTELLI, 2015). Os testes de

pirogênio e neurovirulência, bem como os de toxicidade aguda, crônica e inespecífica, são de fundamental importância para a garantia dessa qualidade e segurança, e, portanto, alvos de nossa discussão neste capítulo. A regulamentação para utilização de animais em testes no Brasil cabe ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA); sobre a biossegurança laboratorial, à Comissão Nacional Técnica de Biossegurança (CTNBIO), e as normas devem ser constantemente observadas e cumpridas, assim como toda a regulamentação que garanta a qualidade, segurança e aceitabilidade do teste a ser realizado, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Farmacopeia.

A construção do conhecimento científico e desenvolvimento tecnológico é um processo de consolidação pautado na evolução, revisão e aprimoramento de métodos e produtos. Desse modo, o uso de animais como métodos também é alvo para o desenvolvimento de conhecimento pautado na legislação e ética. Nesse

sentido, cabe ressaltar que existe atualmente uma busca incessante pelo refinamento, pela redução e substituição (*The Principles of Humane Experimental Technique* - Princípio dos 3Rs) dos modelos animais (RUSSELL; BURCH, 1959), até então imprescindíveis para o desenvolvimento científico. Dentre esses modelos, diretamente ligados aos testes discutidos neste capítulo, podemos exemplificar: Lisado de Amebócitos do *Limulus* (LAL) e Teste de Ativação de Monócitos (MAT) para pirógenos e os testes de Toxicidade Aguda Oral - Procedimento de Doses Fixas (OECD TG 420), Toxicidade Aguda Oral - Classe Tóxica Aguda (OECD TG 423), Toxicidade Aguda Oral - procedimento “*Up and Down*” (OECD TG 425) e estimativa da dose inicial para teste de toxicidade aguda oral sistêmica (OECD TG 129) para toxicidade aguda (BRASIL, 2015; 2019).

Contudo, enquanto a substituição completa de animais não é uma realidade, é importante que todos os testes sejam realizados dentro dos princípios éticos e legais da experimentação animal, indo ao encontro do refinamento constante de técnicas e consequente redução do número de animais utilizados. Para isso, é premissa a presença de uma equipe técnica qualificada, de preferência multidisciplinar, que conheça a fundo os modelos animais a serem utilizados nos testes e que possa dar todo suporte para o pesquisador, seja por meio de treinamento ou acompanhamento em tempo integral. Ainda, o conhecimento, por todos envolvidos, da etologia do modelo animal utilizado, e a supervisão de médico veterinário com conhecimento específico e disponibilidade para acompanhar os procedimentos/testes, bem como treinar os demais membros da equipe para o acompanhamento clínico dos animais, e quando necessária a adoção de pontos finais humanitários (*endpoints*), dentre eles a eutanásia, também é indispensável.

É importante ressaltar que nem sempre o *endpoint* dos animais requer eutanásia e, portanto, Comissões de Ética animal no Uso de Animais (CEUAs) possuem papel fundamental na aprovação dos protocolos, bem como seu acompanhamento. Devem sempre solicitar à equipe a apresentação dos possíveis danos aos animais, e quais pontos finais humanitários serão adotados. São exemplos de *endpoints*: protocolos de analgesia e analgesia mais eficientes e planejados para o ensaio específico, levando em consideração particularidades de espécie e linhagens/colônias, reaproveitamento do animal, removê-lo do estudo, implementação de períodos de descanso entre os estudos, aposentadoria do animal de pesquisa ou mesmo adoção (NUNAMAKER *et al.*, 2021). Para determinação do *endpoint*, o pesquisador principal, que tem conhecimento preciso tanto dos objetivos do estudo quanto do modelo proposto, deve identificar, explicar e incluir no protocolo de uso de animais um desfecho do estudo que seja humano e cientificamente válido (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2011).

