



Revista Portuguesa
de

irurgia

II Série • N.º 24 • Março 2013

ISSN 1646-6918

Órgão Oficial da Sociedade Portuguesa de Cirurgia

Experimentação animal, um mundo com regras – do planeamento à publicação

Ana Isabel Moura Santos¹ e Luis Antunes²

¹ Professora Auxiliar, SPCAL – Sociedade Portuguesa de Ciências em Animais de Laboratório, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa

² Professor Associado, SPCAL – Sociedade Portuguesa de Ciências em Animais de Laboratório, Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD) Responsável Best4R – Investigação com animais de laboratório (UTAD)

INTRODUÇÃO

A utilização de animais para fins experimentais em cirurgia é relativamente frequente como forma de desenvolver e testar melhoramentos técnicos ou como forma de treino dos profissionais. Este artigo pretende colaborar no esclarecimento de algumas questões práticas e legais com que os profissionais se deparam quando recorrem à utilização de animais para fins experimentais, científicos ou de treino.

No livro “The principles of humane experimental technique”, William Russel e Rex Burch (1959) foi proposto o princípio dos 3 R’s da experimentação animal. Este princípio baseia-se em 3 ideias: a) “replace”, que se traduz por substituir os animais capazes de experimentar dor, prazer, felicidade, medo, frustração e ansiedade; b) “reduction”, que significa reduzir o número de animais utilizados, sem prejudicar a qualidade dos resultados e c) “refinement” que quer dizer refinamento, ou seja, a diminuição da incidência ou severidade de procedimentos aplicados. Os utilizadores de animais podem e devem sempre contribuir para a aplicação da regra dos 3 R’s na utilização de animais, de que tanto se fala em Ciências de Animais de Laboratório.

A discussão das condições legais para a utilização de animais é, nesta altura, muito pertinente, pois a co-

munidade científica está a aguardar a transposição de novas recomendações para a lei nacional. Na área da cirurgia é muito frequente o uso de alguns modelos animais com o objectivo de possibilitar a transposição dos resultados para benefício da saúde humana. Pretendemos, com esta reflexão, colaborar para que na fase de planeamento da utilização alguns passos sejam sempre considerados.

REGULAMENTAÇÃO

Em Portugal a utilização de animais depende da obtenção de autorização ou creditação por parte da Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), que é a entidade governamental competente para a proteção dos animais utilizados para fins experimentais e/ou outros fins científicos. Dentro da DGAV é especificamente a divisão de Bem-Estar Animal que pertence à Direção de Serviços de Proteção Animal que executa esta tarefa.

A regulamentação legal em Portugal derivará em breve da transposição da Diretiva da Comunidade Europeia (2010/63/EU). Esta diretiva comunitária surge como o resultado da revisão da Diretiva n.º 86/609/CEE do Conselho da Europa e visa melhorar e reduzir a utilização de animais para fins expe-



rimentais, além de tentar harmonizar os procedimentos legais entre os vários Estados membros. Até à data da conclusão deste artigo, estava em vigor a Portaria n.º 1005/92 de 23 de Outubro, relativa à proteção dos animais utilizados para fins experimentais e/ou outros fins científicos. Em Portugal esta regulamentação abrange a utilização de animais para fins de ensino ou treino, situação que não acontece noutros Estados membros da Comunidade Europeia que não permitem a utilização desses referidos animais. Para mais informações e atualizações o leitor pode visitar o sítio <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?actualmenu=61974&generico=15470&cboui=15470>.

