

GUIA

BRASILEIRO DE PRODUÇÃO, MANUTENÇÃO OU UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS EM ATIVIDADES DE ENSINO OU PESQUISA CIENTÍFICA

FASCÍCULO **6**

ANFÍBIOS E SERPENTES
MANTIDOS EM INSTALAÇÕES
DE INSTITUIÇÕES DE ENSINO
OU PESQUISA CIENTÍFICA

1ª Edição

Brasília, 31 de março de 2016

MINISTRO DE ESTADO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

CELSO PANSERA

SECRETÁRIA-EXECUTIVA DO MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

EMÍLIA MARIA SILVA RIBEIRO CURI

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

PRESIDENTE

CELSO PANSERA

COORDENADORA

MONICA L. ANDERSEN

CONSELHEIROS:

I – Representantes do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação:

Monica L. Andersen – Titular

Renata Mazaro e Costa – Suplente

II – Representantes do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico:

Kátia de Angelis – Titular

Luisa Maria Gomes de Macedo Braga – Suplente

III – Representantes do Ministério da Educação:

Roberto Lopes de Souza – Titular

Antonio Sebben – Suplente

IV – Representantes do Ministério do Meio Ambiente:

Mônica Mafra Valença Montenegro – Titular

Luís Fábio Silveira – Suplente

V – Representantes do Ministério da Saúde:

Sérgio de Andrade Nishioka – Titular

Maria Augusta Carvalho Rodrigues – Suplente

VI – Representantes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento:

Rui Machado – Titular

Marco Aurélio Delmondes Bonfim – Suplente

VII – Representantes do Conselho de Reitores das Universidades do Brasil:

José Paes de Almeida Nogueira Pinto – Titular

Vicente Ribeiro Rocha Júnior – Suplente

VIII – Representantes da Academia Brasileira de Ciências:

Paulo Hilário Nascimento Saldiva – Titular

Lício Augusto Velloso – Suplente

IX – Representantes da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência:

Lucile Maria Floeter Winter – Titular

Carlos Rogério Tonussi – Suplente

X – Representantes da Federação das Sociedades de Biologia Experimental:

Francisco Tadeu Rantin – Titular

Rovilson Gilioli – Suplente

XI – Representantes da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório:

Vera Maria Peters – Titular

André Silva Caríssimi – Suplente

XII – Representantes da Federação Brasileira da Indústria Farmacêutica:

Marco Antonio Stephano – Titular

Eduardo Pagani – Suplente

XIII – Representantes das sociedades protetoras de animais legalmente estabelecidas no País:

Stélio Pacca Loureiro Luna – Titular

Ceres Berger Faraco – Suplente

Rita de Cássia Maria Garcia – Titular

XIV – Coordenadores-gerais do Guia:

Marcel Frajblat – novembro de 2012 a junho de 2014

Norma Labarthe – julho de 2014 a 27 de novembro de 2015

Marco Antonio Stephano – a partir de 28 de novembro de 2015

COMPOSIÇÃO DA SECRETARIA-EXECUTIVA DO CONCEA

Gabinete da Secretaria-Executiva do Concea

Sharon Lisauskas Ferraz de Campos – Secretária-Executiva

Ana Cláudia Moura Torres – Secretária-Executiva Substituta

Secretariado

Silmara Silva Cavalcanti

Leonice Santos Sousa

a) Técnicos

Antônio Américo Barbosa Viana – Tecnologista em Ciência e Tecnologia

Marcelo Kenji Nishida – Tecnologista em Ciência e Tecnologia

b) Assistentes

Rafael Augusto de Souza Viana – Assistente em Ciência e Tecnologia

Zélia Rodrigues Sardinha – Assistente em Ciência e Tecnologia

c) Apoio Administrativo

Paulo Roberto Costa

d) Auxiliar Administrativo

Edijane Mota de Seixas

e) Estagiário

Igor Vinícius de Castro dos Santos

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Política em C&T do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação

B823e Brasil. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Gabinete do Ministro. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica: fascículo 6: anfíbios e serpentes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica [recurso eletrônico]/coordenadora: Vania Gomes de Moura Mattaraia; Carlos Alberto Gonçalves Silva Jared ... [et al.]. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, 2015.

83 p. il.

Conteúdo: Introdução geral / Adriano da Silva Campos, Bruno Lourenço Diaz, Ekaterina Akimovana Botovchenco Rivera, José Mauro Granjeiro, Luisa Maria Gomes de Macedo Braga, Marcel Frajblat, Marco Antonio Stephano – Anfíbios e serpentes mantidos em instalações de instituições de ensino e pesquisa científica / Carlos Alberto Gonçalves Silva Jared, Kathleen Fernandes Grego, Marta Maria Antoniazzi, Sávio Stefanini Sant'Anna, Selma Maria Almeida Santos, Vania Gomes de Moura Mattaraia.

ISBN: 978-85-88063-28-0

1. Anfíbios. 2. Pesquisa científica. 3. Projeto de Pesquisa. I. Título.

CDU 636.028

FASCÍCULOS

GUIA BRASILEIRO DE PRODUÇÃO, MANUTENÇÃO OU UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS EM ATIVIDADES DE ENSINO OU PESQUISA CIENTÍFICA

Sumário dos Fascículos

1. Introdução Geral
2. Roedores e Lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica
3. Caninos e felinos domésticos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica
4. Primatas não humanos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica
- 5A. Peixes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica – I
- 5B. Peixes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica – II
- 6. Anfíbios e serpentes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica**
- 7A. Pequenos Ruminantes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica
- 7B. Grandes Ruminantes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica
8. Equídeos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica
9. Suínos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica
10. Aves mantidas em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica
11. Estudos conduzidos com animais silvestres mantidos fora de instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica
12. Estudos conduzidos com animais domésticos mantidos fora de instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica
13. Reptéis (exceto serpentes) mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica
14. Animais Silvestres de vida livre

Sumário

FASCÍCULO 6

INTRODUÇÃO GERAL	7
1 Bem-estar animal	9
2 Métodos alternativos ao uso de animais	12
3 Planejamento de novos projetos	14
4 Obtenção de aprovação para novos protocolos de pesquisa	35
5 Referências bibliográficas	38
ANFÍBIOS E SERPENTES MANTIDOS EM INSTALAÇÕES DE INSTITUIÇÕES DE ENSINO OU PESQUISA CIENTÍFICA	40
ANFÍBIOS	
1 Introdução	41
2 Captura no campo	41
3 Instalações animais	43
4 Eutanásia	50
5 Doenças mais comuns observadas no cativeiro	50
6 Referências bibliográficas	52
SERPENTES	
1 Introdução	53
2 Instalações Animais	53
3 Procedimentos de manejo	60
4 Procedimentos	65
5 Cuidados veterinários	68
6 Ética e bem-estar animal no uso de serpentes em laboratório	73
7 Referências bibliográficas	74
ANEXO I	77
REQUISITOS MÍNIMOS PARA PRODUÇÃO, MANUTENÇÃO OU UTILIZAÇÃO DE SERPENTES PARA ATIVIDADES DE ENSINO OU PESQUISA CIENTÍFICA	77
ANEXO II	78
Referências bibliográficas	81
REQUISITOS MÍNIMOS PARA PRODUÇÃO, MANUTENÇÃO OU UTILIZAÇÃO DE ANFÍBIOS PARA ATIVIDADES DE ENSINO OU PESQUISA CIENTÍFICA	83



Introdução GERAL

Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica

INTRODUÇÃO GERAL

Coordenador: *Bruno Lourenço Diaz – Universidade Federal do Rio de Janeiro*

Autores: *Adriano da Silva Campos – Fundação Oswaldo Cruz*
Bruno Lourenço Diaz – Universidade Federal do Rio de Janeiro
Ekaterina Akimovna Botovchenco Rivera – Universidade Federal de Goiás
José Mauro Granjeiro – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
Luisa Maria Gomes de Macedo Braga – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Marcel Frajblat – Universidade Federal do Rio de Janeiro
Marco Antonio Stephano – Universidade de São Paulo

INTRODUÇÃO GERAL

O Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica (Guia) contempla uma das competências do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea).

A Lei Federal 11.794, que em seu capítulo II, artigo 4º, criou o Concea, representa uma mudança de paradigma no que tange ao uso de animais vertebrados para ensino e pesquisa no Brasil. Como Lei Federal, gerou condições para que se estabelecesse uma política nacional para o uso de animais no ensino e na pesquisa. Nesse sentido, a pertinência, bem como a análise crítica da real necessidade do uso de animais em situações experimentais, constituem bases imprescindíveis para que a sociedade como um todo compreenda e aceite como justificável a participação de animais em procedimentos didáticos e científicos. Tarefa difícil que não se consolida sem a introdução de normas, diretrizes e guias que visem orientar a todos que utilizam animais nessas áreas.

A construção deste GUIA resulta de um trabalho do Concea em conjunto com especialistas, constituindo-se em um documento que tem por finalidade nortear pesquisadores quanto ao uso de animais para ensino e pesquisa. Deve-se ressaltar que este Guia se aplica aos animais do filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, utilizados em atividades de ensino e pesquisa, conforme prevê a Lei 11.794/08.

Este documento, além de considerar as particularidades e necessidades de nossas instituições de ensino, laboratórios e instalações animais, usou, a título de orientação, *Guidelines* internacionais com o objetivo de ofertar elementos para que os usuários possam priorizar o bem-estar animal e minimizar a dor e as consequências negativas da manipulação dos animais.

Serão apresentadas formas de como identificar e reconhecer evidências de dor e distresse e a potencial relação destes com a manipulação animal. Dará aos usuários indicações de como desenvolver estratégias para minimizar situações consideradas distressantes e de como manter e incrementar o bem-estar animal, além de oportunizar uma reflexão sobre a necessidade do uso de animais para atingir os objetivos de seus projetos de pesquisa.

Adicionalmente, identifica as estruturas mínimas necessárias às edificações em que os animais são criados, mantidos ou submetidos aos experimentos, bem como os equipamentos necessários para mantê-los com qualidade sanitária e bem-estar.

O Guia traz orientações aos usuários para o estabelecimento de uma reflexão crítica ao uso dos animais, de uma percepção da relação custo/benefício e do valor intrínseco aos resultados pretendidos em seus projetos de pesquisa e atividades didáticas. Preenchidas essas condições é imperativo que os usuários recebam previamente, ao início de suas atividades com animais, a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais, por meio do envio de formulários de proposta de uso animal (Formulário unificado para solicitação de autorização para uso de animais em ensino e/ou pesquisa; em *site* Concea – MCTI).

A percepção de que os animais de experimentação são seres sencientes e que seu uso pode contribuir para a geração de conhecimento deve ser acompanhada da inserção dos pesquisadores aos conceitos dos 3Rs (“*reduction, refinement, replacement*”), que no Brasil são traduzidos como Redução, Refinamento e Substituição. Vale enfatizar que o não cumprimento das orientações estabelecidas neste Guia para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa poderá incorrer em sanções administrativas, bem como, posteriormente, em sanções penais, caso sejam configurados maus tratos.

1 BEM-ESTAR ANIMAL

O cuidado com animais em atividades de ensino ou pesquisa era limitado a prover manejo e alojamento adequados aos animais, com pessoas capacitadas, objetivando assim, um mínimo de variáveis em resultados de pesquisas. Atualmente persistem as mesmas exigências, todavia com especial atenção ao bem-estar dos animais. Nesse sentido, o *status* atual da Ciência considera a somatória da excelência de sólidas bases científicas com o bem-estar animal.

A lei 11.794/08, que regulamenta a utilização animal em nosso país, transformou o bem-estar dos animais não só em uma questão ética e humanitária, mas também em uma questão legal.

Existem várias definições de bem-estar animal e quase todas o caracterizam como um estado onde há equilíbrio físico e mental do animal com o seu ambiente. Porém, mais do que buscar definições, o objetivo de cada um deve ser o de prover condições aos animais para que suas necessidades possam ser satisfeitas e danos possam ser evitados. É importante saber reconhecer se o animal está em bem-estar ou não, para que se possa tomar providências quando necessário. Com essa premissa em mente alguns pontos deverão ser levados em consideração pelo pesquisador ou pelo técnico ao pensar no bem-estar dos animais que serão utilizados.

É importante salientar que uma proposta de utilização de animais deve avaliar, sempre, a relação custo (sofrimento dos animais) *versus* benefício (resultados advindos da pesquisa ou atividade didática). Não se pode deixar de citar que o custo para o bem-estar de animais produzidos, mantidos ou usados para procedimentos científicos possui dois componentes distintos: o primeiro é o custo inerente que compreende os aspectos negativos da produção e cuidados e o segundo é o custo direto (danos) resultante dos procedimentos experimentais aplicados (RUSSELL & BURCH, 1959).

Outro aspecto a ser considerado é o de lembrar que a utilização de animais na pesquisa ou ensino sempre impactará negativamente no seu bem-estar; seja porque os animais serão expostos a manipulações diversas; a alterações genéticas ou somente por mantê-los em ambientes padronizados, que podem não preencher totalmente suas necessidades e adaptações.

A elaboração do projeto de pesquisa ou atividade didática deve levar em consideração os seguintes aspectos:

- estar ciente de que a dor e o sofrimento dos animais devem ser minimizados ou evitados. Este item é tão importante quanto alcançar os objetivos científicos ou didáticos;
- seguir os princípios éticos da utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica e os conceitos dos 3Rs;
- conhecer a biologia e a etologia da espécie que será utilizada. Lembrar as diferenças entre espécies e que o bem-estar possui dois componentes: o físico e o comportamental;
- documentação da atividade didática por meio de filmagens, gravações ou fotografias de forma a permitir sua reprodução para ilustrar práticas futuras, evitando-se a repetição desnecessária de procedimentos didáticos com animais;
- prover alojamento, ambiente, alimentação e controle ambiental adequados para a espécie;
- realizar manejo adequado para a espécie e prever que ele seja executado por pessoas treinadas para esse fim, pois a intensidade de sofrimento causado pelo mau manejo e mau alojamento muitas vezes supera o sofrimento causado pelos procedimentos experimentais;
- possuir equipe técnica devidamente treinada e capacitada;
- ter médico veterinário responsável pela saúde e bem-estar dos animais;
- apresentar seu projeto à Comissão de Ética no Uso de Animais pertinente antes de iniciar sua execução.

1.1 Definições: dor, distresse e sofrimento

Dor, distresse e sofrimento são termos que descrevem basicamente estados humanos de percepção e experiência. Portanto, é difícil transferir essas definições para animais utilizados em atividades de ensino e pesquisa. De maneira geral, as seguintes definições podem ser atribuídas:

- a dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão real ou potencial;
- o distresse é a incapacidade de superar uma experiência estressante levando a uma ruptura do bem-estar individual;
- o sofrimento é qualquer experiência cuja emoção ligada a ele é negativa. Geralmente está associada à dor e ao comprometimento do bem-estar.

O pessoal envolvido na utilização animal deve conhecer os conceitos de dor, distresse e sofrimento e saber como reconhecer, avaliar, controlar e, preferencialmente, prevenir essa experiência em seus animais. Não há um consenso sobre a definição desses termos, mas, para o propósito deste Guia, serão usadas as definições da Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos – DBCA.

1.2 Efeitos do bem-estar de um animal em resultados científicos

A elaboração de um bom desenho experimental é essencial para o sucesso de um estudo, além de também ser um desafio quando sistemas biológicos complexos, como os animais são utilizados. O ideal é usá-los em um estado fisiológico estável e definido, de forma que a resposta à variável pesquisada não seja perturbada por fatores indesejados. Em estudos com animais, a ausência do controle desses fatores pode levar à interpretação incorreta dos dados devido a possíveis interferências nos efeitos de um tratamento. Especial atenção deve ser dada à dor e ao distresse, devido à complexidade e amplitude das respostas fisiológicas e comportamentais associadas à presença desses fatores durante a coleta e interpretação de dados. A dor e o distresse devem ser sempre minimizados de acordo com o objetivo do estudo, para que sejam evitadas alterações fisiológicas e comportamentais associadas a esses fatores.

Além dos efeitos dos procedimentos da pesquisa no seu bem-estar, os animais podem também ser expostos a uma série de fatores ambientais que causam *stress*. Entretanto, quando esses efeitos são incidentais e não fazem parte do protocolo, os fatores que causam tais alterações devem ser eliminados ou controlados, de forma a não interferirem na coleta de dados e interpretação de resultados.

Claramente, no desenho e execução de protocolos, evitar efeitos indesejados ao bem-estar de animais envolve muito mais que a seleção de agentes anestésicos ou analgésicos adequados ou o fornecimento apropriado de água, comida, temperatura, umidade ou luz. A boa prática científica tem total interesse na preservação do bem-estar dos animais utilizados e na identificação, controle e, sempre que possível, na eliminação dos fatores que possam causar respostas fisiológicas ou comportamentais associadas com estresse ou dor. Quando o estresse (ou os fatores estressantes) ou a dor fazem parte de um procedimento de pesquisa, estratégias para minimizar ou controlar esses efeitos são componentes essenciais do desenho experimental.

Se o bem-estar de um animal for comprometido, as consequências podem incluir:

- aumento da variabilidade nos dados;
- necessidade de um maior número de animais;
- dificuldade na reprodutibilidade dos resultados;
- ausência de dados;
- credibilidade reduzida dos resultados;
- resultados que não podem ser aplicados a outras situações;
- resultados impúblicáveis;
- comprometimento na universalidade experimental;
- uso desnecessário de vidas.

Qualquer resposta a um fator estressor que resulte em alterações nas medidas fisiológicas e comportamentais, por mais breve que seja, pode influenciar a confiabilidade, reprodutibilidade e interpretação dos dados.

2 MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS

O uso de animais nas Ciências da Vida remonta à Grécia antiga e aos primeiros experimentos médicos. Durante séculos, médicos e pesquisadores utilizaram animais para melhorar seus conhecimentos sobre a forma como os vários órgãos e sistemas do corpo humano funcionavam, bem como para aprimorar suas habilidades cirúrgicas.

A ascensão da ciência biomédica moderna no século XIX causou um aumento no número de animais utilizados em experiências, bem como na resistência à vivisseção. A publicação do livro *“Principles of Human Experimental Technique”* pelos pesquisadores William Russel e Rex Burch em 1959 iniciou o movimento de proteção aos animais usados em pesquisa e representou um marco na discussão sobre a utilização de animais para a avaliação de toxicidade. A partir desse movimento, o princípio dos 3Rs (*Reduction, Refinement e Replacement*) para o uso de animais foi estabelecido: a redução reflete a obtenção de nível equiparável de informação com o uso de menos animais; o refinamento promove o alívio ou a minimização da dor, sofrimento ou estresse do animal; a substituição estabelece que um determinado objetivo seja alcançado sem o uso de animais vertebrados vivos. De fato, métodos alternativos podem ser definidos como qualquer método que possa ser usado para substituir, reduzir ou refinar o uso de animais na pesquisa biomédica, ensaios ou ensino.

Em 1969, a criação, no Reino Unido, do *Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments (FRAME)*, órgão para promover junto na comunidade científica o conceito e o desenvolvimento de métodos alternativos, foi a primeira ação em favor do princípio dos 3Rs.

Nos anos posteriores, o avanço da ciência evidenciou as diferenças metabólicas e de respostas que controlam a homeostasia tecidual entre animais não humanos e humanos. A necessidade de modelos *in vitro* mais apropriados tornou-se ainda mais evidente, iniciando-se, então, uma nova fase de abordagem toxicológica. Nas décadas seguintes os pesquisadores e defensores do bem-estar animal se uniram em torno de um objetivo comum: encontrar alternativas cientificamente validadas para os testes feitos em animais.

A política declarada das instituições europeias, desde a implantação do *“Animal welfare guideline”* em 1986 por meio da Diretiva 86/609/EC, é de estimular e desenvolver o uso de métodos alternativos ao uso de animais. Nela fica estabelecido que *“uma experiência não poderá ser executada em animal se outro método cientificamente satisfatório, que não implique na utilização de um animal, seja razoável e praticamente possível”*. Vários esforços foram e têm sido efetuados para a busca de alternativas, com a criação de centros dedicados ao desenvolvimento e validação de métodos alternativos.

Em 1989 foi criado, na Alemanha, o *Zentralstelle zur ErfassungBewertung von Ersatz und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch – National Centre for Documentation and Evaluation of Alternative Methods to Animal Experiments (ZEBET)*. Em 1991 foi criado o *European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)* a partir da Diretiva 86/609/EC com objetivo de desenvolver e coordenar a validação de métodos alternativos ao uso de animais na Comunidade Europeia.

Em 1997 as agências governamentais dos Estados Unidos formaram o *Interagency Coordinating Center for the Validation of Alternative Methods (ICCVAM)*. O ICCVAM é composto por 15 agências regulatórias e de pesquisa, entre as quais se incluem a *Environmental Protection Agency (EPA)*, a *Food and Drug Administration (FDA)* e a *Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR)*, sendo que estas fornecem ou utilizam informações

dos testes toxicológicos para o processo de avaliação do risco. O Comitê coordena, por meio das agências, a discussão relativa ao desenvolvimento, validação, aceitação e harmonização nacional e internacional dos ensaios toxicológicos, por intermédio do governo federal dos Estados Unidos.

Da mesma forma, outros países estabeleceram centros de validação: em 2005, o governo japonês criou o *Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM)* e em 2012 foi estabelecido o Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM), fruto da cooperação entre o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (DOU, Seção 3, n. 13, p. 122, 18/01/2012).

Em 2003 a sétima emenda (2003/15/EC) da Diretriz de cosméticos (76/768/EEC) proibiu, nos países-membros da União Europeia, o teste de ingredientes de cosméticos, do produto final acabado em animais (*testing ban*) e proibiu a comercialização de produtos cosméticos acabados (ou seus ingredientes) que tenham sido testados em animais (*market ban*). O *testing ban* e o *market ban* estão em vigor desde 2009 e 2013, respectivamente.

De forma similar, a regulamentação de químicos (*Reach*) da Comissão Europeia, em vigor desde 2007, evita os testes em animais e prefere os testes alternativos *in vitro*. O propósito do *Reach* é registro, avaliação e autorização de químicos para sistematicamente avaliar os riscos para a saúde humana e ambiental de mais de 30.000 substâncias químicas que são produzidas ou importadas para a Comunidade Europeia em um volume de mais de uma tonelada por ano. No sentido de minimizar e racionalizar o uso de animais para estudos de toxicologia, o planejamento deve incluir a busca de informações relacionadas à molécula (pKa, pH, estrutura química, caracterização, etc.) que poderá determinar a indicação de vias de administração ou de exposição por meio de cálculos, eliminando a possibilidade de procedimentos desnecessários. Importante e relevante destaque vem sendo dado às análises *in silico* para identificação preliminar de moléculas não interessantes e evitar testes *in vivo* desnecessários.

Diante desse panorama regulatório, a União Europeia, com o intuito de aumentar o desenvolvimento de métodos alternativos, adotou a Diretiva 2010/63/EU que estabelece o ECVAM como laboratório de referência no âmbito da União, sendo este agora denominado *European Union Reference Laboratory ECVAM (UERL ECVAM)*, responsável por coordenar e promover o desenvolvimento de métodos alternativos. A partir também dessa Diretiva de 2010, os estados-membros foram convocados a contribuir para essa atividade crucial identificando e indicando laboratórios nacionais qualificados, garantindo a promoção de métodos alternativos no nível nacional.

A Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) – organização intergovernamental constituída de 34 países da América do Norte, Europa e Pacífico com objetivo de coordenar e harmonizar suas políticas, debater assuntos de interesses econômicos, sociais e ambientais, e colaborar para fazer frente aos problemas internacionais – desempenha um papel fundamental na harmonização dos métodos para classificação de substâncias químicas. As diretrizes de ensaios da OCDE são uma coleção de métodos de ensaio, internacionalmente aceitos, que são utilizados por laboratórios independentes, governos e indústrias para determinar a segurança dos produtos químicos e preparações químicas, incluindo agrotóxicos e produtos químicos industriais. Eles cobrem os testes para as propriedades físico-químicas de produtos químicos (seção 1), os efeitos ambientais (seção 2), degradação e acúmulo no meio ambiente (seção 3), efeitos na saúde humana (seção 4) e outras áreas (seção 5). De especial interesse, é na seção 4 que os métodos alternativos ao uso de animais são publicados (<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>).

No Brasil, a responsabilidade de monitorar e avaliar a introdução de técnicas alternativas que substituam a utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa é do Concea. Essa entidade é responsável por credenciar as instituições que utilizem animais em seus trabalhos, além de criar as normas brasileiras de produção e uso de animais. Em 2014 a Resolução Normativa nº 17 do Concea estabeleceu o processo de reconhecimento de métodos alternativos no Brasil e determinou o prazo para a substituição do uso de animais por métodos alternativos reconhecidos.

De forma complementar às leis nacionais, o Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) estabeleceu, por meio da Portaria nº 491 de 03 de julho de 2012, a Rede Nacional de Métodos Alternativos (Renama, <http://renama.org.br/>), que tem por objetivo:

- estimular a implantação de ensaios alternativos ao uso de animais por meio do auxílio e do treinamento técnico nas metodologias necessárias;
- monitorar periodicamente o desempenho dos laboratórios associados por meio de comparações interlaboratoriais;
- promover a qualidade dos ensaios mediante o desenvolvimento de materiais de referência, químicos e biológicos certificados, quando aplicável;
- incentivar a implementação do sistema de qualidade laboratorial e dos princípios das boas práticas de laboratório (BPL);
- contribuir para o desenvolvimento, a validação e a certificação de novos métodos alternativos ao uso de animais.

A Renama disponibilizará, por meio de uma rede de laboratórios associados, os métodos alternativos ao uso de animais validados e disponíveis na OCDE, observando os princípios de boas práticas de laboratório. Dessa forma, a Renama contribuirá para a garantia da qualidade dos serviços ofertados ao setor produtivo e para o aumento, natural, da sua competitividade internacional, uma vez que os métodos alternativos ao uso de animais representam muitas vezes barreiras técnicas à exportação (legislações europeias anteriormente comentadas).

Há um amplo escopo para a aplicação dos 3Rs (Substituição, Redução e Refinamento) no uso de animais em estudos toxicológicos. Cada vez mais, alternativas validadas à utilização de animais sencientes são utilizadas em testes de toxicidade e, nesse sentido, a validação de um método é definida como um processo pelo qual a confiabilidade e relevância de um procedimento são estabelecidas para um fim específico. Todavia, nas situações em que a finalidade é regulatória, deverão ser usados os delineamentos propostos nos guias internacionalmente aceitos para esse fim, uma vez que só estão disponibilizados aqueles que se consideram validados.

3 PLANEJAMENTO DE NOVOS PROJETOS

Esta seção fornece informações para auxiliar pesquisadores e docentes a decidirem se experimentos com animais são necessários para atingir os objetivos propostos. Quando o uso dos animais é justificado, existem informações para todas as etapas da condução da pesquisa ou atividade didática que os envolva. Entre elas destacam-se: a

escolha correta do animal, sua origem, a forma de seu transporte e o tipo de abrigo, alimentação e ambiente; o planejamento do experimento ou atividade didática; a previsão e minimização da dor e das repercussões negativas para a saúde do animal; o treinamento de pessoal e a publicação dos dados.

Pesquisadores e docentes são responsáveis ética e legalmente por garantir que os princípios dos 3Rs sejam utilizados em seus projetos de pesquisa ou atividades didáticas. Antes de desenvolver um projeto de pesquisa que empregue animais, o pesquisador deverá considerar:

- se o uso de animais proposto é justificado;
- o “estado da arte” (avaliar se projetos similares já foram realizados);
- se os objetivos do projeto podem ser alcançados por meio de métodos alternativos, tais como cultura de tecidos, modelos matemáticos, métodos *in silico*, etc.

Os pesquisadores e os docentes devem avaliar se os benefícios potenciais do conhecimento científico gerado se sobrepõem às consequências negativas decorrentes da manipulação do animal. As informações contidas nesta seção devem ser consideradas pelos pesquisadores e pelos docentes antes de submeterem uma proposta de uso de animais à Comissão de Ética no Uso de Animais (Ceua) pertinente. Os projetos devem considerar o menor número possível de animais (ou quantidade de tecido animal) que conduza ao máximo de informações cientificamente válidas e os métodos utilizados na manipulação devem minimizar o impacto negativo sobre os animais.

A colaboração entre pesquisadores (intra e interinstitucional) concorre para reduzir o número de animais ou para a quantidade de tecido animal necessária para conduzir um estudo ou responder a uma questão específica do projeto de pesquisa. Os pesquisadores podem também colaborar para o refinamento de metodologias, confeccionando, por exemplo, procedimentos operacionais padrão que visem ao incremento do bem-estar animal e manutenção dos padrões éticos em pesquisa.

Para projetos a serem conduzidos em mais de uma instituição, a Ceua de cada uma desta deverá analisar, aprovar e monitorar o componente do projeto a ser realizado em instalações sob sua responsabilidade.

Atividades científicas envolvendo animais devem resultar de um esforço colaborativo entre pesquisadores, especialistas em cuidado animal, equipe técnica, professores e alunos. Para esse fim, todos os que trabalham com animais em atividades de ensino ou pesquisa devem ter treinamento e suporte adequados e, dessa forma, cuidar e utilizar animais em obediência ao CONCEA.

Isso garantirá que:

- a dor e o desconforto nos animais serão mínimos;
- todo o pessoal envolvido possua o conhecimento e as habilidades necessárias ao uso de animais;
- a segurança pessoal daqueles que realizarão o estudo será mantida durante o manuseio do animal;
- os melhores resultados científicos serão atingidos.

O fornecimento de treinamento apropriado (específico de um determinado procedimento e espécie específica) antes do início de um projeto é responsabilidade da instituição. O treinamento deverá ser fornecido conforme a necessidade e deve incluir aspectos técnicos e éticos em relação ao monitoramento dos animais. Além disso, as instituições de pesquisa deverão garantir que haja pessoas suficientes e com as habilidades apropriadas para os cuidados dos animais.

3.1 Modelos Animais

Os seres vivos compartilham propriedades e características. A ideia de “estudar características comuns entre as espécies a fim de compreender a função das espécies” advém, no mínimo, da época da obra “*Historia Animalium*”, de Aristóteles, e sustenta o valor da medicina comparativa.

Descobertas fundamentais acerca da fisiologia e da fisiopatologia advieram de estudos comparativos utilizando animais. Nesse contexto, esses organismos constituem-se em modelos ou substitutos para estudos sobre os humanos ou outros animais.

Modelos animais podem ser utilizados para investigar a fisiologia celular, tecidual de estruturas e órgãos e permitem avaliar a integração de órgãos e sistemas com o organismo ou em uma estrutura similar. Ofertam a possibilidade de compreender mecanismos subjacentes a doenças.

Na medida em que o conceito de modelo animal se aplica a toda utilização de animais para fins científicos, então, de forma geral, os mesmos critérios devem ser aplicados para a seleção e validação de um modelo animal específico. Inicialmente, os pesquisadores devem definir os objetivos do projeto e determinar qual o nível do sistema biológico que é relevante para a sua condução. Por exemplo, seus estudos envolverão um tipo específico de célula, tecido, órgão ou a interação de órgãos? Tendo a percepção de qual é o sistema biológico envolvido, o pesquisador poderá, então, decidir a melhor espécie ou linhagem animal que representa mais adequadamente o sistema biológico a ser investigado. A opção por um determinado modelo animal deve ter consistência científica e não ser influenciada por conveniência ou orçamento.

3.1.1 Escolhendo o animal adequado

A correta escolha do modelo animal é fundamental para o sucesso de um projeto de pesquisa. Além disso, há de se considerar a variabilidade biológica que pode interferir na qualidade dos resultados ou no rigor do procedimento experimental em detectar efeitos de tratamentos. Com isso, a geração de dados cientificamente não válidos pode acarretar no aumento do número de animais necessários para manter um nível adequado de precisão. Por outro lado, a própria variabilidade biológica pode ser relevante para a pesquisa. Por causa disso, as razões para a escolha de uma determinada espécie devem estar claramente justificadas na proposta (ver Seção 4.4.1 da DBCA para informações sobre a seleção de animais apropriados).

Questões que devem ser consideradas na decisão do animal adequado:

- **Espécie:** garantir que a espécie seja a mais apropriada para o protocolo de pesquisa proposto.
- **Raça, linhagem e variabilidade genética:** existe variação biológica entre as raças das espécies animais. A variabilidade pode ser reduzida escolhendo apropriadamente o modelo animal.

- o A variabilidade genética pode reduzir a precisão dos resultados e dessa forma levar ao aumento no número de animais necessários. Outros aspectos importantes são a definição genética de espécies híbridas que é de difícil controle e a dificuldade na determinação da equivalência de colônias distintas de animais.
- o Linhagens isogênicas possuem um fenótipo mais uniforme do que heterogênicas, permitindo a melhor detecção de respostas ao tratamento, reduzindo o número de animais necessários.
- **Estado sanitário:** ter controle e conhecimento sobre o estado de saúde dos animais permite melhor compreensão dos efeitos e consequências específicas da manipulação. O fornecedor deve dar atestados sanitários que esclareçam ao pesquisador quanto ao estado sanitário dos animais com os quais ele irá trabalhar.
- **Comportamento:** garantir que o animal escolhido tenha comportamento adequado ao ambiente onde o estudo será desenvolvido. Os pesquisadores devem, sempre que possível, selecionar espécies domesticadas e animais habituados ou acostumados a humanos e ambientes antropizados.

3.1.2 Origem dos animais

A maior parte dos animais utilizados em atividades de ensino ou pesquisa é produzida especificamente para esse fim, principalmente os roedores. Por essa razão os animais de cativeiro, ao contrário de animais capturados em estado selvagem, devem ser prioritariamente utilizados. A aquisição de animais para utilização nos projetos de pesquisa ou procedimentos de ensino, quando houver no Brasil a produção da espécie/linhagem de escolha, só pode ser feita de instituições credenciadas no Concea. Nos casos da aquisição por meio de fornecedores eventuais, garantir que os animais a serem utilizados tenham qualidade condizente com os objetivos do estudo é responsabilidade do pesquisador principal e da Ceua de sua instituição.

É imprescindível que os pesquisadores definam a origem dos animais a serem utilizados nos projetos encaminhados às Ceuas.

3.1.3 Transporte dos animais

O transporte de animais é crítico devido aos vários riscos a que estão sujeitos. Problemas diferentes podem surgir, seja no transporte externo (de um estabelecimento para outro), seja no transporte interno (dentro das unidades, entre barreiras, diferentes salas). Os pesquisadores e docentes devem estar cientes das regulamentações específicas para o transporte de animais. A troca de informações claras entre a pessoa que despacha os animais e a que os recebe é vital para minimizar o tempo de permanência dos animais em trânsito. Atenção especial deve ser dada ao transporte de animais geneticamente modificados, que deve atender às exigências da Comissão Interna de Biossegurança e, quando necessário, da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança.

Alguns fatores que podem causar estresse aos animais são: o barulho excessivo, movimento das gaiolas de transporte e ambiente e pessoal estranhos. A extensão do estresse em um animal depende de sua espécie, sexo, idade, saúde, estágio de prenhez, número de animais viajando juntos e relações sociais. O desconforto dos animais é afetado pela duração e condição do ambiente durante o transporte e pela qualidade do cuidado dispensado ao longo da viagem.

As condições e agendamento de transporte devem ser planejados para levar em consideração extremos climáticos, necessidades específicas da espécie e contingências.

Para minimizar o desconforto durante o transporte, os pesquisadores e docentes devem:

- utilizar contêineres seguros, confortáveis e à prova de fuga;
- fornecer alimento e água adequados sempre que possível;
- garantir que todo o pessoal responsável pelo manuseio e transporte tenha capacitação para reconhecer sinais de desconforto e dor e que seja capaz de atuar para mitigar;
- assegurar que o tempo de transporte seja o mínimo possível.

3.1.4 Aclimação e quarentena

Animais são extremamente sensíveis ao novo, seja o ambiente ou alterações deste, outros animais ou pessoas e esses fatores devem ser sempre considerados. Introduzir animais em um novo local, com as respectivas mudanças em sua condição de vida e de grupos sociais, produz uma resposta estressante que, embora possa ser temporária, pode levar ao distresse. Portanto, é necessário que os animais passem por um período de aclimação antes que sejam utilizados em atividades de ensino ou pesquisa. Quanto à extensão desse período, depende da espécie animal e, portanto, devem ser observadas todas as suas exigências.

Durante o período de aclimação, os animais devem ser habituados ao manuseio e à presença das pessoas que trabalharão com eles. No caso de pesquisadores, esse período é importante para que se familiarizem com o comportamento normal dos animais. Indivíduos que não se aclimataram não deverão ser utilizados na pesquisa.

As áreas designadas para quarentena devem ser observadas com mais frequência, e todas as observações devem ser registradas para que problemas possam ser identificados e medidas possam ser tomadas para saná-los. O tempo de duração da quarentena deverá ser apropriado para que seja assegurada a saúde dos animais que ali estão e os seus congêneres já alojados na instalação.

3.1.5 Alojamento e manejo

As condições ambientais afetam a biologia e a qualidade de vida dos animais. Para reduzir a variação nas respostas decorrentes do ambiente, os animais devem ser mantidos em local seguro, apropriado e controlado.

Os alojamentos dos animais devem ser projetados, mantidos e manejados para atender às exigências da espécie. Necessidades comportamentais de cada espécie, incluindo a disponibilidade de espaço para permitir a livre movimentação e atividade, sono, privacidade, contato com outros da mesma espécie, enriquecimento ambiental, entre outras, devem ser levadas em consideração. Os pesquisadores devem tomar precauções para prevenir o acesso de pessoas não autorizadas, bem como ter planos de contingenciamento no caso de emergências, como falhas na ventilação, iluminação, aquecimento, refrigeração ou escape de indivíduos.

Se um animal apresentar um estado sanitário ou genético diferente de outros da mesma instalação, pode ser necessária a indicação de um local específico para ele. Exigências podem também ser direcionadas pelo estado reprodutivo do animal, necessidades da pesquisa ou experiência anterior.

Necessidades ambientais específicas para uma espécie, tais como iluminação, temperatura, qualidade do ar, ciclos apropriados de luz e proteção contra ruídos excessivos e vibrações, deverão ser atendidas. O acesso rápido ao alimento e à água e o fornecimento regular de acomodações limpas e livres de parasitas e patógenos também precisam ser considerados.

Animais possuem necessidades específicas de nutrientes nos diferentes estágios de suas vidas. Ao fornecerem dietas balanceadas e reconhecidas internacionalmente aos animais, os pesquisadores reduzem a variação dentro e entre estudos e assim evitam a necessidade de duplicação de experimentos, reduzem o número de animais necessários e melhoram a qualidade de sua pesquisa.

A qualidade da dieta também pode ser afetada pelas condições de armazenamento dos alimentos e pela frequência de fornecimento.

3.2 Biossegurança

A biossegurança deve ser entendida como elemento de grande importância e deve integrar-se rotineiramente em qualquer atividade de ensino ou pesquisa envolvendo animais, principalmente naqueles laboratórios onde os perigos (sejam químicos, físicos ou biológicos) sejam maiores. A biossegurança é o conjunto de ações voltadas para a prevenção, minimização ou eliminação de riscos inerentes às atividades de pesquisa, produção, ensino, desenvolvimento tecnológico e prestação de serviços, visando à saúde do homem, dos animais, do meio ambiente e à qualidade dos resultados. Biossegurança como condição de segurança deve ser alcançada por meio de um conjunto de ações destinadas a prevenir, controlar, reduzir ou eliminar riscos inerentes às atividades realizadas (DIRETRIZES GERAIS PARA O TRABALHO EM CONTENÇÃO COM AGENTES BIOLÓGICOS, 2010).

Os manuais de biossegurança tradicionalmente enfatizam o uso de boas práticas de laboratório (BPL), no sentido de *práticas laboratoriais seguras* (não confundir com a BPL relacionada à gestão da qualidade no laboratório), a utilização apropriada dos equipamentos de proteção, instalações bem planejadas e construídas e procedimentos que visam minimizar riscos de infecção ou acidentes involuntários para trabalhadores do laboratório, além de impedir a contaminação do ambiente externo.

No Brasil, a legislação vigente trata exclusivamente da biossegurança com organismo geneticamente modificado (OGM), entretanto, existem regras de atuação profissional para organismos comuns ou não geneticamente modificados. Deve-se obedecer às condições estabelecidas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), que atualmente define organismo como: toda entidade biológica capaz de reproduzir ou transferir material genético, inclusive vírus e outras classes que venham a ser conhecidas (Resolução Normativa Nº 2, de 27 de novembro de 2006). Por outro lado, os setores que manipulam OGMs ficam, também, obrigados por lei a requisitarem o Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) à CTNBio, conforme a Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005, além de atenderem rigorosamente às RN emanadas da CTNBio na sua área de atuação, sem o quê estarão trabalhando à margem da Lei. De grande relevância é a conscientização de que a espinha dorsal da prática da biossegurança são a avaliação de risco e as autoinspeções periódicas de biossegurança. Apesar das ferramentas disponíveis para ajudar nessa avaliação, o componente mais importante é o julgamento profissional. Portanto, tais avaliações devem ser executadas pelos indivíduos com experiência e conhecimento das características específicas dos organismos que são considerados para

uso. O domínio dos equipamentos laboratoriais, dos modelos animais e dos equipamentos de contenção que podem ser utilizados, bem como das instalações disponíveis, é fundamental.

3.2.1 Biossegurança em instalações animais

A biossegurança em instalações animais assume dimensão diferenciada de outras atividades uma vez que a presença dos animais agrava o risco biológico. A flora microbiana e parasitária, a produção de alérgenos e a agressão animal são capazes de causar danos à saúde ou à vida dos profissionais envolvidos nessa atividade. A produção constante de proteínas eliminadas pela urina, secreções e descamação da pele – que são encontradas em suspensão no ar ou depositadas nos materiais e equipamentos – tornam as instalações animais ambientes propícios para o desenvolvimento de reações alérgicas nos expostos. Fora isso, agressões animais podem causar ferimentos e determinar infecções. As instalações animais onde se realizam infecções experimentais assumem papel de maior importância tendo em vista os riscos potenciais e efetivos das atividades com agentes patogênicos de diferentes classes de risco. Os riscos específicos ficam, portanto, na dependência das espécies animais envolvidas e da natureza da atividade de ensino ou pesquisa realizada.

Quanto às medidas específicas de segurança com agentes perigosos, deve ser dada especial atenção aos procedimentos sobre cuidados e alojamento dos animais; armazenamento de agentes de risco e prevenção contra perigos causados por esses agentes; dosagem e administração de medicamentos; manuseio de tecidos e fluidos corporais; eliminação de excretas, cadáveres ou carcaças; e proteção pessoal. Exige-se o emprego de equipamento de segurança específico, bem como um manejo adequado, além de práticas laboratoriais seguras. Em suma, para uma segurança eficaz, é necessário pessoal treinado e que siga rigorosamente as normas de proteção contra riscos. Claro é que os indivíduos que lidam com animais em atividades de ensino ou pesquisa, em locais onde agentes infecciosos são utilizados, são expostos a riscos maiores de exposição devido à possibilidade de transmissão por mordidas, arranhões ou aerossóis. Todos os presentes nessas instalações devem utilizar (técnicos envolvidos diretamente no trabalho ou qualquer um presente nas instalações) equipamentos de proteção individual – EPI. Todas as instalações devem ser adequadas e credenciadas pelo órgão competente, quando for o caso. Logo, um programa eficiente de **saúde, biossegurança e ambiente** deve concentrar seus esforços para que os riscos inerentes ao uso de animais sejam reduzidos a níveis aceitáveis. Portanto, cada instalação animal deverá desenvolver ou adotar um manual de biossegurança ou de operações que identifique os riscos e que especifique as práticas e procedimentos para minimizar ou eliminar as exposições aos perigos.

3.3 Desenho da pesquisa científica

A pesquisa científica deve ser bem planejada e contar com um planejamento adequado (desenho da pesquisa).

O desenho deve estar associado a uma análise estatística de tal forma que se aproxime do menor número de animais necessários à obtenção de resultados válidos, evitando, por conseguinte, o uso em excesso ou insuficiente de modelos. Desenhos mal elaborados produzem resultados inconclusivos, conduzem à repetição do estudo e ao aumento no número de animais.

Os pesquisadores e as Ceuas devem garantir que os objetivos e as hipóteses estejam plenamente considerados e completos antes do início de qualquer atividade envolvendo animais.

3.3.1 Análise estatística¹

1 O Centro Nacional para a Substituição, Refinamento e Redução de Animais para Pesquisa (NC3Rs) é uma organização do Reino Unido que lidera a descoberta e a aplicação de novas tecnologias e estratégias para substituir, reduzir ou refinar o uso de animais para fins científicos (3Rs). Entre suas atividades, o NC3Rs desenvolveu um roteiro para auxiliar o delineamento experimental e análise estatística. A versão original e em inglês desse roteiro pode ser encontrada no seguinte endereço eletrônico: <http://www.nc3rs.org.uk/>.

Como ressaltado anteriormente, desenhos envolvendo animais devem garantir que resultados sejam estatisticamente válidos e obtidos com o menor número possível de indivíduos. Os pesquisadores devem, sempre que possível, buscar orientação do bioestatístico de sua instituição para a elaboração do projeto a fim de que saibam, antecipadamente, como os dados serão analisados.

Outro ponto que deve ser considerado ao desenhar uma pesquisa é o tamanho da amostra. Uma amostragem muito pequena não permitirá que o efeito estudado seja detectado com algum grau de confiabilidade. Entretanto, uma amostragem muito grande leva a um uso desnecessário de animais.

Pesquisas bem concebidas e analisadas corretamente podem levar a uma redução no uso de animais e aumentar a validade científica dos resultados. Uma pesquisa bem concebida deve ser:

IMPARCIAL

Quando dois ou mais grupos são comparados, os animais nos grupos devem estar em ambientes idênticos e serem semelhantes em todos os sentidos exceto pelos tratamentos aplicados. O viés pode ser minimizado por:

- alocação aleatória dos animais aos diferentes grupos (um processo físico é necessário, por exemplo, jogar uma moeda, a escolha de um número);
- assegurar que todos os procedimentos subsequentes (incluindo alojamento) sejam aplicados em uma ordem aleatória;
- garantir que os investigadores que analisam os resultados não tenham conhecimento do tratamento recebido (duplo-cego) até a análise estatística final.

PODER DE ANÁLISE ADEQUADO (ou seja, uso de animais suficientes)

Pesquisas robustas são aquelas que têm a oportunidade máxima de detectar um efeito verdadeiro do que se estuda. O poder de análise (robustez) é obtido por:

- Uso de um número adequado de animais (tamanho da amostra);
- Controle da variação intersujeito (por exemplo, usando a randomização).

O **tamanho da amostra** deve ser determinado utilizando um método formal, tal como poder de análise ou usando o método da equação de recursos (ver abaixo). Embora o poder de análise seja ampliado pelo aumento do tamanho da amostra, uma pesquisa desnecessariamente grande envolverá animais em excesso e desperdiçará recursos científicos.