Entretanto, para adoção de qualquer *endpoint* é necessário o acompanhamento clínico dos animais durante todo o protocolo. Este então, é o principal fator balizador de todas as decisões a serem tomadas. Portanto, a experiência no diagnóstico do distresse, da ausência de saúde, da dor e desconforto é indeclinável. Uma vez que os roedores

são seres não-verbais, presas por natureza e, portanto, podem manifestar sinais sutis de dor, a identificação desse desconforto, associado a sinais de bem-estar, são desafiadores e fundamentais para garantir a aceitabilidade ética de trabalhar com esses animais em pesquisas (TURNER; PANG; LOFGREN, 2019). Dentre as diferentes vias para detecção, algumas das mais recentes são: aplicação de etogramas, escalas de alteração facial e construção de ninhos. Elas avaliam alteração de comportamento instantâneo, sendo necessário o acompanhamento regular antes e após uso do animal nos testes, bem como a associação de duas ou mais metodologias de diagnóstico. Assim, consegue-se aprimorar o tratamento e cuidado com conseqüente melhoria no bem-estar geral dos animais.

Para uma avaliação confiável de bem-estar animal em roedores, é importante considerar que a presença do próprio observador pode ser um fator de confusão, pois já foi demonstrado que espécies presas têm um impulso natural para suprimir comportamentos de dor na presença de outro animal, especialmente se perceberem que esse outro pode representar uma ameaça. Como exemplo, os camundongos que demonstram a capacidade de suprimir caretas, dificultando o uso da Escala de Grimace (MILLER; LEACH, 2015; OLIVER *et al.*, 2017). Portanto, os métodos que podem ser conduzidos indiretamente, sem a presença de um humano, como por meio de vídeo remoto, podem ser particularmente úteis para avaliações de dor nessa espécie.

Uma avaliação geral da saúde e do bem-estar do modelo experimental inclui uma avaliação do animal em sua gaiola e um exame clínico prático. Ao observar cuidadosamente os animais na gaiola com foco no grau de atividade, construção do ninho, interação com outros animais e aparência geral, tem-se indicadores valiosos. De forma complementar, o exame físico pode fornecer informações sobre a hidratação do animal, condição corporal e anormalidades (BURKHOLDER, 2012). Para tal, adotando como modelo experimental os camundongos, apresentamos abaixo um quadro com intuito de direcionar a avaliação (Quadro 1).

O acompanhamento clínico e comportamental por profissionais treinados é fundamental para o estabelecimento dos limites para *endpoints*. Esse monitoramento deve ser feito com frequência capaz de detectar as possíveis alterações clínicas a serem apresentadas pelos animais, inclusive em finais de semana e feriados. A determinação desses pontos finais humanitários é um grande desafio em todos os protocolos experimentais, pois o ideal é que os objetivos científicos possam ser alcançados sem efeitos adversos, dor ou angústia para os animais. No entanto, nem sempre isso é possível, sobretudo nos testes de qualidade e segurança, em que fatores como apresentação de quadro clínico febril (ex: testes de pirógenos), alterações neurológicas (ex: testes de neurovirulência), morbidade e mortalidade (ex: CL50 e DL50) são indicadores de que o produto possa ser ou não utilizado. Neste sentido, é fundamental uma ação conjunta entre CEUA da instituição e pesquisadores envolvidos, para que se consiga o estabelecimento dos limites para *endpoints*, garantindo a reprodutibilidade e confiabilidade dos dados, principalmente que

os ensaios sejam realizados de acordo com a regulamentação pertinente.

Nesse contexto, a aplicação do refinamento de técnicas é premissa para condução dos testes. Esse refinamento pode ser observado em várias ações que não comprometam a qualidade dos resultados preconizada por órgãos regulamentadores. Desse modo, destaca-se o treinamento adequado e desenvolvimento de habilidades do operador em ensaios de neurovirulência, por exemplo, em que a acurácia do operador na administração intracerebral é extremamente importante para a sobrevivência do animal, pois quando a aplicação é realizada de forma inadequada, pode culminar em óbito do animal por trauma.

A seleção de uma via de administração específica deve equilibrar uma série de fatores - por exemplo, o volume e as propriedades físico-químicas da substância, a velocidade necessária e outros pontos, como o grau de irritação que se pode ocasionar no tecido. Por isso, em testes de toxicidade esses fatores devem ser avaliados com cautela.

É essencial que haja uma estrutura geral e de liderança para prover uma cultura de cuidado, que seja amplamente disseminada quanto aos efeitos de quaisquer substâncias administradas nos animais, como e por quem essas substâncias são administradas e as técnicas empregadas na administração.