TREINO E CREDITAÇÃO DE PESSOAS

Por determinação legal, em Portugal, a creditação é feita pela DGAV, é obrigatória para todas as pessoas envolvidas na utilização de animais para fins experimentais ou de ensino e está sempre dependente da frequência de ações de formação prévias, nomeadamente em Ciências de Animais de Laboratório. Este factor deve ser considerado pelas Instituições acolhedoras dos potenciais utilizadores de animais de laboratório e é considerado um requisito fundamental para as funções a desempenhar pelos usuários. A formação e treino específico em animais de laboratório, de todos os envolvidos, são obrigatórios em Portugal desde 1992 independentemente da área de formação prévia. Até publicação de nova legislação, as pessoas podem obter creditação com o nível de tratador, técnico de investigação, investigador e investigador-coordenador. Estes quatro níveis de creditação são os identificados com as categorias de A a C das recomendações publicadas pela FELASA (Federation of European Laboratory Animals Sciences Associations) para formação e treino. Mais informações disponíveis em <http://www.felasa.eu/recommendations>. Estas recomendações sugerem sempre a frequência de ações de formação específicas em Ciências de Animais de

Laboratório como forma de garantir uma formação harmonizada que garanta uma atualização adequada em termos teóricos e práticos e acima de tudo uma utilização mais consciente do ponto de vista do bem-estar animal. Para além de melhorar as condições humanas de utilização, a formação facilita também a mobilidade dos utilizadores, requisito cada vez mais pertinente nos tempos que correm. Em Portugal, as ações de formação em Ciências de Animais de Laboratório podem utilizar animais. No entanto a utilização de animais para formação e treino levanta algumas preocupações sob o ponto de vista ético, situação que levou alguns Estados da Comunidade Europeia a limitar ou interditar a utilização de animais para ensino.

Embora até à data as creditações individuais tenham sido dadas sem data limite e baseadas no pressuposto da aquisição de competências, após a transposição da nova Directiva Comunitária é previsível que passe a ser requerida a formação continuada para manutenção da creditação. A formação continuada em Ciências de Animais de Laboratório baseia-se na estratégia já aplicada a algumas carreiras ligadas à ciência e à saúde que requerem uma formação flexível e variada adequada a cada profissional, adquirida posteriormente à formação considerada mínima para cada nível. Nesta nova situação a formação continuada implica a necessidade de ao longo da carreira de utilizador manter uma atualização periódica. Isto significa que será necessária a frequência de ações de formação regulares em Ciências de Animais de Laboratório para se poder continuar a utilizar animais para fins experimentais. Cada indivíduo é responsável pela sua creditação, sendo também responsabilidade das Instituições onde se desenvolve o trabalho garantir o não envolvimento em procedimentos de experimentação animal de elementos sem a competente formação e creditação.



CREDITAÇÃO DE LOCAIS E PROJECTOS

Além da creditação das pessoas envolvidos na produção, manutenção e utilização dos animais é ainda necessária a obtenção de alvará para todos os estabelecimentos de criação, fornecimento e utilização de animais. O pedido de licenciamento de instalações é da responsabilidade dos órgãos de gestão dos mesmos e deve ser obtido antes da sua entrada em funcionamento. A capacidade de acomodar e manter animais é dispendiosa e trabalhosa pelo que em geral está centralizada e nível institucional ou local.

Os projetos de investigação têm também que ser submetidos à avaliação da DGAV e só devem ser colocados em prática após obtenção de aprovação para a sua execução. Idealmente um projeto só deverá ser submetido para financiamento após obtenção de todas as creditações referidas. O investigador responsável deve avaliar e identificar o nível de severidade de todos os procedimentos a executar e definir os pontos terminais aceitáveis (*humane end points*). Com a implementação da nova directiva o investigador deverá ainda fazer uma análise retrospectiva da severidade infligida durante a execução do seu projecto.

A PUBLICAÇÃO DE RESULTADOS DE TRABALHOS EXPERIMENTAIS COM ANIMAIS

A publicação de dados científicos através de artigos contendo informação obtida após a realização de experiências com animais é atualmente alvo de um particular escrutínio por parte de editores e revisores. Estes tendem a ser particularmente assertivos para garantir que a informação fornecida foi recolhida tendo por base as melhores práticas, que assegurem o bem estar animal, rigor dos dados obtidos e elevados princípios éticos.