Varição é controlada por meio da atribuição aleatória de animais de genótipos similares, de peso e idade similares, que tiveram um ambiente semelhante ao longo de suas vidas. Variação devido a ritmos circadianos ou flutuações no ambiente muitas vezes podem ser reduzidos em delineamento adequado, por meio de uso de bloco randomizado ou estudos do tipo quadrados latinos (*Latin Squares*).

O **erro de medição** deve ser minimizado por técnica cuidadosa e boa instrumentação, mantendo o pesquisador “às cegas” quanto à alocação de tratamento.

Análise do Poder: um método de análise do poder para comparar dois grupos, por exemplo, requer as seguintes informações:

- tipo de teste estatístico a ser utilizado (por exemplo, um teste t ou o teste do qui-quadrado para comparar duas proporções);
- nível de significância para ser utilizado (com frequência um nível de 5%);
- poder estatístico exigido (geralmente 80%-90%);
- lateralidade do teste (um teste de 2 lados é usual);
- tamanho do efeito de interesse biológico (ou seja, quanto de uma diferença no efeito biológico ou clínico é necessário detectar);
- estimativa do desvio padrão (quando se comparam as médias, deve vir de um estudo anterior).

O site StatPages.org oferece cálculos *on-line* de tamanho da amostra combinando os fatores acima.

A equação de recursos: $E = N$ (número de animais por tratamento x número de tratamentos) - T (número de tratamentos), onde N = o número total de sujeitos (por exemplo, animais individuais ou grupos / gaiolas de animais) e T = número de combinações de tratamento, E (o tamanho da amostra) deve ser de aproximadamente entre 10 e 20.

Por exemplo, uma pesquisa comparando quatro tratamentos, utilizando seis indivíduos por tratamento, terá $N = 24$ (6×4) e $T = 4$, então $E = 24 - 4 = 20$. Isso está dentro da faixa aceitável. No entanto, pode haver boas razões para ir acima desse limite superior. Se E for 30 ou 40, a pesquisa pode ser muito grande, possivelmente desperdiçando recursos. Essa equação é mais adequada para pequenas, não rotineiras e mais complexas experiências usando animais que provavelmente serão analisadas pelo método estatístico de variância (ANOVA).

TENHA UMA AMPLA FAIXA DE APLICABILIDADE

Muitas vezes é útil saber se resultados semelhantes são obtidos em machos e fêmeas, em diferentes linhagens, ou como resultado de dietas ou ambientes diferentes. Do mesmo modo, a resposta a um fármaco pode depender de um tratamento prévio, do efeito de outras drogas, ou da via de administração. Esses efeitos podem ser estudados de forma eficiente utilizando desenhos fatoriais.

Desenhos fatoriais: podem ser usados para investigar o efeito de uma droga tanto em machos quanto em fêmeas sem fazer duas experiências separadas ou utilizando o dobro de animais. Simplesmente, em cada um dos dois grupos a metade dos sujeitos são fêmeas e a outra metade machos. Um estudo fatorial com poder adequado mostrará se os dois sexos responderam da mesma forma, o que não é possível se os dois sexos forem usados em pesquisas diferentes.

SEJA SIMPLES E EFICIENTE

Pesquisas não devem ser complicadas a ponto de erros serem cometidos em sua execução, ou a análise estatística tornar-se excessivamente complicada. Estudos-piloto pequenos devem ser utilizados antes de iniciar um grande estudo

para assegurar que ele é logisticamente eficiente e para dar alguma indicação preliminar de resultados prováveis. Todas as pesquisas devem ser pré-planejadas e não podem ser alteradas enquanto estiverem em andamento.

INDIQUE A FAIXA DE CERTEZA

Cada pesquisa deve ser analisada estatisticamente de modo que os resultados possam ser utilizados para o planejamento futuro. Uma análise estatística adequada deve indicar a faixa de incerteza nos resultados, ou a medida de variação, normalmente indicada por níveis de significância ou intervalos de confiança.

3.3.2 Métodos utilizados

Antes de iniciar uma pesquisa, também é importante certificar-se de que os métodos utilizados foram planejados para garantir o bem-estar dos animais, e que as variáveis não controladas, o modelo escolhido e as condições de alojamento foram levados em consideração. Fatores estressantes não ligados ao estudo podem causar uma grande variação e afetar a precisão dos resultados. Outras variáveis, tais como ritmos circadianos, erros de coleta dos dados e a qualidade e validade dos reagentes, precisam ser ponderadas.

3.3.3 Após a coleta de dados

As etapas finais do estudo (publicação dos resultados) também devem ser consideradas no planejamento do projeto. A metodologia, os dados e suas análises devem ser acessíveis a outros pesquisadores e dessa forma podem contribuir para a redução e refinamento do uso de animais por outros grupos de pesquisa. Essa informação deve ser apresentada de forma clara, precisa e com detalhes suficientes para permitir que ela seja entendida e replicada, incluindo:

- os objetivos e hipóteses da pesquisa;
- os animais utilizados (ex.: espécies, linhagens, fontes, tipos, estado sanitário);
- condições de transporte e a duração do período de aclimação antes do início;
- condições do alojamento do animal, da alimentação e da água;
- os métodos estatísticos utilizados para analisar os dados obtidos.

3.4 Prevenção da dor e do distresse potencial

Todo protocolo de pesquisa deve descrever claramente os pontos finais humanitários (“*endpoints*”) que serão utilizados. Esses pontos finais devem ser adequados para a espécie utilizada no estudo e o monitoramento das condições deve ser feito para cada animal envolvido. Idealmente os objetivos científicos do projeto de pesquisa devem ser atingidos sem afetar negativamente o bem-estar animal. Entretanto, muitas vezes não é possível atingir os objetivos nessa condição, assim deve se considerar: os requisitos científicos do projeto; efeitos negativos previstos e/ou esperados sobre o bem-estar dos animais; cinética provável e progressão dos efeitos adversos; indicadores preditivos precoces de efeitos adversos atuais ou iminentes.

As fases de um projeto que podem ter impacto negativo sobre a qualidade de vida dos animais não são limitadas aos protocolos da pesquisa. Outras fontes potenciais de dor, estresse e distresse podem ser consideradas, tais

como captura, transporte, manuseio, contenção, alojamento, ambiente social e físico e manipulação genética. A prevenção de dor e distresse requer conhecimento do comportamento normal da espécie em questão e do que pode ser esperado se o protocolo utilizado causar efeitos adversos.

3.4.1 Estudos-piloto (CN3Rs - <http://www.nc3rs.org.uk/conducting-pilot-study>)

Estudos-piloto podem ser utilizados para determinar os efeitos do protocolo de pesquisa no bem-estar dos animais. Eles são valiosos no planejamento e gerenciamento do projeto de pesquisa, pois ajudam a refinar e a reduzir o impacto adverso nos indivíduos, antes que pesquisas empregando um grande número de animais sejam realizadas.

Os estudos-piloto devem ser considerados como integrantes de um projeto ou protocolo como um todo, especialmente para permitir a avaliação da viabilidade do projeto ou protocolo e a potencial inserção ao princípio dos 3Rs. Os estudos-piloto devem ser avaliados pela Ceua de acordo com os critérios normais aplicados à aprovação de estudos plenos. Os resultados do estudo-piloto devem ser considerados quando da análise pela Ceua do projeto pleno.

Estudo-piloto, ou de viabilidade, é um pequeno estudo destinado a testar a logística e reunir informações antes de um estudo mais amplo, a fim de melhorar a qualidade e eficiência deste último. Ele pode revelar deficiências na concepção de um projeto de pesquisa ou protocolo, que poderão ser resolvidas antes que animais, tempo e recursos sejam utilizados em vão. Uma boa estratégia de pesquisa requer um planejamento cuidadoso e o estudo-piloto, muitas vezes, é uma parte dessa estratégia.

Um estudo-piloto é normalmente pequeno em comparação com a pesquisa principal e, portanto, pode fornecer apenas informações limitadas sobre as fontes e magnitude da variação das medidas. É improvável, por exemplo, que um estudo-piloto isoladamente possa fornecer os dados adequados sobre a variabilidade e o poder da análise que determina o número de animais a serem incluídos em um estudo bem desenhado. Uma revisão sistemática da literatura, ou mesmo uma única publicação, pode ser uma fonte mais adequada de informações sobre a variabilidade.

• **Questões logísticas que podem ser reveladas por um estudo-piloto**

Um estudo-piloto pode identificar problemas logísticos. Como parte da estratégia de pesquisa os seguintes fatores podem ser resolvidos antes da pesquisa principal:

- verifique se as instruções dadas aos pesquisadores (por exemplo, procedimentos de randomização) são compreensíveis;
- verifique se os pesquisadores e técnicos estão suficientemente qualificados para a execução dos procedimentos;
- verifique o funcionamento dos equipamentos;
- verifique se o animal a ser incluído pode executar uma tarefa (física ou cognitiva);
- verifique a confiabilidade e validade dos resultados;
- detecte se alguma tarefa é muito difícil ou muito fácil, pois isso poderá enviesar ou distorcer resultados;

- avalie se o nível de intervenção é apropriado (por exemplo, a dose de uma droga);
- identifique os efeitos adversos (dor, sofrimento, angústia ou dano duradouro) causados pelo procedimento, bem como a eficácia das ações para mitigá-los (por exemplo, taxa de dose de analgesia e cronograma);
- defina antes os pontos finais humanitários.
- ***O que fazer com os dados / informações***

As informações obtidas sobre as questões logísticas devem ser incorporadas ao desenho da pesquisa principal. Como o objetivo de um estudo-piloto é avaliar a viabilidade de um estudo, é muito raro apresentar mais que um resumo dos dados estatísticos. Na verdade, os dados podem ser irrelevantes se problemas com os métodos forem descobertos.

Se um estudo-piloto não leva a modificações de métodos ou procedimentos, os resultados dele podem ser incorporados na pesquisa principal. A estratégia de amostragem utilizada para selecionar os animais e a possibilidade de mudanças ao longo do tempo devem ser cuidadosamente consideradas antes de incorporar dados do estudo-piloto. Mesmo que os dados do estudo-piloto não sejam utilizados desse modo e, mesmo que o desenho final seja muito diferente do piloto, é útil incluir informação sobre o estudo-piloto em quaisquer publicações ou relatórios provenientes da pesquisa principal, uma vez que pode contribuir para o desenho em estudos futuros.

Pode ser necessário levar a cabo um segundo estudo-piloto para avaliar a pesquisa principal ou, em alguns casos, o estudo principal pode ter que ser abandonado.

3.4.2 Testes toxicológicos

A toxicologia, segundo consenso entre as sociedades mundiais, é o estudo dos efeitos adversos de agentes químicos, físicos ou biológicos sobre organismos vivos e sobre o ecossistema, incluindo a prevenção e ou minimização desses efeitos.

Testes toxicológicos podem identificar potenciais efeitos adversos à saúde ou demonstrar a segurança de novas substâncias químicas e novos produtos, fornecendo assim a base para a salvaguarda da saúde de animais não humanos, humanos e do ambiente; esses testes são importantes para a análise de risco. Testes ecotoxicológicos podem ser exigidos pela legislação para caracterizar perigos e para avaliação de risco ambiental tanto pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) quanto pelos ministérios responsáveis pelo registro de novas moléculas para variados fins.

Autoridades reguladoras nacionais e internacionais necessitam equilibrar as preocupações entre o bem-estar animal e a necessidade de obter informações toxicológicas. A toxicologia é um campo cada vez mais harmonizado internacionalmente e considera uma vasta gama de organizações preocupadas com o desenvolvimento e validação de testes alternativos.

Para que os estudos de segurança e risco de novos produtos para o meio ambiente, animais não humanos e para os humanos sejam considerados por agências regulatórias, é necessário que guias nacionais e os internacionalmente aceitos sejam seguidos, bem como suas recomendações. Com relação às atividades de ensino ou de pesquisa,

recomenda-se que esses mesmos guias sejam seguidos sempre que possível, pois consideram os aspectos éticos, a redução do número de animais e o refinamento das técnicas.

METODOLOGIAS ADOTADAS PARA AVALIAÇÃO DO RISCO TOXICOLÓGICO

Vários protocolos internacionalmente aceitos estão disponíveis para uso em estudos toxicológicos baseados no conceito dos métodos alternativos (http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam - acessado em 14/08/2014) e alguns exemplos estão listados a seguir:

- **toxicidade aguda** – Estudo da toxicidade produzida por uma substância teste quando administrada uma ou mais vezes em um período que não exceda 24 horas;
- **toxicidade subaguda** – Estudo da toxicidade produzida por uma substância teste quando administrada diariamente durante período não superior a um mês; os protocolos internacionais usualmente abrangem período que pode variar entre 14 ou 28 dias;
- **toxicidade subcrônica** – Estudo da toxicidade em que a substância teste é administrada diariamente por, pelo menos, 90 dias;
- **toxicidade crônica** – Estudo da toxicidade em que a substância teste é administrada diariamente por pelo menos seis meses, com exigências variáveis para diferentes espécies e para as diferentes necessidades investigativas;
- **irritação** – Avaliação de risco irritativo induzido por substâncias, nos olhos, pele e mucosas;
- **carcinogenicidade** – Avaliação do potencial de uma substância para causar o aparecimento de neoplasias malignas. Esses estudos são de longa duração, prolongando-se por quase toda a vida do animal (roedores) e, diante dessa situação, recomenda-se que sejam desenvolvidos somente em instalações animais com condições sanitárias e estruturais capazes de manter a vida desses animais por longos períodos, sem interferências, a não ser aquelas previstas no protocolo aprovado pela Ceua da instituição. Existem substâncias carcinogênicas genotóxicas e outras não genotóxicas;
- **genotoxicidade** – Estudos que avaliam a habilidade de uma substância para induzir alterações no material genético (DNA, RNA, nucleotídeos, cromossomas). De acordo com o tipo de dano causado ao material genético, as substâncias são classificadas como: mutagênicas, clastogênicas ou aneugênicas;
- **reprodução** – Estudos que visam a determinação do potencial de uma substância para causar desenvolvimento anormal no período pré-natal, incluindo-se os estudos de uma ou duas gerações sequenciais. Sempre que possível deve-se optar pelos protocolos de uma geração com extensão de observações, no intuito de diminuir o número de animais incluídos nos estudos. A teratologia é uma das partes dos estudos da reprodução, que visa a determinação do potencial de uma substância para causar desenvolvimento pré-natal anormal, produzindo anomalias congênitas;
- **estudos ecotoxicológicos** – Avaliam o risco e a segurança de substâncias para o ecossistema.

PLANEJAMENTO DE PROTOCOLOS COM TESTES TOXICOLÓGICOS

Durante o planejamento de protocolos com testes toxicológicos é essencial observar as exigências regulatórias especificadas pelas autoridades nacionais e pelas internacionais e que estão descritas nos documentos regulatórios. Estas incluem os tipos de teste, espécies-alvo, via de administração e parâmetros estatísticos de forma a se obter o máximo de informações com o mínimo de envolvimento animal e resultados aplicáveis e seguros.

O racional para estudos que visam a determinação do risco e da segurança de novas moléculas inclui o seguinte: estudos de genotoxicidade, estudo da toxicidade aguda (em substituição ao cálculo da DL50, banido pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico em 2001), estudos de toxicidade em doses repetidas (duas espécies, uma roedora e uma não roedora), estudos de toxicidade para a reprodução e para novos fármacos, adicionalmente, estudos de segurança farmacológica específicos. Os protocolos para conhecimento do potencial irritativo ou corrosivo para olhos, pele e mucosas devem ter sua aplicabilidade avaliada caso a caso, uma vez que se o dano é presumido, tornam-se desnecessários para substâncias ou formulações nas quais propriedades químicas ou físicas sugerem que essa forma de toxicidade é provável, por exemplo, pH acima de 11,5 ou abaixo de 2.

Ainda no sentido de minimizar e racionalizar o uso de animais para estudos de toxicologia, o planejamento deve incluir a busca de informações relacionadas à molécula (pKa, pH, estrutura química, caracterização, etc.) que poderá determinar por meio de cálculos, por exemplo, a indicação de vias de administração ou de exposição, eliminando a possibilidade de procedimentos desnecessários.

3.4.3 Graus de invasividade

A finalidade dos graus de invasividade é alertar os pesquisadores, as Ceuas e a todos os envolvidos com os cuidados dos animais sobre o risco de dor ou distresse a que os animais serão submetidos durante a execução dos protocolos.

Os graus de invasividade orientam os pesquisadores, médicos veterinários, técnicos e membros das Ceuas a darem atenção especial aos protocolos que poderão causar dor ou distresse aos animais.

Essa classificação é contida na DBCA (RN nº 12 do Concea) e se baseia em uma aproximação preventiva segundo o nível potencial de dor e distresse que os animais possam sentir.

Graus de Invasividade:

G1 = Experimentos que causam pouco ou nenhum desconforto ou estresse (*ex.: observação e exame físico; administração oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, ou intramuscular de substâncias que não causem reações adversas perceptíveis; coleta de sangue; eutanásia por métodos aprovados após anestesia ou sedação; privação alimentar ou hídrica por períodos equivalentes à privação na natureza*).

G2 = Experimentos que causam estresse, desconforto ou dor, de leve intensidade (*ex.: procedimentos cirúrgicos menores, como biópsias, sob anestesia; períodos breves de contenção e imobilidade em animais conscientes; privação alimentar ou hídrica breve, em períodos maiores do que a abstinência na natureza; exposição a níveis não letais de compostos químicos que não causem reações adversas graves*).

G3 = Experimentos que causam estresse, desconforto ou dor de intensidade intermediária (*ex.: procedimentos cirúrgicos invasivos conduzidos em animais anestesiados; imobilidade física por várias horas; indução de estresse por separação materna ou exposição a agressor; exposição a estímulos aversivos inescapáveis; exposição a choques localizados de intensidade leve; exposição a níveis de radiação e compostos químicos que provoquem prejuízo duradouro da função sensorial e motora; administração de agentes químicos por vias como a intracardíaca e intracerebral*).

G4 = Experimentos que causam dor de alta intensidade (*ex.: métodos não aprovados de eutanásia que provoquem dor; Indução de trauma ou queimaduras a animais não sedados; administração de agentes químicos paralisantes em animais não sedados, protocolos onde a morte é o ponto-final, quando os animais sofrerem dor ou distresse que não podem ser aliviados*).

Atenção especial deverá ser dada à criação de animais geneticamente modificados que sofrem dor ou distresse como consequência da alteração genética. Devemos, nesse caso, classificar corretamente o grau de invasividade para poder atender às necessidades de cuidados especiais desses animais.

3.5 Desenvolvimento de estratégias para avaliar, minimizar e monitorar dor ou distresse

Para cada projeto de pesquisa, o desenvolvimento de uma estratégia para avaliar, minimizar e monitorar a dor e o distresse requer decisões a respeito de:

- sinais clínicos ou observações a serem utilizadas para avaliar o bem-estar de um animal ou sua condição clínica durante o curso do projeto;
- sinais clínicos ou a combinação de sinais clínicos que indicarão que uma intervenção (incluindo eutanásia) é necessária;
- ações a serem tomadas se um problema for detectado;
- frequência de monitoramento;
- pessoal que conduzirá o monitoramento e seu treinamento;
- sistema para registro das observações.

Todos os aspectos de uso e manejo dos animais, incluindo a manipulação e alojamento, que possam impactar negativamente na qualidade de vida dos animais, bem como a estratégia para que esse impacto seja minimizado, devem estar descritos na proposta enviada à Ceua, que deverá avaliá-los cuidadosamente.

A complexidade da resposta de um animal a estressores torna difícil guiar-se por apenas uma simples medida como indicador de dor ou distresse. Além disso, devido ao fato de os animais não poderem comunicar suas experiências diretamente aos humanos, sua dor e distresse somente podem ser avaliados por observação de seu comportamento e fisiologia. O desafio é medir ou avaliar esses sinais e determinar quando uma resposta ao estresse se desenvolve a ponto de resultar em um efeito nocivo sobre o seu bem-estar e levá-lo ao distresse.

Para minimizar a dor e distresse, estratégias práticas deverão ser desenvolvidas possibilitando prever, monitorar e avaliar esses estados.

Elementos importantes de tais estratégias incluem:

- relevância de critérios para cada espécie de animal utilizada em um projeto de pesquisa;
- relevância de critérios para os tipos específicos de projetos de pesquisa realizados;
- documentação dos critérios a serem utilizados para o monitoramento do bem-estar dos animais;
- documentação dos critérios que indicam quando uma intervenção (incluindo eutanásia) ocorrerá;
- uma abordagem flexível capaz de lidar com as mudanças inevitáveis e eventos inesperados durante o curso de um projeto;
- boa comunicação, cooperação e respeito entre todas as partes, para garantir que os problemas sejam detectados e gerenciados rápida e efetivamente;
- uma vez identificadas todas as fontes potenciais de dor e distresse associadas a um projeto específico, os responsáveis pelo projeto devem determinar os sinais que indicarão se o bem-estar de um animal foi comprometido; os preditores mais significativos de uma piora na condição do animal; e o momento provável do início das alterações previstas.

Baseado nessas avaliações, uma estratégia de monitoramento deve ser desenvolvida para o estudo, incluindo descrição sobre os sinais relevantes, frequência de monitoramento, momento de intervenção e pontos-finais humanitários.

3.5.1 Avaliação do impacto de efeitos adversos sobre o bem-estar

Para que os efeitos adversos sobre o animal possam ser previstos e avaliados, é imprescindível que o observador esteja familiarizado com as características normais e anormais de cada uma das espécies utilizadas em seu estudo bem como seu comportamento.

A definição de “normal” para uma espécie animal pode variar de acordo com o alojamento ou condições do ambiente, a presença ou ausência de humanos e outros estímulos. Tal definição também pode variar entre linhagens ou raças dentro da mesma espécie, e mesmo entre indivíduos dentro de uma linhagem ou raça.

Durante o período de aclimação, os pesquisadores e tratadores de animais devem se familiarizar com a variação “normal” de comportamento de um animal específico ou grupo de animais. Avaliações por meio de marcadores fisiológicos, bioquímicos e neuroendocrinológicos também podem ser feitos durante esse período para estabelecer valores de referência.

3.5.2 Definição de sinais apropriados ou critérios de monitoramento

Os sinais ou observações clínicas a serem utilizados para avaliar a condição de um animal devem ser definidos. Eles geralmente incluem sinais de doença ou anormalidade e sinais específicos associados ao procedimento realizado.

Para que sinais clínicos apropriados possam ser selecionados, é imprescindível que os pesquisadores conheçam as características normais da espécie e linhagem que utilizará. Durante o período de aclimação, os pesquisadores devem se familiarizar com o comportamento normal de um animal específico ou grupo de animais na situação da pesquisa. Níveis normais de padrões fisiológicos como frequência respiratória, frequência cardíaca, temperatura do corpo e marcadores bioquímicos ou hormonais podem também ser estabelecidos durante esse período.

A frequência de observações deve ser tal que áreas de preocupação e problemas potenciais possam ser detectados em um estágio inicial e, portanto, a dor e perturbação do animal possam ser aliviadas o mais precocemente possível, antes que se tornem severas demais. Se um animal estiver em um período potencialmente crítico, a frequência de observação deve aumentar. Por exemplo, em algumas infecções experimentais, observações de hora em hora podem ser necessárias para identificar o ponto no qual um desfecho selecionado foi atingido e a dor ou perturbação do animal deve ser interrompida.