Alguns exemplos demonstrados pelo *National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research* (NC3Rs) (NC3Rs, 2021) são importantes para demonstrar que práticas desarmoniosas com o bem-estar animal são muito comuns, tais como: Você injetaria em alguém uma agulha hipodérmica usada? Injetar em um cachorro? Se não, por que não? Então, por que você usaria a mesma agulha hipodérmica descartável para injetar em mais de um animal de laboratório? Essas agulhas são vendidas e claramente etiquetadas para “uso único”. Há evidências claras de que, depois que a agulha penetra na pele, a ponta fica deformada e os produtos de tecido aderem ao metal danificado. A força mecânica necessária para a inserção da agulha e a dor resultante estão diretamente relacionadas à nitidez da agulha; as agulhas rombas e usadas causarão ao animal dor desnecessária e danos aos tecidos. Além disso, a reutilização de agulhas aumenta as chances de propagação da infecção entre os animais. Ambos os aspectos do aumento da dor e do potencial de transmissão de infecções são variáveis confusas e completamente desnecessárias para a ciência (NC3Rs). Importante ressaltar que a reutilização de agulhas hipodérmicas descartáveis é inaceitável.

Se não podemos reservar um tempo para fazer um estudo corretamente, com práticas de trabalho adequadas, então não devemos realizá-lo. Essas práticas do dia a dia, como injetar uma agulha usada em um animal, demonstram se a nossa cultura de cuidados realmente está funcionando como deveria.

É muito importante que práticas como essa não sejam realizadas em uma instalação animal. Elas demonstram se estamos trabalhando em um alto padrão de cuidados.

A institucionalização de Procedimentos Operacionais Padronizados (POPs) deve ser realizada e multiplicada a todos os colaboradores envolvidos na experimentação

animal, e o treinamento desses POPs deve ser ministrado por profissionais competentes e experientes nas técnicas experimentais a serem realizadas. Deve haver uma avaliação de competência pelo instrutor e o monitoramento se a técnica está ou não sendo realizada de forma eficiente (MULLER *et al.*, 2020).

A expertise nas técnicas experimentais é um ponto muito importante a ser monitorado, todavia o acompanhamento dos animais em experimentação deve ser realizado de forma unívoca, de modo que todos os envolvidos nesse processo consigam ter a mesma percepção e sensibilidade do estado do animal em todo o processo, desde o alojamento e manejo inicial com o animal até a finalização do protocolo. Essa fase final deve realizada da forma mais humanitária possível, segundo regulamentação do CONCEA como a diretriz referente aos procedimentos de eutanásia realizados em animais incluídos em atividades de ensino ou de pesquisa científica.

De forma geral, ressalta-se que a qualificação profissional, o conhecimento das normas que regulamentam os testes de pirogênio, neurovirulência e toxicidade, bem como das relativas ao uso de animais e de biossegurança, devem ser sempre cumpridas. Ainda, é necessário o estabelecimento da cultura do cuidado, atenção constante aos princípios éticos da experimentação animal, para que produtos possam ser desenvolvidos com segurança e qualidade.

Os animais de laboratório são considerados elementos fundamentais da experimentação, portanto, é indispensável a sua padronização para uso em pesquisas, pois diminui o número de animais necessários para atingir a exatidão do experimento (MEZADRI; TOMÁZ; AMARAL, 2004). A padronização desses animais, atrelada à experiência da equipe, corroboram uma maior acurácia. Animais que possuam certificação sanitária e genética são essenciais para minimizar as possíveis interferências relacionadas a esses quesitos, contribuindo fundamentalmente para uma pesquisa científica de alta qualidade e reprodutível. A qualidade dos animais depende diretamente da infraestrutura das instalações, que devem garantir o controle sanitário e o bem-estar animal, seguindo os princípios éticos. Dessa forma, a melhoria da infraestrutura dos biotérios é indispensável à pesquisa de fármacos e medicamentos e constitui-se em um dos gargalos que as políticas atuais de incentivo tentam eliminar (LAINETTI, 2009).