Diversas revistas apresentam uma secção específica de recomendações de preparação de manuscritos para autores que tenham realizado estudos em animais. Nos Estados Unidos por exemplo é frequente pedir que os

trabalhos experimentais com animais devam estar de acordo com as diretrizes estabelecidas no Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals). Este guia está amplamente disponível, podendo ser consultado em <http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-care-and-use-of-Laboratory-animals.pdf>. É também prática comum requerer a referência da aprovação dos projectos pelas Comissões Institucionais de Utilização e Bem Estar Animal (IACUC-Institucional Animal Care and Use Committee). A adesão a todos os regulamentos pertinentes e / ou aprovação do Comité de Ética e de cuidados animais institucionais ou licenciamento governamental do investigador e / ou laboratorial deve ser obtido antes do início dos estudos. A declaração sobre a aprovação deve ser incluída no início da secção de Material e Métodos. Casos os revisores de qualquer revista demonstrem preocupações com os cuidados animais durante a realização dos procedimentos, podem requerer via editor-chefe, uma cópia da aprovação das diversas licenças. No caso particular de trabalhos de índole cirúrgica, os autores podem ser questionadas sobre o uso de anestésicos, relaxantes musculares e analgésicos. A utilização de analgésicos pós-operatórios é frequentemente desprezada e a utilização de fármacos bloqueadores neuromusculares, particularmente em animais deficientemente sedados é motivo de diversas preocupações. A aprovação prévia do comité local ou nacional, não garante que em termos éticos, um artigo venha ou não a ser aceite por uma revista pois a decisão final é tomada pelo Editor-Chefe.

No mesmo sentido, foi recentemente elaborado pelo National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction on Animals in Research (NC3Rs) do Reino Unido, uma lista de aspetos essenciais, que se devem seguir aquando da preparação de protocolos experimentais. Estes pontos são fulcrais para que os dados obtidos possam mais facilmente ser traduzidos em material publicável. As linhas de orientação ARRIVE (Animal Research: Reporting In Vivo Experiments) estão disponíveis através de vários



jornais científicos, ou no sítio: <http://www.nc3rs.org.uk/downloaddoc.asp?id=1206&page=1357&skin=0>. Estas linhas de orientação destinam-se a melhorar a comunicação de resultados de experiências com animais. Trabalhos anteriores do NC3Rs e outras instituições mostraram que muitas publicações com animais não tinham informações importantes sobre como o estudo foi concebido, realizado e analisado. Tal pode limitar o valor da informação para futuros estudos científicos e políticos.

As diretrizes desenvolvidas pelo NC3Rs visam melhorar os padrões de relatórios e publicações, garantindo que os dados de experiências com animais possam ser totalmente avaliados e utilizados. As diretrizes são primariamente destinadas a cientistas que descrevem os seus resultados para publicação e para aqueles que estão envolvidos na revisão. Estas diretrizes consistem numa lista de 20 pontos essenciais que devem ser incluídos em publicações envolvendo experimentação animal. Nos próximos parágrafos salientamos os pontos que consideramos mais relevantes no âmbito da cirurgia.

INTRODUÇÃO DO PROJETO/TRABALHO

Relativamente à introdução do projeto ou artigo, esta deve conter uma justificação clara para a realização do estudo e deve incluir informação científica suficiente e fundamentada com referências relevantes de trabalhos anteriores. Desta forma deverá ser fácil entender a motivação e contexto para realização do estudo. A introdução deve explicar a abordagem experimental e deixar claro como e porquê as espécies animais e modelo a ser utilizado podem permitir abordar os objetivos científicos. Sempre que pertinente, deve incluir detalhes da espécie ou estirpe de animais utilizados, principais métodos e potenciais conclusões essenciais.