3.5.3 Sinais gerais de alteração do comportamento normal

Os sinais de alteração no comportamento normal do animal devem ser identificados. Conforme destacado acima, indícios de dor e distresse variam não somente com a espécie, mas também entre linhagens ou raças dentro da mesma espécie, ou até entre indivíduos dentro de uma mesma linhagem ou raça. Sinais mais comuns para uma boa triagem podem ser:

- mudanças na aparência física (ex.: ferimentos, postura, textura do pelo, pelo sujo de urina ou fezes);
- mudanças no peso corporal e outras relacionadas ao consumo de alimento e água;
- mudanças de padrões fisiológicos (ex.: frequência de respiração, frequência cardíaca, temperatura corporal);
- mudanças no comportamento normal (ex.: inatividade, automutilação, comportamento compulsivo, movimentos repetitivos ou estereotipados);
- mudanças nas respostas a estímulos (ex.: agressividade, excitabilidade).

Indicadores comportamentais de dor aguda podem incluir vocalização, aparência anormal, alteração na postura e no modo de andar e também isolamento.

É importante saber que, devido a muitos animais não exibirem imediatamente sinais de dor ou distresse, diversos critérios utilizados para seu monitoramento são indicadores de efeitos adversos mais significativos, e não apenas dor ou distresse suaves ou moderados. Além disso, em muitas espécies-presa como o rato ou camundongo, sinais de dor ou distresse podem ser temporários e intercalados com comportamento normal.

3.5.4 Sinais específicos de alteração do comportamento normal

Sinais de alteração no comportamento normal relativos a um procedimento específico necessitam ser identificados em cada caso. Tanto as consequências desejadas de um determinado protocolo quanto quaisquer complicações potenciais indesejadas necessitam ser consideradas e identificadas. Em ambas as situações, sinais específicos que sugiram o início e progresso desses efeitos adversos devem ser identificados. Por exemplo: em um modelo animal de falência renal crônica, marcadores bioquímicos de função renal seriam utilizados para reconhecer o início e avanço da doença, com marcadores clínicos de polidipsia, poliúria e perda de peso. Após

cirurgia abdominal, peritonite é uma complicação possível, cujos sinais incluem febre ou vocalização como reação à palpação abdominal.

Quando os riscos de complicações de um procedimento não são conhecidos ou os sinais e duração dos efeitos em uma determinada espécie não são bem definidos, um estudo-piloto deve ser conduzido. Os dados identificarão os sinais dos efeitos pretendidos e o risco de complicações, além de ajudar no desenvolvimento de estratégias de refinamento do procedimento. Outras fontes de informação nessas situações são resultados já publicados com protocolos semelhantes, e a experiência de outros pesquisadores, veterinários e técnicos. Nesses casos, o uso do conhecimento e da experiência humana para dor e desconforto também pode ser útil na avaliação desses elementos nos animais. Em outras palavras, deve-se perguntar o que o homem sentiria se fosse submetido ao mesmo procedimento (ou quando ele vivencia uma condição clínica igual). Essa estratégia auxilia na compreensão da importância de critérios de monitoramento.

3.5.5 Pontos-finais humanitários (*endpoints*)

Protocolos de pesquisa com pontos-finais cientificamente justificáveis podem levar a alterações significativas no bem-estar animal apesar da adoção de práticas de prevenção de dor e distresse e estratégias de monitoramento adequadas. Portanto, todo protocolo de pesquisa deve considerar a possibilidade de adoção de pontos-finais humanitários. O encerramento de um estudo ocorre quando os objetivos científicos foram alcançados. Já o ponto-final humanitário é o momento no qual o encerramento é antecipado para que a dor, desconforto ou o distresse do animal sejam evitados, aliviados ou finalizados.

Ponto-final humanitário é o momento no qual a dor, desconforto ou distresse de um animal utilizado em atividade de ensino ou pesquisa é evitado, terminado, minimizado ou reduzido por ações como: i) adoção de tratamento para aliviar a dor, o desconforto ou o distresse; ii) interrupção de um procedimento doloroso; iii) exclusão do animal do estudo; ou iv) morte humanitária do animal.

Um ponto-final humanitário deve permitir o alcance dos objetivos científicos do protocolo de pesquisa e ao mesmo tempo minimizar o sofrimento animal. Todo projeto de pesquisa deve conter as descrições de pontos-finais apropriados para a espécie animal e procedimentos em uso.

Em protocolos que envolvem morte como desfecho provável, a escolha de um ponto-final humanitário adequado é ainda mais importante para abreviar o sofrimento de animais que progredirão inexoravelmente para a morte. O uso de pontos-finais humanitários contribui para o refinamento provendo uma alternativa aos pontos-finais no caso de dor ou distresse grave nos animais.

O pesquisador que tem conhecimento preciso, tanto dos objetivos do estudo como do modelo proposto, deve identificar, explicar e incluir no protocolo de estudo um ponto-final que seja consistente tanto do ponto de vista científico quanto humanitário. Quando estudos novos forem propostos é interessante a realização de estudo-piloto para avaliar a dor e o distresse que podem ocorrer durante o estudo.

Os pontos-finais devem ser objetivos e baseados em evidências a fim de:

- limitar sofrimentos que não tenham sido previstos;
- evitar a antecipação da morte desnecessária de animais cujo bem-estar está menos comprometido do que se crê ou antes que o objetivo científico tenha se completado;

- informar sobre o índice de severidade do procedimento;
- avaliar melhoramentos potenciais.

Ao reconhecer o ponto-final humanitário, as seguintes ações devem ser tomadas:

- o animal deixa de ser um sujeito experimental;
- ajustar o protocolo para reduzir ou remover a causa do efeito adverso e com isso permitir que o animal se recupere;
- administrar tratamentos sintomáticos ou de suporte;
- morte humanitária do animal.

Deve-se destacar que não pode haver demora entre reconhecer e agir; o bem-estar animal não é protegido por sistemas nos quais as decisões e as ações exijam longos comunicados ou burocracia demorada.

3.5.6 Procedimentos em casos de presença de sinais de comprometimento do bem-estar

Em quaisquer circunstâncias onde a experiência de dor ou desconforto for eticamente justificada como parte do estudo, sendo esses elementos reais ou potenciais, eles deverão ser minimizados ou aliviados.

A intervenção será necessária para aliviar e monitorar complicações, sejam elas previstas ou não. Quando previstas, um plano para lidar eficazmente com tal evento deve ser desenvolvido antes do início do estudo. Ao longo do curso do estudo, a frequência e tipo de complicações devem ser monitorados e estar sujeitos a uma revisão contínua e a uma investigação detalhada, visando minimizar complicações indesejadas.

Em muitos casos, pode ser possível aliviar a dor ou desconforto sem comprometer os resultados científicos. Estratégias específicas deverão ser adotadas em cada projeto, e podem incluir um aumento na frequência de monitoramento relacionado ao início ou alteração de sintomas, provisão de terapia de apoio como fluidos, uso estratégico de analgésicos ou condições de alojamento específicas.

Ações a serem tomadas quando um sinal específico ou combinação de sinais é observado em um animal devem ser definidas. A depender da gravidade do sinal, tais ações ou intervenções poderão incluir:

- promover o conforto do animal fornecendo tratamentos de apoio (ex.: calor, higiene, fluidos, nutrição e necessidades sociais);
- aumentar a frequência de acompanhamento/observação;
- consultar um médico veterinário com experiência apropriada;
- administrar um tratamento específico (ex.: um agente analgésico);
- submeter o animal à morte humanitária.

Os pesquisadores precisam agir prontamente para aliviar a dor ou sofrimento, o que pode determinar a continuação ou interrupção do projeto.

3.5.7 Treinamento

Todas as pessoas responsáveis por fazer as observações dos animais devem ser competentes na avaliação da fisiologia, do comportamento e da condição geral, utilizando como referência o padrão normal dessas variáveis, bem como conhecer as alterações específicas esperadas. A instituição, o grupo de pesquisa e a Ceua institucional, que autorizou o estudo, são responsáveis por garantir que o pessoal envolvido com o monitoramento dos animais seja capacitado. O treinamento deve ser fornecido conforme necessário e deve englobar não apenas técnicas, mas também as responsabilidades dos pesquisadores em monitorar os animais. A preparação das equipes deve incorporar a avaliação do local de trabalho com treinamento extra e continuado, conforme necessário.

3.5.8 Abordagem em equipe

Estratégias de monitoramento devem ser realizadas com a colaboração de todos os envolvidos na supervisão dos animais utilizados no projeto de pesquisa e de todas as pessoas com experiência relevante com a espécie a ser utilizada e os procedimentos que serão realizados. Essa abordagem em equipe deve, quando possível, incluir os pesquisadores, estudantes, veterinários e técnicos. A experiência de participar da criação de estratégias de monitoramento pode ser muito útil no treinamento e formação dos alunos.

3.5.9 Documentação da Estratégia de monitoramento

A documentação precisa da estratégia de monitoramento garante que todas as pessoas envolvidas com o cuidado dos animais estejam cientes dos fundamentos que determinam a presença e severidade da dor e da perturbação. Isso facilita:

- a avaliação de um animal à medida que sua condição clínica muda;
- a determinação se o momento de intervenção foi observado;
- a revisão da eficácia da estratégia de monitoramento enquanto o projeto prossegue.

3.5.10 Checklist de monitoramento

Um *checklist* de monitoramento deve incluir os seguintes elementos:

- sinais gerais de anormalidade para a espécie, linhagem ou indivíduo;
- sinais específicos de problemas que podem surgir do procedimento realizado;
- documentação de pontos nos quais algum tipo de intervenção é necessária;
- documentação de desfechos nos quais a morte humanitária é necessária;
- fornecimento de detalhes de qualquer tratamento dado, para que sua eficácia seja avaliada.

Outros fatores que podem ser incluídos são detalhes de qualquer necessidade de cuidados especiais e identificação de qualquer amostra a ser colhida de um animal caso a morte se faça necessária quando os responsáveis pela coleta não estão presentes.

As descrições dos critérios de monitoramento devem ser formuladas de forma que um sinal “negativo” seja utilizado para indicar “sem problemas” e um sinal “positivo” seja utilizado para indicar que pode haver um problema real ou potencial segundo observado pelo comportamento ou com a clínica. Por exemplo, o termo “isolamento” deve ser empregado no lugar de “interação social”, e “respiração difícil” no lugar de “padrão respiratório”.

A inclusão de um campo nenhuma anormalidade detectada (NAD) no *checklist* deve ser considerada. Esse campo poderia ser utilizado por uma pessoa experiente com pouca dificuldade de avaliar se um animal ou grupo de animais não estão bem. Se um animal não estiver bem, o *checklist* detalhado deve então ser utilizado para fazer um julgamento sobre as ações a serem tomadas. O pesquisador principal do projeto deve garantir que não haja uso indevido do campo NAD por pessoas inexperientes.

3.5.11 Especificidade de um *checklist* de monitoramento

Idealmente, um *checklist* de monitoramento deve ser elaborado especificamente para cada espécie e para cada procedimento. Critérios de monitoramento diferirão de acordo com o tipo de protocolo de pesquisa, bem como entre espécies e indivíduos. Para alguns projetos, vários *checklists* de monitoramento diferentes podem ser necessários para cobrir diferentes fases do trabalho. Um *checklist* de monitoramento deve ser relevante ao procedimento. Por exemplo, um *checklist* genérico para camundongos pode ser utilizado como ponto inicial, mas não deve ser necessariamente usado para todos os projetos que utilizam camundongos.

Checklists simples podem ser desenvolvidos para uso durante períodos do projeto em que o bem-estar dos animais seja uma preocupação menor. Por exemplo, durante o período de aclimatação ou quando um animal já está recuperado de um determinado procedimento. Um *checklist* simples pode incorporar um campo NAD, enquanto o *checklist* de monitoramento mais detalhado seria utilizado se alguma anormalidade fosse detectada.

3.5.12 Envolvendo a Comissão de Ética no Uso de Animais (Ceua)

A estratégia de monitoramento deve fazer parte da proposta enviada à Ceua. A Ceua pode interferir na revisão dos critérios de monitoramento e pontos de intervenção mediante consulta ao proponente. Dessa forma, todos os critérios para monitoramento e ações subsequentes são acordados e documentados antes do início do projeto. A Ceua deve também envidar esforços para que todos os pesquisadores possuam a experiência ou treinamento apropriados para implementar a estratégia de monitoramento de forma efetiva.

3.6 Treinamento de pessoal

Um importante fator de contribuição para obtenção de bons resultados no cuidado e utilização de animais é a qualidade da capacitação e o comprometimento dos membros da equipe com o trabalho desenvolvido. As pessoas devem ser capacitadas para oferecer cuidado minucioso na manutenção de animais. Devem estar cientes de que a qualidade de suas ações interfere no bem-estar dos animais ou nos resultados de atividades de ensino ou pesquisa.

Pesquisadores, professores ou usuários de animais devem ter treinamento e experiência nos procedimentos que realizam. O conhecimento dos preceitos éticos da utilização de animais também deve ser cobrado de todos os membros da equipe. O treinamento, programas educacionais, capacitação técnica e seminários para todo o pessoal envolvido no uso de animais em atividades de ensino ou pesquisa são de responsabilidade da instituição.

4 OBTENÇÃO DE APROVAÇÃO PARA NOVOS PROTOCOLOS DE PESQUISA

Este capítulo define o propósito e as responsabilidades das Comissões de Ética para uso de animais (Ceuas), e o que deve ser considerado ao submeter um protocolo de pesquisa a uma Ceua.

4.1 Comissões de Ética no uso de animais

- É responsabilidade da Ceua, no âmbito de suas atribuições, cumprir e fazer cumprir o disposto na Lei 11.794/08 e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais;
- Todos os estudos que utilizam animais vertebrados não humanos devem ser aprovados e monitorados pela Ceua da instituição que manterá os animais durante a condução do projeto de pesquisa ou procedimento de ensino, sendo esta credenciada no Concea. A Ceua da instituição deve garantir que o uso de animais esteja em conformidade com a Lei 11.794/08 e os seus dispositivos infralegais e sempre que se fizer necessário justificar a aplicação dos conceitos 3Rs (*“Reduction, Refinement and Replacement”*) redução, refinamento e substituição. Quando uma atividade for conduzida a campo, ou seja, fora das instalações institucionais, a responsabilidade de aprovar e acompanhar o projeto será da Ceua da instituição a qual o pesquisador principal pertence, sendo que esta instituição deverá estar credenciada no Concea. Quando aplicável, a Ceua responsável pela aprovação e acompanhamento do projeto será a do patrocinador do estudo que também deverá estar credenciado no Concea.

4.2 Submetendo uma proposta à Ceua

Antes de submeter uma proposta à Ceua, os pesquisadores devem considerar as questões a seguir:

4.2.1 Antes de escrever seu projeto o pesquisador deve perguntar-se:

- O uso de animais é necessário?
- Existem alternativas ao uso dos animais? Se existem, citar quais e por que não vai empregá-las.
- O estudo foi planejado para produzir resultados válidos?
- É necessário um estudo-piloto?
- As espécies ou animais foram selecionados de forma apropriada?

- Há instalações, equipamentos e condições do ambiente adequadas e disponíveis?
- Todo o pessoal envolvido está adequadamente treinado? Tem algum conhecimento sobre a biologia e o comportamento da espécie que vai usar?
- Procurou utilizar o menor número possível de animais?
- Há estratégias para minimizar e monitorar a dor e o distresse?

4.2.2 Se for usar animais, os seguintes dados deverão constar na proposta de estudo:

- Espécie e linhagem dos animais/*inbred* ou *outbred*/idade ou peso/sexo;
- Fonte de obtenção dos mesmos;
- Período de adaptação;
- Alojamento durante a execução da pesquisa: tipo de gaiola, tipo de cama, número de animais por gaiola, ambiente (temperatura, umidade, etc.);
- Se tomar providências para melhorar o ambiente dos animais, especificar quais;
- Alimentação: tipo e composição, esquema de alimentação e de água.

4.2.3 Quando do procedimento: método

A descrição dos procedimentos dependerá do propósito da pesquisa. Contudo, algumas informações serão sempre necessárias:

- número de animais, espécie, sexo e idade;
- proveniência dos animais e qualquer tratamento prévio;
- esquema dos procedimentos, tais como hora em que serão realizados, intervalos de tomada de amostras e descrição genérica dos equipamentos utilizados. Em procedimentos dolorosos, indicar quais medidas serão adotadas para evitar ou reduzir a dor ou o sofrimento;
- grau de severidade;
- no caso de morte humanitária o método que será utilizado deverá estar descrito claramente, independente dele ser aplicado durante ou ao final do estudo. Também deverá ser indicado como serão descartadas as carcaças ou cadáveres.

Estudos adicionais ou alterações na proposta; eventos adversos ou imprevistos e a suspensão da pesquisa deverão ser informados à Ceua para análise e decisão conforme a legislação vigente.

A solicitação à Ceua deverá conter informações suficientes para que a Comissão possa avaliar a proposta com segurança.

Em resumo, o projeto deve incluir, no mínimo:

- o título do projeto;
- justificativa do projeto e para o uso de animais no projeto;
- objetivos;
- plano de trabalho e cronograma estimado;
- os nomes, funções e capacitação de todo o pessoal;
- a proveniência dos animais e as licenças exigidas, uma vez que a autorização da Ceua não exclui a necessidade de outras autorizações legais cabíveis de instituições como Instituto Brasileiro de Meio Ambiente – Ibama, Fundação Nacional do Índio – Funai, Comissão Nacional de Energia Nuclear – Cnen, Conselho de Gestão do Patrimônio Genético – Cgen, Coordenação-Geral da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio e outras, no caso em que a natureza do projeto as exigir;
- detalhes de alojamento;
- detalhes do protocolo que será desenvolvido;
- os benefícios potenciais do projeto;
- uma visão geral do projeto;
- como os princípios de Redução, Substituição e Refinamento serão aplicados;
- como os animais serão monitorados;
- considerações como riscos potenciais a outros animais não humanos ou humanos;
- declaração de que o projeto segue a legislação e princípios éticos.

O Quadro 1 pode ser utilizado para orientar os pesquisadores sobre questões que deverão ser consideradas ao planejar e conduzir protocolos de pesquisa. O Quadro objetiva manter o bem-estar e reduzir ao mínimo a dor ou distresse dos animais durante o desenvolvimento dos projetos de pesquisa.

QUADRO 1 – ORIENTAÇÃO PARA ADESÃO AOS PRINCÍPIOS ÉTICOS NO USO DE ANIMAIS E CUIDADOS COM O BEM-ESTAR ANIMAL EM PROTOCOLOS DE PESQUISA

PLANEJAMENTO DO ESTUDO
Avalie se há alternativas ao uso de animais
Preveja a extensão da dor e do distresse e encontre formas de evitá-los ou de minimizá-los
Avalie a dor e o distresse antecipados individualmente <i>versus</i> causar menos dor em um número maior de animais
Planeje o protocolo de pesquisa para durar o menor tempo possível

PLANEJAMENTO DO ESTUDO
Conheça a espécie a ser utilizada, o comportamento normal dela e seus sinais de dor ou distresse
Considere se as técnicas propostas são as melhores possíveis
CONDUÇÃO DO ESTUDO
Monitore os animais para verificar alterações no comportamento e sinais de dor e de distresse durante toda a realização do estudo
Forneça tratamento paliativo para a dor dos animais, ex. cuidados pré e pós-operatórios, leitos confortáveis, temperatura e umidade ambientes nas faixas de conforto para a espécie, barulho mínimo, etc., incluindo anestesia ou analgesia
Submeta à morte humanitária, sem demora, qualquer animal que pareça estar sofrendo dor ou distresse imprevistos e que não possam ser prontamente aliviados
Avalie complicações imprevistas e determine se os critérios para intervenção e ponto-final humanitário são adequados
TÉCNICAS DE REVISÃO E ESTRATÉGIA DE PROMOÇÃO
Continue a revisar as técnicas, procedimentos e métodos para refiná-los sempre que possível
Revise os Procedimentos Operacionais Padrão (POP) periodicamente
Continue a revisar procedimentos voltados ao cuidado e à administração em instalações que contenham animais confinados
Continue a revisar os procedimentos voltados para as boas práticas
RELATANDO À CEUA
Faça relatórios à Ceua conforme necessário

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTMAN, D. G. (1991). *Practical Statistics for Medical Research*. Chapman & Hall.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – Concea. Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA), (2013). Disponível em: <http://www.cobea.org.br/arquivo/download?ID_ARQUIVO=20>

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Portaria Nº 491, de 3 de julho de 2012. Disponível em: <ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpsessp/bibliote/informe_eletronico/2012/iels.jul.12/Iels126/U_PT-MCTI-GM-491_030712.pdf>

COCHRAN, W. G.; COX GM (1992). *Experimental Designs* (2nd Edition). John Wiley & Sons.

Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:en:PDF>>

Directive 86/609/EEC of the European Parliament and of the Council. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/fs/aw/aw_legislation/scientific/86-609-eec_en.pdf>

ESKES, C.; SÁ-ROCHA, V. de. M.; NUNES, J; PRESGRAVE, O.; DE CARVALHO, D.; MASSON, P.; RIVERA, E.; COECKE, S.; KREYSA, J.; HARTUNG, T. (2009) Proposal for a Brazilian centre on alternative test methods. ALTEX. 26(4):303-6.

FESTING, M. F. *et al.* (2002). The design of animal experiments: reducing the use of animals in research through better experimental design, London UK, Royal Society of Medicine Press.


LANCASTER, G. A.; DODD, S.; WILLIAMSON, P. R. (2004). Design and analysis of pilot studies: recommendations for good practice. Journal of Evaluation in Clinical Practice 10(2): 307-312 doi: 10.1111/j..2002.384.doc.x.

PRESGRAVE, O. A. (2008) The need for the establishment of a Brazilian Centre for the Validation of Alternative Methods (BraCVAM). Altern Lab Anim. 36(6):705-8.

Resolução Normativa 17, de 3 de julho de 2014 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. L. (1959). The Principles of Humane Experimental Technique. Methuen, London.

RUXTON, G. D.; COLEGRAVE, N. (2006). Experimental Design for the Life Sciences (2nd edition). Oxford University Press.



**ANFÍBIOS E SERPENTES
MANTIDOS EM INSTALAÇÕES
DE INSTITUIÇÕES DE ENSINO
OU PESQUISA CIENTÍFICA**

Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica

Anfíbios e serpentes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica

Coordenadora: *Vânia Gomes de Moura Mattaraia – Instituto Butantan*

Autores: *Carlos Alberto Gonçalves Silva Jared – Instituto Butantan*
Kathleen Fernandes Grego – Instituto Butantan
Marta Maria Antoniazzi – Instituto Butantan
Sávio Stefanini Sant’Anna – Instituto Butantan
Selma Maria Almeida Santos – Instituto Butantan
Vânia Gomes de Moura Mattaraia – Instituto Butantan

ANFÍBIOS

1 INTRODUÇÃO

O manejo de animais silvestres em cativeiro é geralmente realizado visando à realização de trabalhos científicos, à exposição pública dos animais em museus ou parques zoológicos para fins de conservação, ou à extração de matéria-prima utilizada na pesquisa, ou para fins de produção.

O objeto deste capítulo é tratar dos anfíbios em cativeiro para uso em atividades de produção, manutenção ou utilização para fins de pesquisa ou ensino. Em relação à manutenção em cativeiro, existe uma vasta literatura detalhando técnicas de manejo em peixes, aves e mamíferos. As serpentes e anfíbios, no entanto, são bastante desconhecidos nesse aspecto, existindo pouca informação sobre a sua manutenção e o seu comportamento em cativeiro. Indubitavelmente, os anfíbios compõem o grupo de vertebrados menos conhecido por esse ponto de vista, já que são animais em geral de pequeno porte e de hábitos secretivos. Além do mais, diferentemente das serpentes, não representam (ou representam muito pouco) problema para a saúde humana ou veterinária.