No contexto de um Sistema da Garantia da Qualidade (SGQ) em um Biotério, constituem-se parte dos requisitos essenciais a infraestrutura e equipamentos adequados, pessoal técnico capacitado e qualidade sanitária dos animais. Essas são ações fundamentais para a maior reprodutibilidade de resultados experimentais e bem-estar animal, as quais são premissas indispensáveis.

A qualidade dos estudos *in vivo*, a ética e a reprodutibilidade científica são imprescindíveis para a pesquisa científica mundial, respeitando as legislações vigentes e promovendo a busca contínua das melhores práticas de experimentação animal para o desenvolvimento e avanço da biotecnologia.

As instituições que utilizam animais com finalidade de ensino e pesquisa necessitam

de estrutura adequada, aprimoramento na gestão e execução da experimentação animal, bem como da implementação de um sistema de qualidade, controle e treinamento. A implantação de um sistema de gestão da qualidade integrado às Boas Práticas, essas aliadas à capacitação técnica, promove maior sucesso e confiança nos resultados dos testes realizados. Consequentemente, contribui diretamente para o princípio dos 3Rs e culmina na credibilidade e reprodutibilidade da pesquisa.

Monitoramento Clínico Geral <i>Pesquisadores e Médicos Veterinários</i>		
	Observação	Recomendação
Avaliação pela caixa	Move-se ao redor da gaiola, limpa-se (<i>grooming</i>), come, bebe e interage com outros? *	Permanece no grupo experimental
	Produziu novo ninho após 24 horas da troca da gaiola? **	Permanece no grupo experimental
	Existem fezes na gaiola após 24 horas da troca? ***	Permanece no grupo experimental
	Ao avaliar as expressões faciais, você detectou que o (s) animal(ais) apresenta(m) um ou mais sinais de dor/distresse? <i>Sinais:</i> olhos semicerrados; pele contraída ao redor do nariz; orelhas puxadas para trás.	Avaliação imediata por Médico Veterinário <i>Adoção de endpoint</i>
Avaliação em mãos	Apresenta sinais de desidratação como: paralisia de membros posteriores e dificuldade de agarrar e segurar tampa aramada da caixa (fraqueza), afundamento dos olhos e/ou demora para retorno ao estado normal da pele, quando esta é beliscada na região das escápulas?	Avaliação imediata por Médico Veterinário <i>Adoção de endpoint</i>
	Ao palpar os ossos sacroilíacos, é possível senti-los, mas sem a sensação de ossos proeminentes? ****	Permanece no grupo experimental
	Os dentes incisivos apresentam oclusão e desgaste normais?	Permanece no grupo experimental
	As membranas mucosas (boca, olho e genitais) apresentam coloração rosa?	Permanece no grupo experimental

*Os camundongos são curiosos e ativos, esses comportamentos são observados especialmente depois de serem estimulados por terem algum manejo em sua gaiola.

**É importante que na nova gaiola haja material apropriado para confecção do ninho.

***Ausência de fezes pode ser um indicativo de que o(s) animal (ais) não está (ão) se alimentando.

****Avaliação da condição corporal em camundongos, passando um dedo sobre os ossos sacroilíacos (a coluna e os ossos do quadril) e atribuição de uma pontuação de 1 a 5 é uma medida sensível de bem-estar, mais do que avaliar o peso corporal. A pontuação de 1 indica emagrecimento e uma pontuação de 5, obesidade. Em um camundongo perfeitamente condicionado, pontuado como 3, os ossos são palpáveis, mas não proeminentes (FOLTZ & ULLMAN-CULLERE, 1999; ULLMAN-CULLERE & FOLTZ, 1999).

Quadro 1. MODELO DE QUADRO PARA MONITORAMENTO CLÍNICO GERAL DE ANIMAIS SUBMETIDOS A TESTES DE CONTROLE DE QUALIDADE E SEGURANÇA

Fonte: Hess *et al.*, 2008; Langford *et al.*, 2010

REFERÊNCIAS

BARRÉ-SINOUSSE, F.; MONTAGUTELLI, X. Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. **Future Sci OA**, 1(4): FSO63, 2015.