MATERIAL E MÉTODOS

O material e métodos de projetos ou artigos com trabalhos com animais, deve para além das secções clássicas de descrição de métodos e materiais, deixar claro o esforço despendido na correta preparação e delineamentos das experiências. São assim pilares muito importantes nesta secção as seguintes subsecções: declaração e/ou aprovação ética, animais e alojamento, enriquecimento ambiental, procedimentos, desenho experimental e métodos estatísticos.

Declaração ética

Nesta subsecção deve ser indicado a natureza das permissões da revisão ética, licenças relevantes, e as diretrizes nacionais ou institucionais para o cuidado e uso de animais que cobrem a investigação. Exemplos destas declarações utilizadas pelos autores e que podem ser aplicadas no contexto da investigação com animais realizada em Portugal são: “All procedures were carried out under personal and project licenses approved by the National Animal Care Committee, Direcção Geral de Alimentação e Veterinária, Lisbon, Portugal” ou “This project was reviewed and ethically approved by the local ethics committee and Portuguese competent authority for animal protection, Direcção Geral de Alimentação e Veterinária, Lisbon, Portugal, protocol /project N° 00000, from day, month and year”.

Animais e Alojamento

Esta subsecção deve oferecer detalhes sobre os animais utilizados, incluindo espécie, estirpe, sexo, estágio de desenvolvimento e peso. Sempre que possível deve fornecer outras informações relevantes, tais como a origem dos animais, nomenclatura, genética (por exemplo, knock-out ou transgênicos), estado de saúde e imunológico. Devem ser deixados claros detalhes sobre o alojamento, nomeadamente: tipo de instalações onde os animais são mantidos, material de cama, número de animais por gaiola, recinto ou por área, forma de enriquecimento do meio ambiente, ci-



culos de luz / escuridão, temperatura, humidade, tipo e regime de alimentação e abeberamento.

Procedimento

Para todos os grupos experimentais e todos os procedimentos, deve ser fornecida informação detalhada de todas as intervenções realizadas. Por exemplo: formulação de medicamentos e doses, via de administração, anestesia e analgesia utilizada, monitorização da anestesia, descrição do procedimento cirúrgico, destino dado aos animais ou método de eutanásia e análise efetuadas. A fim de garantir que a experiência possa mais facilmente ser replicada noutra laboratório deve ser ainda dada informação adicional relativa a quando (por exemplo, hora do dia) e onde (por exemplo, gaiola ou laboratório) a experiência foi realizada.

Desenho experimental

Particularmente crítica nesta secção, é a inclusão de informação relativa aos detalhes do desenho experimental, grupos de animais utilizados e o número de animais alocados a cada grupo experimental e de controlo. Devem ser também salientadas as providências tomadas para minimizar os efeitos de enviesamento (*bias*) dos dados, nomeadamente garantir que animais são escolhidos para os procedimentos de uma forma aleatória e que a avaliação dos resultados é feita por alguém sem informação relativamente aos tratamentos efectuados. Assim, nesta secção ou na secção de métodos estatísticos deverá ser sempre especificado o número total de animais utilizados em cada experiência além do número de animais em cada grupo experimental. O tamanho da amostra utilizada e a determinação do número de animais por grupo a estudar deve ser justificada através da utilização de métodos de cálculo de poder da amostra tendo por base trabalhos anteriormente realizados.

Métodos estatísticos

A secção de estatística deve ser particularmente clara e requer preparação para evitar erros grosseiros à posteriori. Erros frequentes em trabalhos com animais são

por exemplo a incorreta definição da unidade experimental ou uso abusivo do teste t de student. A primeira situação pode ser ilustrada pela utilização de um único grupo de animais ou gaiola de animais sujeito a um mesmo tratamento. Este grupo deve ser considerado como uma única observação e não como o número de observações igual ao número de animais presentes na gaiola ou recinto. Para minimizar este tipo de erros é cada vez mais conveniente a consulta de um investigador com experiência em delineamento experimental com animais, antes da realização das experiências. Nesta secção devem ficar claros todos os detalhes sobre os métodos estatísticos utilizados para cada análise e para demonstrar que os dados preencheram os pressupostos da abordagem estatística escolhida.