Dos dados disponíveis na literatura, a maioria se refere a animais do Hemisfério Norte, especialmente ao grupo *Caudata*, representado pelas salamandras e tritões que, das 600 espécies existentes na atualidade, apenas 5 encontram-se no Brasil. De uma maneira geral, muito pouco se conhece sobre os *Anura* (sapos, rãs e pererecas) e os *Gymnophiona* (cecílias ou cobras-cegas), em especial, os da vastíssima anfíbiofauna brasileira. A escassez da literatura sobre o tema é talvez decorrente da dificuldade em se manter esses animais em cativeiro, dado o delicado equilíbrio em que vivem na natureza, sendo muito sensíveis a variações ambientais e apresentando uma pele muito desprotegida e frágil (DUELMANN e TRUEB, 1989; POUGH *et al.*, 1993, JARED e ANTONIAZZI, 2009). Porém, o atual *status* de ameaça da classe como um todo, estabelecido pela *International Union for Conservation of Nature (IUCN)*, vem sendo considerado uma motivação maior para estudos que visem à conservação desses animais.

2 CAPTURA NO CAMPO

A captura, manutenção ou utilização de animais silvestres para fins de pesquisa, ensino ou produção depende da aprovação dos órgãos responsáveis (Ibama, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade –

ICMBio, por meio do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade Sisbio, e/ou Secretaria Estadual do Meio Ambiente), além do Comitê de Ética local. A Instrução Normativa do ICMBio nº 03, de 02 de setembro de 2014 (ICMBio, 2014), regulamenta atividades científica ou didáticas que envolvam captura dos animais silvestres na natureza, transporte, manutenção destes em cativeiro por período inferior a 24 meses e a coleta de material biológico de animais silvestres mantidos em cativeiro. Já a Instrução Normativa do Ibama nº 169/2008, de 20 de fevereiro de 2008 (IBAMA, 2008), regulamenta os procedimentos para autorização de diferentes categorias de empreendimentos que se utilizem da fauna silvestre.

O bem-estar dos animais no cativeiro, para uso em atividades de produção, manutenção ou utilização para fins de pesquisa ou ensino, depende em grande parte da observação de seu modo de vida e de seu *habitat* na natureza. Esses dados são muito importantes para gerir o modo como essas espécies são mantidas. São eles que nos fornecem os subsídios para a tentativa de reproduzir o seu ambiente natural. Nessa tentativa dá-se ênfase, principalmente, à área dos terrários, tipo de substrato, alimento, e condições de umidade, iluminação e temperatura.

A captura de anfíbios na natureza geralmente é realizada por colocação de armadilhas de interceptação e queda (“*pitfall*”), ou por procura ativa. As armadilhas “*pitfall*” são úteis, principalmente quando a busca por anfíbios está inserida em expedições mais amplas, que visem à captura de outros grupos de animais, aproveitando-se, assim, o esforço envolvido na instalação da infraestrutura para esse tipo de armadilha. Podem ser úteis para a captura de todos os taxa, com exceção das pererecas que, por serem trepadoras, têm facilidade para escapar do interior dos baldes.

Uma vez que a maioria dos anfíbios é noturna, a busca ativa é realizada preferencialmente à noite, com o auxílio de lanternas. Já as cecílias, por serem fossórias, são procuradas durante o período diurno, por meio de escavação não muito profunda do solo (cerca de 15 cm), de preferência em locais ricos em matéria orgânica, revirando-se tocos, galhos e troncos em decomposição, utilizando-se uma enxada larga. Para a procura de anuros de chão de floresta, a enxada também é útil para a retirada superficial do folhiço, com movimentos certos ainda que delicados. Os animais, quando avistados, devem ser agarrados rapidamente com as mãos, segurando-os firme, porém sem apertá-los. A seguir, devem ser colocados no interior de sacos plásticos fechados com bolha de ar no interior ou em sacos de pano. Em todos os casos, coloca-se um pouco de substrato (terra ou folhiço úmidos) para servir de abrigo, e diminuir o nível de estresse dos animais. No caso dos pipídeos, anfíbios exclusivamente aquáticos, pode-se utilizar tarrafas de pesca, ou ainda, no caso das pipas amazônicas, a procura ativa em barcos com o motor desligado, já que esses animais podem passar uma boa parte do tempo boiando na superfície dos rios sem correnteza. A captura de cecílias aquáticas, da mesma forma que os pipídeos, pode ser realizada por meio de tarrafas utilizadas para peixes.

É importante ressaltar a necessidade de se acondicionar os anfíbios separados por espécie, de modo que suas toxinas cutâneas não possam provocar danos para as demais espécies capturadas.

Caso a expedição para capturas se estenda por vários dias, é necessário providenciar alimento vivo baseado em grilos, baratas, cupim sem ferrão (de preferência na forma larval), moscas, mosquitos e outros pequenos artrópodes. No caso de animais fossórios, pode-se utilizar minhocas como alimento. Deve-se, ainda, verificar diariamente as condições de umidade das caixas. Caso algum animal venha a óbito, este deve ser imediatamente fixado para trabalhos posteriores e/ou depósito em coleção zoológica. No final dos trabalhos de campo, caso os animais tenham que ser mantidos vivos e trazidos ao laboratório, devem ser acondicionados em local arejado e sombreado, em caixas plásticas com tampa telada ou furada, com bom nível de umidade e abrigos como

folhiço, galhos e fragmentos de casca de árvore. Quando os animais são fossórios, usa-se terra como principal substrato, além de folhiço úmido na superfície.

O transporte dos animais vivos, assim como a captura, deve ser autorizado pelos órgãos competentes. Trata-se de uma etapa crítica nas expedições científicas e devem ser tomados todos os cuidados para que seja gerado o menor nível de *stress* possível nos animais. Mesmo em viagens curtas o espaço a ser destinado para os animais deve considerar cuidados principalmente em relação à manutenção da umidade e ao controle da temperatura, que deve ser mantida amena.

No caso de anuros, animais saltadores, é recomendável acomodá-los em caixas pequenas com furos na tampa e lacradas com fita adesiva ou *clips* de pressão, ou em sacos de pano umedecido, contendo folhiço úmido ou uma bola de algodão bem umedecida. O ambiente protegido e com pouco espaço impossibilita que os animais saltem, gerando muito menos *stress* e menor possibilidade de se ferirem durante o transporte. Os animais aquáticos, quando em transporte de curta duração, podem ser mantidos fora da água, desde que sejam acondicionados em ambiente bem úmido em meio a folhiço, em caixas ou sacos de pano. Outro método bastante utilizado para transporte, principalmente em viagens mais longas, é o acondicionamento dos animais em sacos plásticos inflados com ar e bem amarrados, contendo uma bola de algodão bem umedecida no seu interior. Nesse caso é adequado que se renove, pelo menos diariamente, o ar dos sacos de acondicionamento. Também é adequado que os sacos e caixas contendo os animais sejam acomodados em uma caixa maior, de plástico ou isopor. Caso necessário, dependendo das condições climáticas, essa caixa poderá conter gelo embalado e protegido por panos ou papel, em quantidade suficiente para amenizar a temperatura no interior da caixa mas sem entrar em contato direto com os animais.

Deve-se, sempre, agrupar os indivíduos por espécie e, preferencialmente, por tamanho, caso sejam muito diferentes entre si, evitando-se um número excessivo de animais em cada embalagem.

Ao chegarem à instalação animal, os animais devem passar por um período de quarentena e, apenas posteriormente, poderão ser misturados a outros indivíduos que possam já existir no local, de preferência separados por local de procedência.

3 INSTALAÇÕES ANIMAIS

3.1 Caixas e tanques de contenção

A instalação animal deve ser provida de caixas plásticas retangulares de vários tamanhos e alturas, com tampa telada, preferencialmente dotada de grampos de segurança, com um bom encaixe no corpo da caixa. As caixas devem ser adequadas aos hábitos de vida de cada animal. Assim, pererecas, animais arborícolas e trepadores, devem ser colocadas em caixas altas, enquanto espécies de chão, tais como: pequenas rãs e sapos e espécies semifossórias, tais como: os micro-hilídeos, podem ser acondicionados em caixas mais baixas. Terrários de vidro podem ser utilizados em alguns casos, desde que bem vedados e com tampa telada, sendo ideais para a manutenção de dendrobatídeos.

A tarefa de escolha de tamanho dos recintos é muito delicada, já que as espécies são muito variadas, tanto em tamanho, como em relação aos seus hábitos e necessidades. Assim, é importante que o responsável técnico

utilize informação sobre cada espécie e seja um atento observador dos animais, assim como os cuidadores. Só dessa forma será possível a utilização do bom senso na escolha dos terrários.

Para os sapos e rãs de grande porte, o ideal é a utilização de tanques de alvenaria azulejados, com cerca de 60 cm (largura, altura e profundidade), fechados com tampas teladas montadas com dobradiças, e providos de torneira com bico de rosca a uma altura de cerca de 30 cm e ralo (bem vedado) no chão. Potes de cerâmica, porcelana ou plásticos de vários tamanhos e profundidades são necessários para a colocação de água em cada ambiente, dependendo do tamanho e hábito dos animais. Devem ter boca larga e ser bem estáveis, já que os anfíbios costumam mergulhar na água desses recipientes para se hidratarem.

Para os animais aquáticos, utilizam-se grandes aquários ou tanques com tampa, providos de uma longa coluna de água (com cerca de 50 cm) e de sistema de filtragem constante. Idealmente, no caso do uso de água tratada, esta deve ser previamente descansada, para a evaporação do cloro, embora esse procedimento não pareça ser crítico. No caso de pipas, deve-se utilizar tanques cilíndricos de paredes bem lisas e sem transparência, que não ofereçam possibilidade de os animais escalarem por cantos. Caso sejam utilizados terrários de vidro ou caixas plásticas retangulares, deve-se promover uma boa vedação da tampa, já que esses animais escapam com muita facilidade mesmo por pequenas frestas. No caso das pipas, não é necessário aeração, pois a água deve ser trocada após a alimentação devido à sujeira remanescente da mesma. Para as cecílias aquáticas, o ambiente ideal é o mesmo utilizado para peixes, com sistema de filtragem externo, cascalho no fundo e aeração, tomando-se apenas o cuidado de se manter uma longa coluna de água e uma boa vedação na tampa. Cecílias de correnteza como as do gênero *Typhlonectes*, apreciam a corrente de água que se estabelece através da filtragem e aeração.

3.2 Enriquecimento dos recintos

A proposição de itens de enriquecimento espécie-específicos, adequados às necessidades de cada uma das espécies e dos indivíduos, deve se apoiar na observação do comportamento dos animais em cativeiro, comparando-o com dados obtidos *in situ*.

Substrato de terra é utilizado somente para anfíbios fossórios ou com hábitos de chão de floresta. Para os animais fossórios, a fim de se estabelecer a altura da coluna de terra a ser utilizada, deve-se respeitar o tamanho de cada espécie e, na medida do possível, o hábito de vida dos animais, que podem colonizar diferentes níveis de profundidade do solo.

Por exemplo, anuros micro-hilídeos, que se enterram superficialmente, são mantidos em caixa com uma coluna de 3-4 cm, enquanto que cecílias de grande porte, como *Siphonops annulatus*, requerem uma coluna de terra de pelo menos 20 cm.

Como enriquecimento para os ambientes, utiliza-se materiais inertes, tais como canos de PVC, telhas e tijolos furados de cerâmica, e folhas ornamentais artificiais, bem como materiais orgânicos, tais como cascas de árvore, folhiço, cascas de coco seco cortadas ao meio, frutos vazios de sapucaia, galhos de vários tamanhos e, eventualmente, folhas naturais. No caso das cecílias aquáticas, tocas construídas com a sobreposição de pedras são bem-vindas.

Os dendrobatídeos necessitam de ambiente mais enriquecido do que os outros anuros. O terrário deve conter substrato de terra e folhiço em desnível, formando um pequeno lago em um dos cantos, que pode ser mantido com uma corrente fechada de água de forma a se obter uma pequena queda-d'água, através do uso de uma

bomba de aquário. É necessária também a utilização de vegetação natural e galhos, formando diferentes níveis de substrato a serem explorados pelos animais.

3.3 Manutenção da temperatura, da luminosidade e da umidade

Idealmente, para os anuros e cecílias, o ambiente poderia ser mantido em temperatura constante de aproximadamente 25°C, utilizando-se ar-condicionado. No entanto, além da dispendiosa manutenção, o ar-condicionado priva os animais do contato com a variação natural da temperatura, o que pode causar confusão no seu ciclo de vida. Dessa forma, o controle da temperatura ambiente pode ser realizado com a utilização de ventiladores ou aquecedores, de acordo com a necessidade. A existência de gradientes de temperatura e umidade no interior dos terrários pode ser benéfica aos animais, propiciando-lhes a oportunidade de compensar as variações ambientais através do metabolismo e do comportamento, da mesma maneira que ocorre no ambiente natural.

Para a iluminação, o biotério deve ser preferencialmente dotado de janelas teladas, sendo que a iluminação diurna pode ser reforçada por meio de luminárias no ambiente geral, acesas manualmente todos os dias, ou ligadas a um temporizador.

A umidade deve ser mantida sempre alta, entre 50% e 70%, devendo ser observada e controlada diariamente, tanto no ambiente geral, como individualmente nos terrários. Umidificadores ambientais são bem-vindos, principalmente nas estações mais secas do ano. Nos terrários, deve-se verificar o nível de água dos recipientes e umidificar todo o ambiente com o auxílio de borrifadores. Quando houver como substrato, deve-se verificar a umidade por meio de contato com a palma ou dorso da mão, despejando um pouco de água, se necessário, com o auxílio de um regador de plantas, porém sem encharcá-la. O nível de umidade ideal depende dos hábitos de cada espécie, mas em se tratando de anfíbios, é sempre de médio para alto.

3.4 Alimentação

A alimentação diversificada é um importante pré-requisito para o sucesso da manutenção. Durante a alimentação, é importante estimular as atividades normais do animal, deixando que ele capture o seu próprio alimento. Os anfíbios são todos carnívoros, na acepção mais ampla do termo, ou seja, alimentam-se de outros animais, principalmente insetos. Podem também se alimentar de minhocas, outros anfíbios, répteis e até pequenos mamíferos. Todos os espécimes que servem de alimento devem estar vivos, já que a maioria dos anfíbios depende do movimento para encontrar o seu alimento. No cativeiro, a alimentação de anfíbios depende, na sua maior parte, de criações-suporte de insetos, principalmente baratas (*Pycnoscelus surinamensis*), grilos (*Gryllus gryllus*) e tenébrios (*Tenebrio molitor* e *Zophobas morio*), que devem estar disponíveis em todos os tamanhos, suprimindo as necessidades de cada espécie. Dessa forma, a instalação animal deve ser planejada para contemplar uma área especial dedicada à produção e manutenção desses animais.

A frequência da alimentação é geralmente uma vez por semana. A alimentação com insetos, que serve a maioria dos animais, como sapos e rãs de pequeno porte, pererecas e micro-hilídeos, deve ser farta, mas não excessiva e deve ser ajustada para cada espécie em função do tamanho e número dos indivíduos. O ideal é que haja uma pequena sobra, o que aumenta a chance de que todos os indivíduos tenham a possibilidade de se alimentar. Essa sobra deve ser mantida apenas por umas poucas horas no interior do terrário, sendo recolhida sempre no mesmo dia da alimentação. A familiaridade com cada indivíduo indica a eventual necessidade de separá-los na hora da

alimentação, a fim de dar-lhes chance de agarrar o alimento, quando se percebe grande competição no grupo de um mesmo terrário. Esse fator também é decisivo para indicar quantos animais cada recinto idealmente comporta.

Antes da colocação do alimento, dependendo do comportamento de cada espécie ou mesmo de cada indivíduo, pode ser necessária a retirada parcial ou até mesmo total do enriquecimento dos terrários (com exceção dos recipientes de água e dos galhos, no caso das pererecas), a fim de evitar que os insetos se escondam. No caso dos animais semifossórios como os micro-hilídeos, o controle da alimentação é um pouco mais complicado, já que esses animais não aceitam ficar expostos. Assim, para eles é necessário que seja feita uma subtração entre o alimento disponibilizado e o alimento que sobrou.

No caso de animais maiores, como sapos e grandes rãs, a base da alimentação é realizada com camundongos recém-nascidos ou até mesmo adultos, como no caso de leptodactídeos e ceratofrídeos de grande porte. Esses camundongos, no caso das grandes instituições de pesquisa, podem ser obtidos por meio das instalações de produção de mamíferos para utilização em pesquisa ou ensino. Nesse caso, o alimento é colocado no chão dos tanques (ou terrários), de preferência na frente dos anfíbios, para facilitar a sua visualização. Os insetos também devem ser utilizados como suplementação alimentar.

Para as cecílias, animais cegos para imagem, mas com excelente olfato, a percepção do alimento se dá através de quimiorrecepção. São muito carnívoras e é aconselhável manter-se uma variação entre o uso de carne bovina ou de frango moída, coração de boi ou filé de peixe cortado em pequenos pedaços, e minhocas. Os insetos podem também servir como suplemento alimentar. As carnes devem ser colocadas na forma de pequenas bolas sobre a superfície do substrato. Dessa forma, além de sujar menos a terra, fica mais fácil o controle da alimentação.

Geralmente, deixa-se o alimento à disposição dos animais por 24 horas. Ao fim desse período, as sobras devem ser retiradas, procedendo-se a limpeza dos terrários.

Os pípeos, todos aquáticos e com baixa visão, também são orientados através de quimiorrecepção pelas narinas e pelas pontas dos dedos das patas dianteiras. Alimentam-se bem com a mesma variação de carnes oferecida às cecílias. Pequenos peixes vivos também são bem aceitos. Vez ou outra, muito espaçadamente, pode-se fazer uma suplementação com os pequenos crustáceos comercializados genericamente como Artêmia.

Deve-se ter em conta que a quantidade de alimento varia ao longo do ano, havendo uma significativa diminuição do apetite dos animais em função das temperaturas baixas do inverno, o que tende a regularizar com a chegada dos meses quentes.

3.5 Higienização dos recintos

Nos terrários e caixas sem substrato, deve-se remover os animais para outra caixa e proceder a lavagem com detergente neutro, seguida de um enxágue abundante. Caso a caixa não apresente detritos ou fezes, pode-se espaçar a lavagem em períodos de tempo mais longos. A lavagem deve ser realizada semanalmente, ou com uma frequência ainda maior, caso as caixas apresentem detritos ou fezes.

No caso dos tanques, utilizados para sapos e rãs de grande porte, que quase sempre defecam em grande quantidade (fezes envolvidas por uma cápsula membranosa), deve-se promover uma lavagem abundante diária, utilizando-se uma mangueira rosqueada à torneira no interior do tanque, com ou sem detergente (no caso do uso de detergente, naturalmente, faz-se necessária a remoção dos animais).

Após a limpeza dos recintos, coloca-se novamente os enriquecimentos de cada terrário, removidos no momento da alimentação, normalmente realizada no dia anterior.

No caso de terrários com substrato de terra, a limpeza é realizada semanalmente, após a alimentação. A cada dois meses, deve-se remover os animais subterrâneos e revolver a terra para promover a sua oxigenação. A terra deve ser inteiramente trocada a cada quatro meses. A terra utilizada deve ser fofoa e rica em matéria orgânica e pode ser procedente do chão de mata (se possível), ou até mesmo comprada em lojas especializadas para artigos de jardinagem onde geralmente é conhecida pelo nome de adubo orgânico (terra preta). Deve-se certificar de que não contém adubos químicos. Pode ser enriquecida com a mistura de pó de coco ou troncos e galhos apodrecidos e desfeitos.

Nos tanques das pipas, após a alimentação, deve-se trocar toda a coluna de água em função do espalhamento do alimento, o que provoca podridão e mau cheiro.

3.6 Exigências no cativeiro por grupo

As instalações em geral abrigam animais de laboratório, principalmente mamíferos. Essas instalações seguem normas específicas, já muito bem padronizadas. A seguir, apresentaremos grupos de animais, formados a partir de semelhanças nas suas necessidades no cativeiro, em uma tentativa de sistematizar minimamente os principais requisitos para o seu bem-estar:

3.6.1 Pererecas

As pererecas, animais pertencentes à extensa família *Hylidae*, são trepadores e escaladores, possuindo discos adesivos na ponta de cada dedo que servem justamente para a locomoção e sustentação do corpo em planos verticais. Em cativeiro, permanecem boa parte do tempo aderidos nas paredes do terrário. É necessário, assim, que se dê prioridade ao volume em detrimento da área. Deve-se, portanto, utilizar caixas altas com tampas bem vedadas e teladas. Não é necessário o uso de substrato. Não é necessário individualizar os animais, desde que respeitado um número máximo confortável de animais (geralmente de 3 a 5) por caixa. Esse número deve ser determinado pelo tamanho dos animais e pelos hábitos de cada espécie (se mais agitada ou mais tranquila). A água deve ser colocada em um pote com boa estabilidade e volume, possibilitando a imersão total do animal. O enriquecimento do ambiente deve ser realizado com galhos e folhas naturais ou artificiais e pedaços de cano de PVC com diâmetro que possibilite a entrada dos animais no seu interior. A alimentação semanal deve variar entre baratas, grilos e tenébrios. A limpeza deve ser realizada um a dois dias após a alimentação, com lavagem completa das caixas, que devem ser borrifadas com água diariamente.

As pererecas do gênero *Phyllomedusa*, diferentemente da maioria das outras pererecas, devem ser mantidas separadamente, e requerem folhas bem verdes para manterem a sua cor.

3.6.2 Sapos e rãs de grande porte

Os sapos incluem todas as espécies que pertencem à família *Bufo*, em especial do gênero *Rhinella*. As espécies de grande porte são conhecidas popularmente como sapos-cururus. Esses animais devem ser mantidos em tanques de alvenaria providos de torneira e ralo, o que facilita enormemente a limpeza, que deve ser diária, com auxílio de mangueira. A água deve ser provida em recipientes grandes, estáveis e não muito fundos (como por exemplo, gaiolas pequenas de camundongos), de forma que os animais possam se banhar. É aconselhável que o

uso de substratos como terra ou folhiço seja dispensado, já que dificulta enormemente a limpeza dos tanques. O enriquecimento deve ser realizado com telhas de barro superpostas, de maneira a criar abrigos e formar rampas para acesso à água, além de servir como um substrato diferenciado. São animais gregários, e frequentemente são vistos amontoados dentro dos abrigos. A alimentação semanal é composta basicamente por camundongos neonatos, complementados por insetos oferecidos de forma alternada (baratas, grilos ou tenébrios).

As rãs de grande porte compreendem espécies do gênero *Leptodactylus* (família *Leptodactylidae*). Essas espécies são mantidas em ambiente semelhante aos dos sapos, mas diferentemente daqueles, são animais territoriais, devendo ser mantidos separadamente. Passam boa parte do tempo totalmente imersos no recipiente de água (que, portanto, deve ter bom tamanho e profundidade), mas também procuram com frequência os abrigos de telha. A alimentação semanal é composta basicamente de camundongos ou ratos neonatos, ou até mesmo camundongos com cerca de 20 g, dependendo do tamanho das rãs.

Na falta de tanques de alvenaria, sapos e rãs de grande porte podem ser mantidos em caixas plásticas grandes e fundas, com tampa de tela.

3.6.3 Sapos e rãs de pequeno porte

Os sapos de pequeno porte também pertencem, na sua maioria ao gênero *Rhinella* (família *Bufo*). Já as pequenas rãs, na maioria pertencem à família *Leptodactylidae*. Esses animais são mantidos em caixas menores, mais baixas do que as das pererecas, com um fino substrato de terra e/ou folhiço. Não é necessário em geral individualizar os animais. A água é oferecida em recipientes baixos o suficiente para permitir que os animais se banhem sem correr o risco de afogamento. O alimento composto de insetos (grilos, baratas e tenébrios) é oferecido semanalmente. A limpeza deve ser realizada semanalmente, trocando-se a terra e/ou folhiço. As caixas devem ser borrifadas diariamente.