BRASIL. **Resolução Normativa nº 18, de 24 de Setembro de 2014**. Conselho Nacional de Controle de Experimentação. Disponível em: <https://antigo.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-18-de-24.09.2014-D.O.U.-de-25.09.2014-Secao-I-Pag.-9.pdf>. Acesso em: 01 nov. 2021.

BRASIL. Resolução Normativa nº 45, de 22 de outubro de 2019. Conselho Nacional de Controle de Experimentação. Disponível em: <https://antigo.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-n-45.pdf> Acesso em: 02 nov. 2021.

BURKHOLDER, T.; FOLTZ, C.; KARLSSON, E.; LINTON, C. G & SMITH, J. M. Health Evaluation of Experimental Laboratory Mice. **Current Protocols in Mouse Biology** 2: 145-165, 2012.

HESS, S. E., ROHR, S.; DUFOUR, B. D.; GASKILL, B. N.; PAJOR, E. A. & GARNER, J. P. Home improvement: C57BL/6J mice given more naturalistic nesting materials build better nests. **J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.** 47:25-31, 2008.

LAINETTI, E. B. **Análise Crítica para adequação física e implantação de novos procedimentos na Divisão de Animais de Laboratório do IPEN** - Dissertação (mestrado). São Paulo: Instituto de pesquisas energéticas e nucleares, 2009.

LANGFORD, D. J.; BAILEY, A. L.; CHANDA, M. L.; CLARKE, S. E.; DRUMMOND, T. E.; ECHOLS, S.; GLICK, S.; INGRAO, J.; KLASSEN-ROSS, T.; LACROIX-FRALISH, M. L.; MATSUMIYA, L.; SORGE, R. E.; SOTOCINAL, S. G.; TABAKA, J. M.; WONG, D.; VAN DEN MAAGDENBERT, A. M.; FERRARI, M. D.; CRAIG, K. D. & MOGIL, J. S. Coding of facial expressions of pain the laboratory mouse. **Nat. Methods** 7:447-450, 2010.

MEZADRI, T.; TOMÁZ, V.; AMARAL, V. L. **Animais de laboratório**: cuidados na iniciação experimental. Universidade Federal de Santa Catarina, v. Cap. 1, p. 32–37, 2004.

MILLER, A. L.; LEACH, M. C. The Mouse Grimace Scale: a clinically useful tool? **PLoS One** 10:1–10. 10.1371/journal.pone.0136000, 2015.

MÜLLER, R.; SILVA, B. J. D.; ALMEIDA, Alex Costa de; VILELA, L. T.; NETO, Plínio de Araujo Oliveira; FREITAS, T. S.; LOPES, I. G. Importância da capacitação da equipe bioterista em um novo modelo operacional na experimentação animal e na reprodutibilidade dos resultados. **International Journal of Development Research**, p. 39638-39641, 2020.

NATIONAL CENTRE FOR THE REPLACEMENT, REFINEMENT AND REDUCTION OF ANIMALS IN RESEARCH Disponível em: <https://nc3rs.org.uk/news/reuse-needles-indicator-culture-care>. Acesso em: 24 out. 2021.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**, 8th ed. National Academies Press, Washington, D.C. 2011. Disponível em: <http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-Care-and-Use-of-Laboratory-Animals.pdf>.

NUNAMAKER, E. A.; DAVIS, S.; O'MALLEY, C. I.; TURNER, P. V. Developing Recommendations for Cumulative Endpoints and Lifetime Use for Research Animals. **Animals**, 11(7): 2031, 2021.

OLIVER, V. L.; ATHAVALE, S.; SIMON, K. E.; KENDALL, L. V.; NEMZEK, J. A.; LOFGREN, J. L. Evaluation of pain assessment techniques and analgesia efficacy in a female guinea pig (*Cavia porcellus*) model of surgical pain. **J Am Assoc Lab Anim Sci** 56:425–435, 2017.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The Principles of Humane Experimental Technique**. Methuen: London, UK; UFAW: Potters Bar, UK; Herts, UK, 1959; p. 239.

TURNER, P. V.; PANG, D. S.; LOFGREN, J. L. A Review of Pain Assessment Methods in Laboratory Rodents. **Comp Med**. 2019;69(6):451-467. doi:10.30802/AALAS-CM-19-000042.