RESULTADOS

A secção dos resultados deve ser clara e objetiva, recorrendo a figuras e tabelas sempre que adequado. Relativamente a outras publicações científicas, as secções de resultados dos trabalhos com experimentação animal devem relatar características relevantes e estado de saúde dos animais (por exemplo, peso e estatuto microbiológico) antes do tratamento ou testes efectuados. Nesta secção deve ser claro o número de animais em cada grupo e incluído em cada análise. Os números devem ser apresentados através de valores absolutos, por exemplo: 10/20 e não em termos de percentagem, nesse caso 50%. Animais ou dados não incluídos na análise final devem ser reportados e apresentadas as razões que levaram à sua exclusão. Os resultados e estimativas obtidas devem ser reportados com uma medida de precisão como por exemplo indicar o desvio padrão ou apresentar intervalo de confiança. Esta secção deve conter informação sobre detalhes de todos os eventos adversos importantes em cada grupo experimental e modificações nos protocolos experimentais feitos para reduzir esses eventos adversos. As implicações destes últimos factores terão que ser discutidos na seguinte secção.



DISCUSSÃO

A discussão, como em qualquer publicação científica consiste na interpretação dos resultados, tendo em conta os objectivos do estudo e hipóteses formuladas. A discussão tem por base a teoria atual e outros estudos relevantes na literatura. Neste contexto devem ser comentadas eventuais limitações do estudo, incluindo todas as fontes potenciais de enviesamento, quaisquer limitações do modelo animal e de imprecisão associada aos resultados. Neste contexto é particularmente importante comentar sobre se, e como, os resultados deste estudo são susceptíveis de serem extrapolados para outras espécies ou sistemas, incluindo a sua relevância para os seres humanos. Do ponto de vista dos 3Rs é importante descrever todas as implicações dos métodos experimentais ou resultados para a substituição, refinamento e redução do uso de animais em trabalhos futuros dentro da área em estudo.

FUTURO

Com a finalidade da promoção do bem estar animal, a nova Directiva Comunitária relativa ao Bem-estar e Experimentação Animal exigirá a criação de Animal Welfare Bodies (ORBEA – Órgãos de Bem-Estar Animal, em Portugal). Estas Comissões deverão ter um cariz local e devem integrar os responsáveis pelos cuidados com os animais, cientistas e a sociedade civil. Contudo, a partir destes mínimos, cada

país poderá acrescentar mais competências. Para Portugal, tanto quanto nos foi dado a conhecer, os ORBEA deverão ter, obrigatoriamente:

- a) pessoa responsável pelos cuidados aos animais,
- b) veterinário ,
- c) diretor do estabelecimento (biotério),
- d) representante dos investigadores e
- e) representante da sociedade civil.

Algumas destas figuras podem estar delegadas na mesma pessoa. Opcionalmente, poderão também integrar: um representante dos tratadores, um especialista em desenho experimental, uma pessoa externa ligada a Ciências de Animais de Laboratório, um representante de um comité de ética para a saúde.

Este órgão visa a descentralização da análise de projetos e é responsável pela aprovação dos projetos antes da sua execução a nível local. As perspectivas apontam para que durante a execução dos projetos os ORBEA devam acompanhar os projetos e, depois de concluídos, reportar à DGAV diversa informação. Este órgão é uma modificação dos atuais comités de ética aplicados a animais, com poderes mais abrangentes, não estando limitada à aprovação do projeto para execução. A nova diretiva cria ainda a necessidade da criação de um quadro de tratadores em *fulltime* ligados ao biotério e o desenvolvimento de uma estreita colaboração com os técnicos de manutenção de todas as condições físicas das instalações a fim de assegurar o normal funcionamento das mesmas.

Correspondência:

ANA ISABEL MOURA SANTOS
e-mail: aisantos@fcm.unl.pt