3.6.4 Anuros semifossóricos

Esse grupo de animais compreende desde espécies grandes de rãs, como as do gênero *Ceratophrys*, até espécies menores, como as que compõem a família *Microhylidae*. O tamanho das caixas deve, assim, ser adequado ao tamanho de cada espécie.

As espécies do gênero *Ceratophrys* são mantidas solitárias em caixas com substrato de terra em uma coluna suficiente que permita ao animal se enterrar por inteiro. A terra deve ser mantida sempre úmida, porém, não encharcada. Um recipiente baixo e estável com água deve ser colocado à disposição na superfície. Esses animais são muito vorazes e com bocas muito grandes em relação ao tamanho corporal. Sua alimentação preferida são os camundongos, oferecidos semanalmente, que podem variar desde adultos (para as espécies de maior porte), até recém-nascidos (para as espécies de menor porte ou indivíduos jovens). A terra deve ser revolvida pelo menos a cada 15 dias e trocada a cada 2-3 meses.

Em relação às espécies de *Microhylidae*, geralmente de porte menor, valem regras semelhantes às das espécies do gênero *Ceratophrys*. Podem, porém, compartilhar uma mesma caixa em pequeno número e, ao contrário daqueles, possuem olhos e bocas pequenos, o que torna a sua alimentação mais difícil em cativeiro. Normalmente os itens mais bem aceitos, oferecidos semanalmente, são os tenébrios, cupins sem ferrão e, por vezes, minhocas pequenas. Valem os mesmos cuidados com o substrato e a umidade relatados para os *Ceratophrys*.

3.6.5 Dendrobatídeos

Os dendrobatídeos pertencem à família *Dendrobatidae* e compreendem, na sua maioria, espécies amazônicas que em geral possuem coloridos muito vistosos. São espécies pequenas e quase sempre arborícolas ou semi-arborícolas e normalmente de hábitos diurnos. Geralmente, são mantidas em terrários de vidros que possibilitem a sua visualização constante para um melhor controle. Devem ser mantidos com substrato de terra em elevação, propiciando a formação de um lago de um dos lados do terrário, galhos e vegetação formando várias alturas de substrato e proporcionando diferentes possibilidades de abrigo. A água pode ser mantida em corrente fechada, por meio do uso de uma bomba de aquário. Para esses animais é adequado o uso de iluminação especificamente sobre o terrário (lâmpada comum ou luz do dia de baixa radiação) provida de *timer*, acompanhando o ritmo regular de claro/escuro do ambiente externo. A alimentação é realizada com grilos e baratas jovens, formigas e cupins sem ferrão e moscas de frutas. O terrário deve ser borrifado diariamente.

3.6.6 Pipídeos

Esses animais constituem os únicos anuros exclusivamente aquáticos e pertencem ao gênero *Pipa* (família *Pipidae*). O ambiente ideal para eles são tanques cilíndricos com colunas de água de pelo menos 50 cm de altura, de preferência construídos em material opaco, que evite a passagem da luz. Podem ser mantidos em grupos de vários indivíduos. A água deve ser permanentemente filtrada com fibra sintética para a retirada de resíduos mais grosseiros. Não é necessário nenhum tipo de enriquecimento, uma vez que esses animais apreciam ficar parados no fundo do tanque ou, por vezes, boiando na superfície. A altura da coluna de água é importante já que esses animais desenvolvem com muita frequência as danças nupciais. A alimentação deve ser realizada em dias alternados com carne bovina ou de frango moída, ou lascas de peixe. Pode-se, ainda, oferecer pequenos peixes vivos e minhocas picadas. A água deve ser totalmente trocada após a alimentação, utilizando-se um sistema de sifão ou de torneiras instaladas no tanque especificamente para essa finalidade, especialmente quando são oferecidas as carnes moídas. Caso sejam observados resíduos aderidos ao tanque, se necessário, suas paredes devem ser limpas com esponja ou até mesmo lavadas. Se for necessária a lavagem com detergente para a remoção de gordura, os animais devem ser retirados com o auxílio de rede para peixes e posteriormente reintroduzidos na água limpa.

3.6.7 Cecílias fossórias

As cecílias são também popularmente conhecidas como cobras-cegas. Pertencem ao grupo dos *Gymnophiona* e compreendem várias famílias e gêneros. São animais essencialmente fossórios e devem ser mantidos em caixas plásticas contendo substrato de terra, formando colunas de pelo menos 20 cm de altura, bem tampadas com tela, sem deixar frestas. A superfície do substrato deve ser enriquecida com elementos que forneçam abrigo, tais como: cascas secas de coco ou frutos de sapucaia com a boca voltada para baixo. No substrato, constroem suas galerias, mas apreciam também utilizar esses abrigos onde podem ser encontrados agregados. A terra deve ser mantida sempre úmida, mas não encharcada. Não deve ser revolvida para que as galerias sejam mantidas intactas. Porém, a cada quatro meses deve ser trocada. A alimentação semanal é composta de carne bovina ou de frango moída, oferecida na forma de pequenas bolas. Deve-se, ainda, alternar essa alimentação com camundongos neonatos e, vez ou outra, carne de peixe ou coração de boi. A introdução de minhocas na terra é benéfica, uma vez que podem servir de alimento e, ao mesmo tempo, contribuir para o equilíbrio do substrato por meio da decomposição de fezes das cecílias e de eventuais contaminações por sobras de alimento.

3.6.8 Cecílias aquáticas

As cecílias aquáticas pertencem à família *Typhlonectidae*. O ambiente ideal desses animais é semelhante aos aquários convencionais para peixes, com sistema de filtragem externo, cascalho no fundo e aeração, tomando-se apenas o cuidado de se manter uma longa coluna de água e uma boa vedação na tampa. Cecílias de correnteza, como as do gênero *Typhlonectes*, apreciam a corrente de água que se estabelece através da filtragem e aeração. A alimentação semanal é realizada com minhocas e carne de boi ou frango moída. A filtragem da água, se eficiente, dispensa a limpeza do ambiente.

4 EUTANÁSIA

A eutanásia deve ser realizada pela aplicação intraperitoneal de uma dose excessiva de tiopental (ou tiopentato de sódio) a 50 mg/kg. Pode-se, ainda, utilizar lidocaína ou benzocaína em pomada ou gel por pincelamento no interior da boca ou na barriga e região inguinal. Outra opção é a administração intrapleuroperitoneal de volumes de 0,05 a 2 ml (em função do tamanho do exemplar) de solução de cloridrato de lidocaína a 2% ou de cloridrato de bupivacaína 0,5%, aguardando um período de cinco minutos até que não haja reflexos. Pode-se ainda assegurar a morte com uma injeção intracraniana – via *foramen magnum* – de lidocaína ou bupivacaína (ver SEBEN, 2007).

Os animais que venham a óbito, seja por morte natural, por doença, ou pelo procedimento de pesquisa científica, devem ser fixados em formalina (formaldeído a 10%) e tombados em coleções zoológicas, sempre que possível e quando houver interesse das mesmas. As coleções da região onde ocorre a pesquisa deverão ser consultadas previamente quanto ao interesse em receber esses animais para tombamento.

5 DOENÇAS MAIS COMUNS OBSERVADAS NO CATIVEIRO

A rotina de manejo e manutenção de um biotério de animais silvestres deve contar com uma equipe multidisciplinar composta, principalmente, por biólogos e veterinários, de modo a contemplar tanto os aspectos biológicos quanto os clínicos referentes ao manejo.

Quaisquer anormalidades devem ser analisadas pelos membros da equipe, os quais devem permanecer sempre atentos a comportamentos que fogem à rotina, sinais de doença ou ferimentos que venham a surgir nos animais. Essa análise visa fornecer subsídios para a indicação de possíveis tratamentos clínicos pelos veterinários. Entretanto, em relação a anfíbios, a literatura que versa sobre aspectos clínicos e doenças é ainda muito escassa. Apresentamos, a seguir, algumas das doenças mais comuns que acometem esses animais no cativeiro.

5.1 Micose

Causa: diversos fungos

Sintomas: mudança na aparência normal do tegumento, ferida circular que com o tempo sofre aumento no diâmetro e na profundidade.

Tratamento: uso de antimicótico.

5.2 Doença da perna vermelha (“*red leg disease*”)

Causa: infecção por bactérias como as do gênero *Pseudomonas*

Sintomas: ruborização da pele e hematomas ao longo da região abdominal e pernas.

Tratamento: uso de antibiótico.

5.3 Amebíase

Causa: Entamoeba especializada em anfíbios (*Entamoeba ranarum*).

Sintomas: diarreia sanguinolenta, constipação, postura anormal devido à destruição dos tecidos internos.

Tratamento: uso do medicamento à base de Metronidazol

5.4 Miíase

Causa: proliferação de larvas de moscas (diversas espécies).

Sintomas: dano tissular, especialmente na região dos olhos, narinas e cloaca.

Tratamento: remoção mecânica e subsequente untamento com óleo e utilização de anti-inflamatório e antibiótico de uso tópico.

5.5 Verminose

Causa: várias espécies de vermes

Sintomas: muito variáveis conforme a espécie de parasita

Tratamento: específico para cada espécie.

5.6 Protrusão intestinal

Causa: presumivelmente por infestação de nematódeos.

Tratamento: manipulação do intestino empurrando-o delicadamente em direção ao interior da cloaca com um jato de água. Algumas vezes é necessária a remoção cirúrgica.

5.7 Dificuldade na troca de pele

Causa: desidratação.

Tratamento: banhos forçados prolongados em água. A partir disso, faz-se remoção da pele, podendo ser auxiliado com pinça.

5.8 Fraturas ósseas

Causa: acidentes causados pelos próprios animais.

Sintomas: membros quebrados

Tratamento: normalmente, ocorre regeneração espontânea, porém, é importante prevenir infecção, utilizando pomada antibiótica ou antibiótico injetável.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DAVIES, R.; e DAVIES, V. (1997) *The Reptile and Amphibian Problem Solver*. Tetra Press.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. (1986) *The Biology of Amphibians*. MacGraw-Hill, New York.

JARED, C.; ANTONIAZZI, M. M. (2009) Anfíbios: Biologia e Venenos. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN F. H.; MALAQUE, C. M. S.; HADDAD, Jr. V. (Org.) *Animais Peçonhentos no Brasil – Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. 2. ed. Sarvier, São Paulo, Brasil. p. 317-330.

JARED, C.; NAVAS, C; TOLEDO, R. C. (1999) An appreciation of the physiology and morphology of the Caecilians (Amphibia, Gymnophiona). *Comparative Biochemistry and Physiology* 123(4):313-328.

JARED, C.; ANTONIAZZI, M. M.; KATCHBURIAN, E.; TOLEDO, R. C.; FREYMÜLLER, E. (1999) Some aspects of the natural history of the casque-headed tree frog *Corythomantis greeningi* (Hylidae). *Annales des Sciences Naturelles, Zoologie et Biologie Animale* 1999(3):105-115.

POUGH, F. H.; HEISER, J. B.; MCFARLAND, W. N. (1993) *A vida dos vertebrados*. São Paulo. Atheneu Editora, São Paulo.

SEBBEN, A. Microdissecação fisiológica a fresco: uma nova visão sobre a anatomia de anfíbios e répteis. In: Nascimento, L. B. & Oliveira, M. E. (eds.) (Org.) *Herpetologia no Brasil II*. 1. ed. Belo Horizonte (MG): Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2007, v. 1, p. 311-325.

VELLOSO, M. E. C.; JARED, C.; ANTONIAZZI, M. M. (1993) Técnicas de manutenção de algumas espécies de anuros em cativeiro. *Anais do III Congresso Latino-Americano de Herpetologia, Campinas (SP)*.

ZIMMERMANN, E. (1995) *Reptiles and Amphibians*. T. F. H. Publications, Inc., New Jersey.

SERPENTES

1 INTRODUÇÃO

As serpentes são animais vertebrados ectotérmicos que fazem parte do grupo dos répteis. Possuem o corpo alongado sem patas e coberto por escamas, a cintura escapular está ausente quando a cintura pélvica está presente, ela é rudimentar e notam-se pequenos esporões em vez de membros pélvicos (VITT e *Caldwell*, 2009). Não possuem pálpebras, mas o globo ocular está protegido por uma escama córnea transparente. O ouvido externo está ausente e o médio é adaptado para sentir vibrações do solo. São animais carnívoros que ingerem suas presas inteiras, possuindo diferentes táticas para subjugar suas presas. Enquanto algumas serpentes simplesmente abocanham e engolem suas presas, outras realizam comportamentos como a constrição e ainda há as que produzem substâncias tóxicas que são injetadas em suas presas paralisando e matando-as. Apesar do formato externo muito semelhante entre as espécies, o tamanho destas pode variar de alguns centímetros a vários metros. Uma característica muito interessante das serpentes é o fato de alguns grupos produzirem substâncias tóxicas que quando inoculadas matam suas presas ou causam acidentes nos seres humanos.

Para produção, manutenção ou utilização para fins de pesquisa ou ensino, envolvendo serpentes ou qualquer outro animal silvestre, é necessária a aprovação do Comitê de Ética local e aprovação dos órgãos responsáveis (Ibama, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, por meio do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade Sisbio, e/ou Secretaria Estadual do Meio Ambiente). A Instrução Normativa do Ibama N.º 169/2008, de 20 de fevereiro de 2008 regulamenta procedimentos de autorização de diferentes categorias de empreendimentos utilizadores de fauna silvestre. A Instrução Normativa do ICMBio N.º 03, de 02 de setembro de 2014, regulamenta atividades científica ou didáticas que envolvam coleta ou captura dos animais silvestres na natureza, manutenção destes em cativeiro por período inferior a 24 meses e coleta de material biológico de animais silvestres mantidos em cativeiro.

2 INSTALAÇÕES ANIMAIS

2.1 Estrutura física dos recintos (macro e microambientes)

As serpentes podem ser mantidas de duas maneiras distintas, serpentário fechado (criação intensiva) e serpentário aberto (semiextensiva) (LELOUP, 1984).

No serpentário fechado, as serpentes devem ser mantidas em caixas dentro de salas, enquanto que, no serpentário aberto, as serpentes devem ser mantidas em recintos delimitados em áreas externas. A rotina de manejo e manutenção em qualquer um dos serpentários deve contar com uma equipe de biólogos e, ao menos, um veterinário responsável. Requisitos mínimos para produção, manutenção ou utilização de serpentes para atividades de ensino ou pesquisa científica são apresentados no Anexo II.

2.1.1 Área de recinto e condições ambientais

2.1.1.1 Serpentário fechado

É um tipo de instalação útil para casos de manutenção de serpentes que não são adaptadas às condições climáticas da região, já que é possível controlar fatores como temperatura, umidade e iluminação. Por exemplo, quando se mantém serpentes de áreas equatoriais em local com clima subtropical. No serpentário fechado a reprodução pode ser controlada e as serpentes podem ser melhor acompanhadas individualmente quanto à sua alimentação, condições de saúde, etc. (LELOUP, 1984).

Dimensões

As serpentes são mantidas em gaiolas, caixas ou terrários. Estes podem estar dispostos em prateleiras, a fim de otimizar o espaço da sala e devem ser de material liso e de fácil higienização. Deve-se evitar um número superior a dois animais por gaiola, sendo um animal o ideal. As dimensões das gaiolas devem ser compatíveis ao tamanho da serpente e ela enrolada não pode ocupar mais de 1/3 da área da gaiola. Para as serpentes arborícolas, a altura disponível também é um fator a ser considerado e, nesse caso, a altura deve corresponder no mínimo à metade do comprimento da serpente. Serpentes semiaquáticas ou aquáticas devem ter um local que possam nadar ou banhar-se, mas também a opção de um local que possam permanecer sem estar em contato com a água, mantendo todo seu corpo em ambiente seco.

Substrato

O substrato pode variar conforme a espécie ou até mesmo o experimento que será realizado. No caso de estudos relativos à história natural e comportamento dos animais, substratos naturais podem ser usados, simulando o *habitat* em que as serpentes vivem. Terra, cascalho, pedras, areia e troncos podem ser utilizados, contanto que tenham passado por um processo de desinfecção previamente (ver item “Higienização” abaixo).

Outros tipos de substratos são o papel-jornal e o papelão corrugado. No caso do papel-jornal, deve-se forrar a gaiola com uma camada formada por várias folhas de jornal, já que, em caso da serpente virar o bebedouro de água, o jornal possa absorver a água, evitando que o ambiente fique alagado. Pelo fato de o jornal ser uma superfície lisa, deve ser inserido um objeto como um pedaço de rocha ou telha ou qualquer outro objeto rugoso para que a serpente deslize seu corpo contra o objeto e consiga realizar a ecdise. Serpentes arborícolas devem ter condições de ocupar a gaiola tridimensionalmente. Para tal, devem existir suportes em diferentes alturas para que a serpente possa escalar e se manter enrodilhada acima do nível do piso da gaiola. As diferenças da habilidade em escalar, assim como tamanho dos animais, devem ser levadas em consideração com relação ao tamanho dos suportes e a quantidade dos mesmos. Por exemplo, a cobra-papagaio (*Corallus caninus*) consegue se equilibrar em um único galho, enquanto outras necessitam de áreas de forquilha para se manter acima da superfície. Algumas serpentes são fossoriais. Nesse caso, é necessário que o substrato permita que as mesmas se enterrem. Pode-se, então, utilizar vermiculita, sabugo de milho triturado, areia, etc. Para serpentes que vivem sob o folhoso ou troncos de árvores, uma opção é o uso de cascas de árvores (barks).

Serpentes muito pesadas podem vir a ter problemas nas escamas ventrais caso o substrato não seja macio o suficiente, nesse caso a maravalha é uma boa opção. Entretanto, cuidados devem ser tomados no momento da alimentação quando o substrato é formado por pequenas partículas, como a serragem, já que, durante a ingestão da presa, pode haver ingestão do material particulado, causando sérios problemas na boca ou no trato digestório (CARE, 1980-1984). A origem do material utilizado deve ser verificada evitando assim problemas como contaminação e lesões das serpentes.

Fonte de água e umidade

Apesar de algumas serpentes serem encontradas em ambientes xéricos, é imprescindível a presença de uma

fonte de água para que a serpente possa ingerir água e para manter a umidade no interior da gaiola. Essa água deve ser tratada e trocada a cada três dias, evitando o desenvolvimento de bactérias. O bebedouro deve ser liso para melhor higienização, lavado com detergente comum e ser bem enxaguado, a cada troca de água. Serpentes podem também ingerir água que acumula sobre seu corpo (ANDRADE e ABE, 2000). Este é um comportamento muito importante no caso das serpentes arborícolas que em condições naturais não descem ao solo para beber água. Elas ingerem a água das chuvas que ficam nas folhas e galhos, ou então as gotículas nas suas escamas. Assim, para serpentes arborícolas deve-se borrifar água na gaiola e sobre a serpente frequentemente (a cada dois ou três dias), fornecendo água para ingestão.

A umidade ideal depende da espécie que se está mantendo em cativeiro. Espécies provenientes de matas fechadas possuem uma maior necessidade de umidade do que aquelas que habitam locais rochosos e secos. Deve haver um higrômetro na sala para controle; a observação dos animais e das suas condições dão bons indícios se a umidade do local é adequada. Dificuldades para realizar a ecdise e/ou acúmulo de discidises são indícios de uma baixa umidade no local que pode ser compensada com borrifos de água na gaiola. A existência de fungos na gaiola ou mesmo micoses nas escamas das serpentes, por outro lado, demonstra que a umidade (pelo menos no interior da gaiola) está elevada. Aumento de pontos de ventilação nas gaiolas, aumentando o fluxo de ar pode ser a solução. Caso o problema não seja solucionado e se estenda a muitas gaiolas e animais, deve-se aumentar a ventilação da sala.

Temperatura

As serpentes como animais ectotérmicos necessitam de fonte de calor externo para manutenção da sua temperatura. Portanto, é necessário dar à serpente condições para que a mesma consiga manter o intervalo de temperatura do seu corpo dentro dos níveis aceitáveis para realização das suas atividades fisiológicas e comportamentais. Devido à existência de grande diversidade de serpentes com seus diferentes hábitos e temperaturas, não é possível estabelecer uma temperatura exata ou mesmo um intervalo ideal que sirva indistintamente para todas as espécies de serpentes.

É recomendado proporcionar gradientes de temperatura no interior dos terrários, visando o bem-estar dos animais. Caso sejam mantidas na sala serpentes com preferências térmicas diferentes, fontes de calor devem ser providenciadas. Existem produtos como pedras aquecidas próprias para aquecimento de terrários que podem ser usadas, porém, deve-se tomar cuidado para que a serpente não consiga entrar em contato direto com a fonte de calor caso esta seja uma lâmpada de bulbo ou resistência, a fim de evitar queimaduras na pele.

Iluminação

Diferentemente de outros répteis como lagartos e tartarugas, que necessitam de radiação solar para síntese de vitamina D, as serpentes obtêm essa vitamina por meio da alimentação. Esse fato possibilita a manutenção de serpentes sem a necessidade de iluminação especial com UVB (comprimento de onda de 290-320 nm). Entretanto, assim como para os outros animais, é fundamental um ciclo de claro e escuro. A iluminação natural (através de janelas ou claraboias) já é suficiente para a manutenção do ciclo. Caso a sala não possua iluminação natural, deve ser fornecido um ciclo de 12/12 horas, ou então similar ao ciclo na região onde se encontra o serpentário. Se houver sistema de ventilação na sala (uso de insuflação e exaustão de ar) as janelas podem ser seladas. Do contrário, é melhor que as janelas possam ser abertas e teladas por fora, para evitar fugas e entrada de insetos.

2.1.1.2 Serpentário aberto

Neste caso, as serpentes são alojadas em áreas externas delimitadas. Nesse tipo de serpentário, as serpentes estão em condições mais próximas às condições naturais, tendo contato com chuva, radiação solar, vento, rochas, etc. (LELOUP, 1984). Quando comparado ao serpentário fechado, uma série de fatores é naturalmente resolvida como, por exemplo, a iluminação. No entanto, deve-se ter em mente que nesse tipo de serpentário as espécies a serem mantidas devem ser típicas da região de instalação do serpentário ou então de locais com características climáticas semelhantes.

No cativeiro semiextensivo, se as instalações atenderem a todos os requisitos estruturais e de segurança, o manejo dos animais é facilitado, necessitando apenas de adequações nos aquecedores quando a temperatura cai. O tempo de quarentena de 45-60 dias é considerado adequado, embora muitas vezes exames clínicos sejam necessários para evitar a introdução de doenças nos recintos. O manejo alimentar é individualizado e os técnicos devem monitorar, a distância, se a serpente se alimenta ou não. A marcação para identificação das serpentes pode ser feita por meio de marcas naturais, tinta nas escamas ou microchip subcutâneo.

O trabalho do técnico do serpentário envolve familiaridade, com a manutenção e manejo de serpentes, principalmente no recinto das peçonhentas.

No Brasil, as serpentes usualmente mantidas em cativeiro semiextensivo pertencem à família *Viperidae* (gêneros *Bothrops* e *Crotalus*) e representantes da família *Boidae* (gêneros *Boa* e *Epicrates*). Representantes de outras famílias podem ser utilizados, porém, a taxa de mortalidade desses animais costuma ser mais elevada.

Dimensões

No caso do serpentário aberto, as dimensões dependem mais das condições de implantação e do número de animais a serem mantidos. Deve-se utilizar a regra de uma serpente média (cerca de 1 m) por m², com 150 cm de altura mínima das laterais e 3 a 4 m² para serpentes maiores de 2 m. Em casos de serpentários acima de 50 m², sugere-se a divisão em unidades menores (bairros ou parques) a fim facilitar o manejo profilático. É fundamental que exista área sombreada para as serpentes, assim como abrigos, para que elas não se sintam desprotegidas e à mercê de predadores como águias, gaviões e gambás. É importante conhecer muito bem o comportamento e as capacidades das espécies a serem mantidas em cativeiro para determinar a altura do muro que irá delimitar o recinto, evitando a saída ou entrada de outros animais. A cobertura com tela pode ser uma opção. A cenografia do recinto deve assemelhar-se ao *habitat* natural da serpente (*e.g.* ambiente de Cerrado para cascavéis e ambiente de Mata Atlântica para jararacas e jiboias). O sistema de circulação de água pode incluir um riacho em toda a extensão do serpentário, com um sistema de escoamento da água no chão ou mesmo uma cachoeira entre as pedras (MELGAREJO-GIMENEZ, 2006).

Substrato

Normalmente, os serpentários abertos possuem substrato natural formado por terra, vegetação, folhiço, areia, pedaços de rochas, galhos, etc. Pode haver uma parte do serpentário com substrato artificial (grama artificial, concreto, etc.) para facilitar a higienização do local.

Fonte de água e umidade

Devido à presença da luz solar, a fonte de água para os animais deve ser de água corrente ou então ser trocada todos os dias para evitar o acúmulo de algas e bactérias. E, assim como no serpentário fechado, a água disponível deve ser tratada. De maneira geral, a umidade natural já é suficiente, mas, dependendo do local e devido a picos de período seco, pode-se aumentar a umidade, molhando através de uma mangueira o recinto de uma a duas vezes por dia. Dificilmente ocorrem casos de umidade excessiva graças à ventilação natural. E assim como no serpentário fechado, a presença de micoses nas escamas ou disecdises também são indicativos de possíveis desequilíbrios na umidade local. Importante lembrar que o recinto deve ter escoamento de água protegido por tela para que a água da chuva não se acumule, alagando o serpentário e para que as serpentes não escapem.

Temperatura

O serpentário aberto possui uma grande vantagem que é permitir a termorregulação natural pelas serpentes. No entanto, é necessário que se dê opções de diferentes temperaturas para que as serpentes possam elevar ou abaixar a sua temperatura corpórea. Áreas com insolação e com diferentes graus de sombreamento ocorrendo ao mesmo tempo são fundamentais para que as serpentes escolham o que melhor lhes convêm naquele momento. Durante o inverno, caso as espécies de serpentes não estejam acostumadas a quedas de temperatura da região, é necessário o uso de aquecedores ou, então, o deslocamento das serpentes para serpentários fechados.

Iluminação

A iluminação natural possui vantagens em relação à luz artificial. O ciclo de claro e escuro é naturalmente controlado, a luz solar é um agente bactericida (DANIEL *et al.*, 2001) e a radiação é uma fonte de calor para a termorregulação das serpentes. Devem-se tomar cuidados com a insolação nas serpentes, portanto, ambientes abrigados da luz solar devem estar disponíveis a todos os indivíduos.

Higienização

A higienização do recinto deve ser realizada a cada 15 dias com a lavagem dos bebedouros, paredes internas e externas, com água e sabão, enquanto os espelhos d'água com lavadora de alta pressão. Uma intervenção sanitária no serpentário (higienização completa das paredes e piso com hipoclorito de sódio) é realizada uma vez por ano em cada recinto ou a cada troca do plantel.

Alimentação

Viperídeos e boídeos são alimentados mensalmente com camundongos (*Mus musculus*) ou ratos (*Rattus norvegicus*) de acordo com o tamanho da serpente. Durante a alimentação dos animais, as serpentes são separadas em diferentes pontos do recinto para que ocorra melhor distribuição do alimento e para evitar a disputa das serpentes pela mesma presa (roedor). Nas primeiras duas semanas, o manejo e a circulação de pessoas após a alimentação das serpentes devem ser evitados. Outras presas (*e.g.* anfíbios e lagartos) devem ser utilizadas no caso de colubrídeos ou dipsadídeos.

Parâmetros fisiológicos e Reprodução

A temperatura corpórea de machos e fêmeas ao longo das estações do ano pode ser monitorada nos diferentes microhabitats do cativeiro semiextensivo. A mensuração pode ser feita com o termômetro infravermelho que elimina a necessidade de contato com o animal.

O cativeiro semiextensivo permite acompanhar e observar várias interações entre machos e fêmeas na época do acasalamento. Em cascavéis e jararacas, por exemplo, durante os meses de abril a junho (outono), são observados vários comportamentos reprodutivos, tais como luta entre machos (rituais de combate), corte, perseguição e acasalamento. No final da primavera observam-se várias fêmeas termorregulando, o que pode ser muito importante para otimizar o metabolismo da mãe e dos embriões durante a gestação. Fêmeas prenhes podem ser acompanhadas e identificadas por marcação individual. Desse modo, no final do verão poderemos registrar o nascimento de filhotes e identificar as mães. Observações de processos reprodutivos podem ser obtidas também em outras espécies de serpentes em cativeiro semiextensivo. Tais registros constituem informações preciosas sobre a biologia reprodutiva desses animais, que, por sua vez, podem contribuir para o melhor manejo dos mesmos.

2.1.1.3 Quarentena e identificação

A quarentena dos animais recém-chegados é fundamental para evitar a propagação de doenças infectocontagiosas no plantel. A quarentena deve estar próxima ao biotério, mas separada por barreiras físicas, como portas. Caso não haja funcionários exclusivos para atuar nas salas de quarentena, o fluxograma da instalação animal deve ser feito de modo que as salas da criação sejam atendidas em primeiro lugar. A vestimenta do funcionário deve ser trocada ao entrar na quarentena e, em nenhuma hipótese, o funcionário poderá voltar à criação principal. Não havendo espaço físico para a separação em salas diferentes, pode-se utilizar prateleiras separadas para o isolamento dos animais recém-chegados, nesse caso o material de cada prateleira deve ser individualizado.

Serpentes coletadas na natureza ou trazidas de algum outro local deverão receber ficha de identificação individualizada, na qual serão armazenados dados sobre a procedência do animal, data e local de coleta e o número de registro da serpente. Na quarentena, as serpentes são mantidas em caixas individuais. As caixas são forradas com papelão e água *ad libitum*. A inspeção deve ser realizada diariamente, sendo as caixas trocadas quando necessário. Após o processo de registro, as serpentes devem permanecer por período de 45 - 60 dias em quarentena. A ficha deve conter ainda registros das serpentes, tais como: comprimento rostro-cloacal (CRC) e comprimento da cauda (CC), massa e sexo do animal. Ao tratador, é indicado o uso de equipamentos de proteção individual, como: luvas de borracha ou cirúrgicas e máscaras, uma vez que diversos agentes infecciosos podem ser transmitidos das serpentes para o homem.

O controle de endo e ectoparasitas deve seguir um programa estabelecido pelo responsável técnico da instalação. Durante o período de permanência na quarentena, as serpentes devem ser observadas quanto à frequência alimentar, regurgito, defecação e ecdise.

Na quarentena, é recomendado que os ganchos e tubos sejam desinfetados após o manejo de cada serpente, para evitar contaminações entre os animais. Essa desinfecção pode ser realizada imergindo os insumos em um recipiente com solução de hipoclorito de sódio a 0,5% ou solução de amônio quaternário inodoro.

Antes de serem liberados para o plantel, exames coproparasitológicos devem ser realizados nas serpentes da quarentena. Os animais só deverão ser encaminhados ao biotério de criação quando os resultados de todos forem negativos.

Todos os animais devem ser identificados. O uso do microchip é muito recomendado. Os animais devem ser microchipados após 45 a 60 dias de quarentena (JACOBSON *et al.* 1992). O microchip (transponder) é implantado por via subcutânea com auxílio de um aplicador, no lado esquerdo do último terço do corpo da serpente. Um leitor especial permite identificar, a cerca de 30 cm, o código do transponder, que, aplicado corretamente, é bem tolerado e não produz inflamação nem sofre migrações dentro do corpo do animal. Esse procedimento está de acordo com a Instrução Normativa do Ibama (02/2001) a qual estabeleceu a obrigatoriedade de se identificar os animais em criadouros por sistema eletrônico de microchip. Além disso, pode ser feita uma marcação externa com esmalte na base da cauda para identificação visual.

2.1.2 Área de utilização

Pesquisas relacionadas ao comportamento ou à fisiologia podem ocorrer dentro da própria gaiola, terrário ou recinto onde o animal é mantido. A sala deve ter características semelhantes às salas para outros animais de laboratório. Paredes e tetos devem ser lisos e laváveis, sem rachaduras que possam acumular microrganismos. O chão e as bancadas ou prateleiras devem ser resistentes a produtos químicos para higienização e impermeáveis. A sala deve ser iluminada com luz artificial ou natural, nesse caso as janelas devem possuir tela para evitar a entrada de insetos. Não se aconselha a existência de escada na saída da sala, optando-se, quando possível, pela utilização de rampas.

2.2 Apoio técnico

Composto por uma área de higienização, sala de procedimentos (ambulatório e centro cirúrgico), depósito, área de triagem, área de quarentena e sala de necropsia. Todas as atividades realizadas nas diferentes áreas da criação e experimentação animal devem ter uma descrição detalhada das operações, para que os procedimentos sejam sempre uniformizados e padronizados (Procedimento Operacional Padrão – POP).

2.2.1 Área de higienização

Esta área deve ser adequada à lavagem e desinfecção das gaiolas e materiais utilizados na criação das serpentes. Muitas vezes, a área de higienização se encontra no interior da sala de manutenção e se restringe a uma pia ou torneira instalada em um dos cantos. A higienização das gaiolas ou terrários deve ser feita em outro ambiente, já que é necessário o uso de substâncias químicas, como: hipoclorito de sódio, quaternário de amônio, clorexidine ou álcool etílico para a desinfecção e higienização, além da água e sabão. O resíduo originado neste local, como fezes e substratos, deve ser descartado em saco de lixo branco para material infectante e posteriormente ser incinerado.

2.2.2 Ambulatório e centro cirúrgico

Quando a pesquisa/ensino necessitar de exames mais específicos ou cirurgias, deve haver um ambulatório e/ou centro cirúrgico, ou então convênios com locais que estejam adequados para tais procedimentos. O ambulatório e/ou centro cirúrgico são espaços contíguos, sendo que no ambulatório são realizados exames clínicos gerais, retirada de secreções, biópsias, curativos e preparação do paciente para a intervenção cirúrgica.

No ambulatório, devemos ter uma pia, uma estufa para esterilização de material, uma mesa de fácil desinfecção (aço inoxidável, por exemplo) e todo o material e medicamento necessários para os procedimentos a serem realizados. O centro cirúrgico deverá ter uma mesa em material de fácil desinfecção e uma boa iluminação, que pode ser conseguida através de um foco cirúrgico fixo ou portátil. Muitas vezes, por falta de espaço, não há condições de ter um ambulatório e um centro cirúrgico na criação/experimentação de serpentes. Desse modo, o ambulatório e o centro cirúrgico podem ser em uma única sala, desde que o ambiente seja devidamente limpo e desinfetado antes de realizar uma cirurgia.

As paredes e o chão devem ser de material não poroso, de fácil limpeza, com cantos arredondados e a porta deve ter visor. Se nas salas houver janelas, estas devem permanecer fechadas durante os procedimentos para evitar a entrada de poeira e insetos.

2.2.3 Depósito

É importante que na criação haja um espaço reservado para os materiais de reposição utilizados na criação, como gaiolas e bebedouros lavados e desinfetados, substratos limpos, sacos de lixo e luvas de procedimento.

2.2.4 Triagem

Antes de entrarem na quarentena, as serpentes recém-chegadas ao plantel devem passar pela triagem, uma sala próxima à quarentena onde os primeiros tratamentos profiláticos são administrados. Essa sala deve ter uma porta com visor, uma pia, uma mesa de fácil limpeza para a realização do exame clínico geral, determinação do sexo, medida dos dados biométricos (como comprimento rostro-cloacal e rostro-total) e uma balança para pesagem dos animais.

2.2.5 Sala de necropsia

A sala de necropsia deve ter uma pia, uma mesa de aço inoxidável, uma geladeira e um *freezer*. As paredes e piso devem ser de material impermeável e de fácil limpeza. A necropsia deve ser realizada com equipamentos de proteção individual como luvas, máscara e óculos de proteção. O avental utilizado na necropsia não poderá ser utilizado em nenhum outro local da criação. Sugere-se o uso de propé na sala de necropsia. Animais que vêm a óbito deverão ser levados, em sacos plásticos adequados, à sala de necropsia, onde são colocados na geladeira. Após a necropsia e coleta de material para exame histopatológico, os animais são adequadamente embalados em sacos plásticos e colocados no *freezer* até o descarte apropriado. Sempre que possível, as serpentes devem ser fixadas em formalina (fomaldeído a 10%) e tombadas em coleções zoológicas (mais informações no item 5.7).

3 PROCEDIMENTOS DE MANEJO

3.1 Alimentação

As serpentes são animais carnívoros que sempre se alimentam da presa inteira. Existe uma vasta diversidade de itens alimentares que são predados pelas diversas espécies e algumas delas possuem modificação ontogenética na dieta. O primeiro passo é conhecer a dieta alimentar da espécie em vida livre e adaptar às condições

de cativeiro. É importante que a presa a ser fornecida como alimentação seja procedente de locais próprios de criação (biotérios de camundongos e ratos, ranários, etc.) e que tenham um controle das suas condições sanitárias. No entanto, há casos em que faz parte da experimentação oferecer animais coletados na natureza (por exemplo em casos de estudos do comportamento alimentar), ou que não exista criação do alimento, mas corre-se o risco de introduzir patógenos no plantel. Nem sempre é possível oferecer a mesma dieta da natureza no cativeiro por dificuldade em se conseguir a presa. Nesse caso deve-se fazer uma adaptação da serpente ao alimento. Por exemplo, filhotes de *Bothrops jararaca* se alimentam de presas ectotérmicas na natureza quando jovens. No entanto, com insistência, eles acabam aceitando filhotes de camundongos na alimentação.

Serpentes costumam matar suas presas antes de ingeri-las, mas deve-se tentar oferecer a presa submetida à eutanásia. Caso a serpente não aceite a presa morta, deve-se insistir movimentando-a perto da serpente. Se mesmo assim ela recusar, a presa deve ser oferecida viva. Se for oferecido alimento vivo e que possa levar perigo para a serpente (por exemplo, um roedor), deve-se colocar na gaiola alimento para a presa. Caso a serpente não prede o roedor, este terá alimento e não atacará a serpente. As presas vivas não devem permanecer na sala de manutenção das serpentes quando não estiverem sendo oferecidos para alimentação. Estudos indicam que mesmo camundongos de laboratório reconhecem o odor das serpentes como ameaça e apresentam comportamentos estereotipados de medo (WELDON *et al.*, 1987). Da mesma maneira, é aconselhável que toda sala de manutenção seja alimentada no mesmo dia, evitando que serpentes sintam o odor da presa, mas não sejam alimentadas.

A frequência da alimentação também é variada, dependendo da espécie. Serpentes que se alimentam de grandes volumes relativos de uma só vez podem ser alimentadas mensalmente (por exemplo boídeos e viperídeos) com cerca de 10% a 20% do seu peso em alimento (que pode ser fracionado em duas ou três presas). Já outras serpentes que se alimentam mais frequentemente, mas de presas menores, podem ser alimentadas quinzenalmente ou mesmo semanalmente (por exemplo *Micrurus*). É importante oferecer uma presa compatível com a capacidade de ingestão da serpente para que a mesma não sofra tentando ingerir um alimento muito grande (SAZIMA e MARTINS, 1990). Em todos os casos, o controle do ganho do peso e do crescimento é fundamental para evitar sobrepeso dos animais.

3.2 Higienização

Diariamente, os resíduos de excreções e ecdises devem ser removidos das gaiolas das serpentes ou, quando necessário, a gaiola deve ser trocada. A cada três dias, ou antes se necessário, o bebedouro deve ser trocado. Tanto as gaiolas como os bebedouros devem ser lavados com sabão neutro e desinfetados com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,4% ou com uma solução de amônio quaternário inodoro. As gaiolas devem secar fora da sala de manutenção para que o odor dessas substâncias químicas não influencie as serpentes. O substrato arbóreo utilizado para as serpentes de hábito arborícola precisa ser regularmente lavado e desinfetado. O recipiente com água, utilizado para as serpentes de hábito semiaquático, deve ser lavado a cada três dias. Embora a terra não seja um bom substrato para manter as serpentes de criação ou experimentação, por dificultar a retirada dos resíduos, se o seu uso for necessário, esta deve ser trocada mensalmente.

Deve-se tomar muito cuidado com a procedência dos substratos utilizados nas gaiolas, pois podem estar infectados com ácaros, carrapatos ou microrganismos prejudiciais às serpentes. Galhos, folhas, cascalhos e terra devem ser autoclavados previamente. Outra opção de desinfecção, com exceção da terra, é imergir os substratos por um período de 2 horas em uma solução de hipoclorito de sódio a 0,4% e postos para secar.

Nenhum material de uma sala pode ser utilizado em outra, para evitar contaminações. Regularmente, o material de contenção de cada sala, ganchos e tubos de contenção devem ser desinfetados com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5% ou com uma solução à base de amônio quaternário inodoro. Semanalmente, o piso das salas deve ser limpo com detergente neutro e água.

3.3 Contenção

Existem equipamentos próprios para a contenção de serpentes: gancho, laço de Lutz, pinção e tubo de contenção. Para cada situação e espécie a ser contida pode-se usar um ou mais equipamentos. O gancho é o equipamento mais versátil, já que com ele podemos erguer uma serpente e transportá-la de um lado para outro. É formado de um cabo que possui a ponta curvada em forma de “L” ou “C”. Com o gancho, também podemos pressionar a cabeça da serpente de modo a imobilizá-la antes de contê-la com as mãos.

O laço de Lutz é composto por um cabo e na sua ponta uma tira de couro (de 2 a 3 cm de largura) que corre por uma guia diminuindo ou aumentando o tamanho do laço. Deve ser usado para contenção passando o laço pela cabeça da serpente e apertando a região do pescoço. Sua utilização deve ser realizada para contenções de curtos períodos. A força de pressão do laço no pescoço deve ser suficiente para imobilizar a cabeça da serpente sem, no entanto, machucá-la. Deve-se ter mais cuidado com espécies que não tenham traqueia pulmonar (por exemplo, *Lachesis* e *Micrurus*), evitando o sufocamento das serpentes. Esta é uma boa opção para contenções rápidas de serpentes peçonhentas e que necessitem observar ou manusear partes do corpo inclusive a cabeça.

O pinção pode ser utilizado para contenção e deslocamento de serpentes, principalmente para aquelas que são mais ágeis e que não se mantêm no gancho.

O tubo de contenção deve ser longo e transparente. A serpente é induzida a entrar no tubo e após adentrar ao menos um terço de seu corpo no tubo, o mesmo deve ser pressionado levemente no substrato, a fim de impedir o movimento do animal. Com auxílio das mãos, o animal fica retido no interior do tubo conferindo segurança total ao tratador. O diâmetro do tubo deve ser tal que não permita que a serpente consiga virar a sua cabeça e retornar. Caso sejam mantidas serpentes de diferentes tamanhos, deve-se ter tubos de diferentes diâmetros. A borda de entrada do tubo deve ser lisa de modo a não ferir a serpente quando da sua entrada. O tubo mantém a porção posterior da serpente livre para os procedimentos necessários (ver LOCK, 2008), observando a ventilação do tubo para que não sufoque a serpente.

3.4 Enriquecimento ambiental

Embora sejam animais com metabolismo baixo, quando comparados aos mamíferos e aves, e, assim, apresentem pouca atividade no seu recinto, o oferecimento de itens de enriquecimento ambiental é importante para promover melhor grau de bem-estar às serpentes. Serpentes arborícolas devem ter condições de se manter acima do substrato através de galhos ou canos. Para serpentes aquáticas, a possibilidade de corpos d'água grandes o suficiente para nadar, também é um item de enriquecimento ambiental. Serpentes mantidas em ambientes com muita presença humana, devem ter locais de abrigo onde elas se sintam protegidas.

Os recintos podem ser constituídos de árvores, plantas e arbustos originários de cada área nativa do *habitat* da serpente. Além disso, deverão ter elementos naturais, árvores, touceiras e gramados. Esses materiais podem ser dispostos para abrigar os animais (e.g. buracos no solo, tocas, iglus, sombras debaixo de folhas de bananeira, troncos, pedras, arbustos ou árvores). Todos esses elementos podem vir a constituir um microhabitat para diversas espécies de serpentes e permitem a seleção de *habitat* mais adequado para seu metabolismo e sobrevivência (GOMES & ALMEIDA-SANTOS, 2012).

3.5 Medicina preventiva

A medicina preventiva dedica-se a prevenir as doenças em vez de tratá-las. Nesse contexto, o distresse (estresse crônico) é um dos fatores mais importantes em serpentes e com o qual temos que ter maior cuidado, pois os animais submetidos ao distresse têm uma queda na resistência imunológica, predispondo-os a várias doenças. Para minimizar o estresse crônico, devemos nos preocupar com o bem-estar dos animais e mantê-los em condições ambientais favoráveis (temperatura, umidade, luminosidade e substrato apropriados), em ambientes tranquilos e com uma alimentação adequada para cada espécie. Tratamentos profiláticos e exames laboratoriais são importantes para manter a higidez dos animais e diagnosticar precocemente algumas doenças, respectivamente. A seguir alguns itens importantes na prevenção de doenças em serpentes, inclusive antropozoonoses (doenças transmitidas ao homem por um reservatório animal).

3.5.1 Inspeção diária

Diariamente, as serpentes devem ser vistoriadas por profissionais devidamente treinados. O médico veterinário responsável deve ser avisado de qualquer mudança de comportamento, presença de feridas, ectoparasitos ou qualquer anormalidade clínica, para que medidas adequadas sejam tomadas. Como, na maioria das vezes, as serpentes não demonstram sintomas clínicos, é importante que dados de peso, frequência de alimentação e de ecdise sejam anotados na ficha individual dos animais para auxiliar no diagnóstico. Existe uma diversidade de doenças que acometem as serpentes em cativeiro e que estão descritas em literatura (MADER, 2006; JACOBSON, 2007; GREGO, RAMEH-DE-ALBUQUERQUE, KOLESNIKOVAS, 2014).

3.5.2. Biossegurança

Toda a equipe técnica envolvida no manejo das serpentes peçonhentas de importância em saúde (família *Viperidae* e *Elapidae*), serpentes peçonhentas sem importância em saúde (família *Colubridae* e *Dipsadidae*) ou serpentes não peçonhentas (*Colubridae*, *Dipsadidae*, *Boidae*, *Pythonidae*) deve ser treinada por profissionais com experiência na área. Equipamentos de proteção individual (EPIs), como: aventais, botas, luvas de procedimento, propés e óculos de segurança devem estar à disposição da equipe e serem utilizados, conforme o trabalho desenvolvido em cada criação. A equipe também deverá ser treinada para utilizar apropriadamente e com segurança os equipamentos para o manejo das serpentes, como ganchos, laços de Lutz, tubos de contenção e pinção, que devem estar sempre em boas condições de uso e limpos.

Não é indicado que um técnico trabalhe sozinho em um biotério de serpentes peçonhentas de importância em saúde. Deverá haver um telefone no biotério e um número de emergência para o qual o técnico deverá ligar em casos de acidente. Cartazes com informações do que fazer em casos de acidentes ofídicos devem estar visíveis no biotério.

Em relação às zoonoses, a *Salmonella sp* é uma bactéria presente na microbiota intestinal da maioria das serpentes, com potencial zoonótico. Os principais sintomas em humanos são diarreia, vômito e cefaleia. Existem outras bactérias (Quadro 1) também presentes na microbiota intestinal ou na microbiota da cavidade oral das serpentes e que também podem causar enfermidades em humanos, principalmente nos imunossuprimidos (SÁ & SOLARI, 2001; JHO *et al.*, 2011). A microbiota fúngica de serpentes inclui *Geotrichum sp* (PARÉ *et al.*, 2007), *Aspergillus sp* (AUSTWICK & KEYMER, 1981), *Mucor sp* (NORBERG *et al.*, 2011), *Trichophyton sp* (PARÉ *et al.*, 2007) e *Trichosporon sp* (CAMPAGNER, 2011), mas as pessoas mais susceptíveis são também as imunossuprimidas. A utilização de luvas de procedimento durante a troca das gaiolas evita a contaminação bacteriana e fúngica. Zoonoses causadas por parasitos de serpentes são mais comuns nos países asiáticos, através da ingestão de serpentes cruas ou mal preparadas.

Quadro 1. Principais agentes zoonóticos bacterianos envolvidos em biotérios de criação e experimentação de serpentes.

AGENTE	NB*	VIA DE TRANSMISSÃO	PROFILAXIA
Salmonella			
Aeromonas hydrophila			
Citrobacter freundii			
Corynebacterium sp			
Enterobacter sp			
Enterococcus sp			
Klebsiella pneumonia	2	orofecal	Uso de EPIs
Morganella morganii			
Proteus mirabilis			
Proteus vulgaris			
Providencia sp			
Pseudomonas sp			
Staphilococcus sp			
Mycobacterium	2	<i>Ingestão ou contato direto com fluidos e exsudatos corporais.</i>	Uso de EPIs

* NB: nível de biossegurança.

3.5.3 Barreiras sanitárias

Existem várias barreiras sanitárias importantes na criação de serpentes:

- 1) utilização de vestimenta adequada no biotério como jaleco e botas/propés;
- 2) uso estratégico de pedilúvio com solução desinfetante;
- 3) elaboração de um fluxograma eficiente, cobrindo primeiro as áreas limpas e, posteriormente, as áreas sujas;
- 4) troca da vestimenta nas diferentes áreas do biotério;
- 5) utilização de luvas de procedimento na troca de gaiolas e manejo das serpentes;
- 6) lavagem e desinfecção criteriosa dos insumos utilizados na criação;
- 7) tratamento profilático das serpentes recém-chegadas;
- 8) quarentena dos animais recém-chegados de, no mínimo, 60 dias.

3.5.4 Controle de doenças, diagnóstico e tratamento

Para o bom desempenho das pesquisas científicas, é recomendável que as serpentes fiquem em adaptação por um período mínimo de 15 dias antes do início de sua utilização. Se o estudo não for a respeito dos endoparasitos, recomendamos a vermifugação dos espécimes, pois endoparasitos podem causar estresse crônico nos animais, com conseqüente imunossupressão, favorecendo que pequenas lesões causadas pelos parasitos nas mucosas sirvam de porta de entrada para bactérias oportunistas. O veterinário responsável deve ser informado imediatamente de qualquer alteração de comportamento, presença de feridas, dissecção ou fraturas, a fim de realizar exames laboratoriais e preconizar o tratamento mais adequado. O animal doente deve ser isolado e, dependendo do estudo, excluído. Na literatura, há uma extensa lista das enfermidades mais comuns, seu diagnóstico e tratamento (FRYE *et al.*, 1996; MADER, 2006; GREGO, RAMEH-DE-ALBUQUERQUE & KOLESNIKOVAS, 2014).

3.5.5 Triagem

Ao chegarem à instalação, as serpentes devem passar por um exame clínico para verificação das suas condições gerais, presença de feridas, fraturas, ectoparasitos, inspeção da cavidade oral, da cloaca, determinação do sexo e medição dos dados biométricos. Nesse momento, os animais recebem uma identificação e uma ficha individual que lhes acompanham por todo o período que estiverem no biotério. É aconselhável que todas as serpentes recém-chegadas passem por um tratamento ectoparasiticida e endoparasiticida antes de serem encaminhadas para a quarentena, pois é comum chegarem da natureza ou de outros criadouros infestadas com ácaros, carrapatos e endoparasitos.

3.5.6 Separação por espécies

O ideal é que se faça a separação das serpentes por famílias, em salas ou baias diferentes. Caso não seja possível, é imprescindível a separação em diferentes prateleiras com equipamentos separados para cada grupo. É comum que serpentes de famílias diferentes tenham respostas imunológicas diferenciadas diante de um mesmo antígeno. Por exemplo, os viperídeos (*Crotalus*, *Bothrops*) são muito susceptíveis ao paramixovírus, já os bóideos (*Boa*, *Epichrates*) são resistentes a esse vírus, podendo ser portadores assintomáticos.

4 PROCEDIMENTOS

4.1 Principais vias de administração de substâncias

A espécie da serpente em tratamento irá determinar a via de administração de substâncias. A via de administração para serpentes peçonhentas de importância em saúde é, geralmente, a injetável por ser mais segura para o técnico.

Via oral:

Para administrar substâncias via oral, as serpentes precisam ser contidas manualmente ou “sedadas” em recipiente saturado de dióxido de carbono.

Substâncias em suspensão são administradas às serpentes através de sondas (o número da sonda depende do tamanho da serpente). A sonda deve ser umedecida em água para facilitar a passagem pelo esôfago e ser inserida suavemente. O volume a ser administrado não deve passar dos 10% do peso do animal. Ex.: se uma serpente pesa 100 g, o volume a ser administrado não deve passar dos 10 ml.

Substâncias em cápsulas ou comprimidos são inseridos no esôfago dos ofídios com o auxílio de uma pinça.

Via subcutânea:

A injeção subcutânea é aplicada entre as escamas, na região lateral do terço cranial da serpente, após desinfecção do local com álcool iodado a 0,2%. A contenção pode ser manual, com laço de Lutz ou tubo de contenção.

Via intracelomática:

A injeção intracelomática deve ser feita na região ventral, cinco dedos acima da cloaca, entre as escamas, em uma angulação baixa ($< 45^\circ$). É uma ótima via para administrar uma grande quantidade de líquido parenteral. A contenção pode ser manual, com laço de Lutz ou tubo de contenção.

Via intravenosa:

São poucos os sítios para administração venosa de medicamentos em serpentes. A veia caudal é de difícil acesso em pequenas serpentes ou naquelas em que a cauda é muito curta, mas é um ótimo sítio em animais de porte médio a grande, como os viperídeos. Como a veia caudal fica localizada ventralmente às vértebras coccigeanas, é indicado que se posicione a serpente deixando o seu ventre exposto. A agulha deve ser escolhida de acordo com o tamanho do animal, sendo inserida na linha média da cauda, entre as escamas, em um ângulo de 45° . Cuidados devem ser tomados para não atingir o hemipênis dos machos.

As injeções cardíacas só devem ser utilizadas para a administração de medicamentos de emergência, pois há um pequeno risco de hemorragia associada a esse sítio (TAMBOURGI *et al.*, 2010).

Via intramuscular:

A injeção intramuscular deve ser realizada nos músculos paravertebrais, inserindo a agulha entre as escamas e apenas pequenos volumes relativos devem ser administrados por essa via. É de fácil acesso em bóieos, por serem serpentes mais musculosas, mas de difícil acesso em viperídeos que possuem, geralmente, pouca musculatura paravertebral.

4.2 Colheita de tecidos, fluidos, secreções e excreções

4.2.1 Colheita de tecidos

A biópsia de tecido cutâneo e de fragmentos de órgãos deve seguir as mesmas recomendações descritas no item 5.4 (“Cirurgia”), por se tratar de um procedimento invasivo.

4.2.2 Colheita de amostras sanguíneas

São poucos os sítios para a venopunção em serpentes. A colheita de sangue pela veia caudal é um ótimo sítio em animais de porte médio a grande, mas deve-se tomar cuidado para não contaminar a amostra com linfa. O procedimento para a colheita de sangue pela via caudal segue o mesmo descrito no item 4.1 (Principais vias de administração de substâncias – via intravenosa).

A colheita de sangue através da punção cardíaca é possível, mas a sedação ou anestesia são necessárias. O coração pode ser facilmente localizado com o auxílio de um doppler vascular ou por meio da visualização dos batimentos cardíacos nas escamas ventrais. O coração deve ser estabilizado entre os dedos e a agulha deve ter calibre adequado para o tamanho da serpente (20 x 0,55 para animais de pequeno porte; 25 x 0,70 para animais de médio porte e 30 x 1,0 para serpentes de grande porte). A agulha é inserida entre as escamas, uma ou duas escamas abaixo de onde o coração é localizado. Deixe a seringa encher sozinha, para evitar excesso de pressão negativa e o colapso do ventrículo cardíaco (DYER e CERVASIO, 2008).

O plexo venoso vertebral, com auxílio de um scalp 22, também pode ser utilizado para colheita de amostras sanguíneas, principalmente em serpentes de grande porte, como os boídeos. Para acessar esse vaso, a serpente deve ser contida na borda de uma mesa, dobrando-a em um ângulo de aproximadamente 90°, para facilitar a inserção da agulha entre as vértebras.

4.2.3 Extração de peçonha

A extração de peçonha das serpentes opistóglifas (principalmente das famílias *Colubridae* e *Dipsadidae*), ofídios peçonhentos sem importância em saúde, pode ser realizada contendo-se manualmente o animal pela cabeça e fazendo-se uma leve massagem caudo-cranial, com os dedos indicador e polegar, em cima da glândula Duvernoy. Em cada presa (dentição inoculadora), encaixa-se um tubo capilar sem heparina ou microtubos. Imediatamente após a colheita, o veneno deverá ser refrigerado ou congelado, de acordo com a necessidade de cada experimento.

A extração de peçonha das serpentes proteróglifas (família *Elapidae*) e solenóglifas (família *Viperidae*), ofídios peçonhentos de importância em saúde, deverá ser realizada com o auxílio do dióxido de carbono como medida de prevenção de acidentes. Segundo Wang *et al.* (1993), o pH do sangue das serpentes que passam pelo dióxido de carbono para a realização da extração de veneno, volta rapidamente para os níveis normais. A serpente deverá ser colocada em um recipiente saturado de dióxido de carbono até “adormecer”, aproximadamente 5 minutos. Esse tempo pode variar de indivíduo para indivíduo. Após a “sedação” a serpente é contida manualmente, fazendo-se uma massagem caudo-cranial em cima da glândula de veneno. No caso dos viperídeos, a extração de veneno pode ser feita com microtubos ou tubos encaixados nas presas ou, então, em um Becker de vidro imerso em um banho de gelo. No caso dos elapídeos, a extração deverá ser feita com tubos capilares sem heparina, encaixados nas presas inoculadoras.

Em qualquer um dos casos mencionados acima, após a extração, deve-se passar um antisséptico nas bainhas das presas e nas presas para evitar estomatite. Podem ser utilizadas soluções de iodopovidone 10% ou de clorexidina 0,12%.

4.3 Modificação de ingestão de alimento

Caso a serpente não se alimente naturalmente, pode-se optar pela alimentação forçada. Nesse caso, a presa deve ter um tamanho inferior à capacidade máxima de ingestão da serpente e deve estar morta. Caso ela possua estruturas que possam lesionar o trato digestório da serpente, estas devem ser extraídas (por exemplo: dentes incisivos de roedores). Para facilitar o procedimento, a presa deve ser untada com substância lubrificante que facilite o transporte pelo trato digestório (por exemplo: clara de ovo, vitamina).

5 CUIDADOS VETERINÁRIOS

5.1 Cuidados pré e pós-operatórios

Deve-se fazer uma avaliação pré-operatória na serpente que inclui um exame clínico geral, frequência cardíaca, frequência respiratória e avaliação hídrica. Se possível, exames hematológicos e bioquímicos também auxiliam na verificação do estado geral do animal. Um jejum de sete dias antes da cirurgia é recomendado para as serpentes, sem restrição hídrica.

Os pré-anestésicos são utilizados para sedar o animal e facilitar a intubação endotraqueal para anestesia inalatória, assim como diminuir a quantidade de anestesia injetável utilizada. Como droga pré-anestésica, atualmente o propofol está sendo bastante utilizado, pois permite uma rápida indução e recuperação quando comparado a outros agentes. Diferentes combinações com cetamina também são utilizadas como pré-anestésicos: cetamina + midazolam; cetamina + medetomidina. Diferentemente dos mamíferos, não é necessário administrar atropina como droga pré-anestésica em serpentes para evitar a sialorreia, pois as mesmas não produzem saliva em excesso.

Após a cirurgia, devemos manter a serpente em local tranquilo com temperatura em torno de 25°C a 27°C até a sua recuperação. A ferida cirúrgica deve ser tratada a cada 48h e, dependendo do protocolo de ensino ou pesquisa, antibiótico e analgésico devem ser prescritos para evitar infecções e garantir o bem-estar do animal. Na Tabela 1 as doses das principais drogas pré-operatórias estão apresentadas.

Os antibióticos devem ser escolhidos de acordo com cada situação. Na literatura existem vários trabalhos que auxiliam na escolha adequada desses medicamentos (JACOBSON, 1996; STEIN, 1997; KOLESNIKOVAS *et al.*, 2007; FUNK & DIETHELM, 2007).

Tabela 1. Principais drogas pré-operatórias utilizadas em serpentes

PRINCÍPIO ATIVO	DOSAGEM	OBSERVAÇÕES	FONTE
Acetilpromazina	0,1 – 0,5 mg/kg IM	Sedativo, adm. 1 hora antes da anestesia geral	Bennett, 1991
Diazepam	0,22 – 0,62 mg/kg IM	Sedativo	Bennett, 1991
Midazolam	2,0 mg/kg IM	Pré-anestésico	Bennett, 1991
Propofol	5-10 mg/kg IV	Anestésico de curta duração	Tambourgi, <i>et al.</i> , 2010
Cetamina/midazolam	40 mg/kg de cetamina + 2 mg/kg de midazolam IM	Anestésico geral	Bouts & Gasthuys, 2002
Tiletamina/zolazepam	2-5 mg/kg IM	Anestésico geral, para pequenos procedimentos	Schumacker e Yelen, 2006

Vias de administração: IM intramuscular; IV – intravenosa

5.2 Analgesia

Apesar de dificilmente manifestarem dor, alguns sinais, como: postura alterada, tremores, aumento da frequência respiratória ou cardíaca, podem ser indicativos de dor e desconforto nesses animais. Algumas vezes, o não reconhecimento da dor e a falta de conhecimento das doses apropriadas de analgésicos para esses animais resultam no tratamento inadequado da dor. Os analgésicos devem ser administrados a todas as serpentes submetidas a procedimentos dolorosos: após cirurgias; feridas ou queimaduras extensas, etc. Na Tabela 2, são apresentadas doses de agentes analgésicos utilizados em serpentes.

Tabela 2. Drogas analgésicas utilizadas em serpentes

PRINCÍPIO ATIVO	DOSAGEM	OBSERVAÇÕES	FONTE
Buprenorfina	0,02 mg/kg IM	Leva horas para fazer efeito	Tambourgi, <i>et al.</i> , 2010
Butorfanol	0.4-2.0 mg/kg SC, IM, IV	Administrar a cada 12 - 24h	Schumacker & Yelen, 2006
Meperidina	20 mg/kg IM	Administrar a cada 24h	Heard, 1993
Meloxicam	0.1 - 0.2 mg/kg IM, IV, VO	Analgésico e anti-inflamatório, Adm. a cada 24h.	Schumacker & Yelen, 2006
Cetoprofeno	2 mg/kg SC, IM	Administrar a cada 24h	Schumacker & Yelen, 2006

Vias de administração: IM - intramuscular; IV – intravenosa; SC – subcutânea; VO – via oral

5.3 Anestesia

Em ofídios, a glote é facilmente visualizada e está localizada imediatamente acima da bainha da língua, a traqueia é formada por anéis incompletos e finaliza no pulmão ou no saco aéreo. Algumas serpentes das famílias *Viperidae* (cascavéis, jararacas), *Colubridae* e *Dipsadidae*, possuem o que chamamos de traqueia-

pulmonar, ou seja, ao longo de quase toda a traqueia observamos parênquima pulmonar. No viperídeo *Lachesis sp.*, nas famílias *Boidae* e *Pythonidae* e em algumas serpentes das famílias *Colubridae* e *Dipsadidae*, a traqueia finaliza no(s) pulmão(ões). A maioria das serpentes possui apenas o pulmão direito desenvolvido, mas, outras, apesar de possuir o direito mais desenvolvido, possuem um pulmão esquerdo menor do que o direito (em até 40%) ou até mesmo vestigial. O pulmão termina no saco aéreo, parte avascular do pulmão que não realiza trocas gasosas. Cuidado deve ser tomado ao prover ventilação assistida às serpentes, pois tanto os pulmões como os sacos aéreos são delicados e facilmente danificados com a hiperinsuflação (JACOBSON, 1993).

Tanto os anestésicos inalatórios como os injetáveis podem ser utilizados, embora os inalatórios possuam uma indução e um tempo de recuperação mais rápidos.

Tubos de contenção, de tamanho adequado para a serpente manejada, podem ser utilizados para a indução da serpente, acoplando a mangueira do aparelho anestésico inalatório na ponta onde está a cabeça do animal. Na parte posterior do tubo, veda-se o espaço entre o tubo e a serpente com papel-toalha. Assim que a serpente entrar em plano de indução, retirá-la cuidadosamente do tubo e inserir um tubo endotraqueal ou sonda uretral, de tamanho adequado, na sua glote.

Em se tratando de serpentes peçonhentas de importância em saúde, um mínimo de duas pessoas adequadamente treinadas devem estar presentes durante o manejo. Lembrando que todo procedimento de anestesia deve ser acompanhado por um médico veterinário. Procedimentos operacionais padrões sobre socorro de acidentados ofídicos devem estar visíveis, inclusive com o número do posto de saúde ou do hospital para onde a pessoa acidentada deve ser encaminhada.

Alguns procedimentos menos invasivos podem ser realizados com anestesia local, como biópsia de pele, redução de prolapso de cólon, sutura de feridas e curativo de feridas extensas. O agente mais utilizado é a lidocaína, infiltrada localmente a 2 - 5 mg/kg. Devido aos efeitos colaterais de toxicidade, a dose não deve exceder os 10 mg/kg (SCHUMACHER & YELEN, 2006).

O agente anestésico inalatório de eleição é o isoflurano. A indução é feita com 4% - 5% e a manutenção com 1% - 3%. A vantagem do isoflurano é o de proporcionar uma indução e recuperação rápidas, com mínima depressão cardiovascular (SCHUMACHER & YELEN, 2006).

Em relação aos agentes anestésicos injetáveis, várias combinações podem ser usadas, sendo que as associações com a cetamina são as mais utilizadas. O uso de propofol em injeções intravenosas de 5 - 10 mg/kg também pode ser utilizado, mas com cuidado, pois pode causar depressão cardiorespiratória. Na Tabela 3 são apresentados os agentes anestésicos inalatórios e injetáveis mais utilizados.

Tabela 3. Drogas anestésicas utilizadas em serpentes.

PRINCÍPIO ATIVO	DOSAGEM	OBSERVAÇÕES	FONTE
Isoflurano	3-5% indução, 2-4% manutenção	Anestesia inalatória	Tambourgi, <i>et al.</i> , 2010
Propofol	5-10 mg/kg IV	Anestésico de curta duração	Tambourgi, <i>et al.</i> , 2010
Cetamina/acepromazina (10:1 em volume)	40-60 mg/kg de cetamina	Anestésico geral	Tambourgi, <i>et al.</i> , 2010
Cetamina/midazolam	40 mg/Kg de cetamina + 2 mg/ kg de midazolam IM	Anestésico geral	Bouts e Gasthuys, 2002
Cetamina/xilazina	40 mg/Kg de cetamina + 1 mg/ kg de xilazina IM	Anestésico geral	Bouts e Gasthuys, 2002
Tiletamina/zolazepam	2-5 mg/kg IM	Anestésico geral, para pequenos procedimentos	Schumacker & Yelen, 2006
Lidocaína	2-5 mg/kg	Anestésico local	Schumacker & Yelen, 2006

5.4 Cirurgia

As cirurgias somente deverão ser feitas em ambientes limpos, desinfetados, bem iluminados e com todo o equipamento e instrumental apropriados. Deverá ser realizada por um médico veterinário ou com a supervisão deste (Lei 5.517 de 1968 do CFMV), após cuidadoso estudo da anatomia do animal e o melhor protocolo anestésico para a situação. Durante a cirurgia, é indicado que a serpente fique em uma manta elétrica com temperatura em torno dos 25+1°C. Após a cirurgia, a serpente deve ser mantida a 28+1°C até sua total recuperação, ou seja, dardejar de língua e propriocepção adequada (quando colocada em decúbito dorsal a serpente retorna ao decúbito ventral).

Após a cirurgia, cuidados pós-operatórios devem ser adotados, como oferecer temperatura adequada para a recuperação da serpente (em torno dos 25°C - 27°C), prescrição de analgésico, antibiótico e curativos com periodicidade regular, para o bem-estar do animal. A manutenção da serpente em temperaturas subótimas, após a cirurgia, predispõe o animal à supressão imunológica e subsequente infecção.

5.5 Eutanásia

Segundo a Resolução nº 1000, de 11 de maio de 2012, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, eutanásia é a indução da cessação da vida animal, por meio de método tecnicamente aceitável e cientificamente comprovado, sendo um meio de eliminar a dor ou o sofrimento dos animais. Segundo o art. 10 desta mesma Resolução, a escolha do método dependerá da espécie animal envolvida, da idade e do estado fisiológico dos animais, bem como dos meios disponíveis para contenção dos mesmos, da capacidade técnica do executor, do número de animais e, no caso de experimentação ou ensino, do protocolo de estudo.

De acordo com Resolução Normativa que trata das diretrizes da prática de eutanásia do Concea, procedimentos de eutanásia devem ser supervisionados, mesmo que não de forma presencial, pelo Responsável Técnico pelo

Biotério, que deve ter o título de Médico Veterinário com registro ativo no Conselho Regional de Medicina Veterinária da Unidade Federativa em que o estabelecimento esteja localizado.

Em serpentes, o método mais adequado é a utilização de barbitúricos (30 - 100 mg/kg, intravenoso ou intracelomático), pois é uma droga de efeito rápido e de baixo custo. Como há a necessidade de realizar a contenção física para a aplicação do agente, técnicos experientes são imprescindíveis, principalmente quando se trata da contenção de serpentes peçonhentas de importância em saúde.

Em serpentes submetidas à eutanásia para servirem de alimento a serpentes ofiófagas (serpentes que se alimentam de outras serpentes), os barbitúricos ou outros agentes injetáveis não devem ser utilizados, pois podem causar sedação nos animais que consomem a carcaça. Nesses casos, o mais indicado é o uso de anestésicos inalatórios (para espécies que não fazem apneia, seguido de outro método de eutanásia), após a devida aprovação pelas Ceuas das Instituições de Ensino e Pesquisa. Atualmente, existe uma grande tendência em oferecer ratos e camundongos pré-abatidos às serpentes. A eutanásia, nesses casos, pode ser feita pelo deslocamento cervical, contanto que seja feito por um executor bem qualificado e para roedores com peso menor que 150 g.

5.6 Necropsia

Para compreender a história natural de uma doença, risco de surgimento, morbidade das afecções e as causas de mortalidade, devemos proceder à realização de necropsia e posterior coleta de material biológico para determinação do agente etiológico envolvido (MATUSHIMA, 2007). Para realizar a necropsia, a conservação do cadáver deve ser feita em refrigerador (4°C a 10°C) por um período máximo de 24 horas. O resfriamento não impede a autólise e a putrefação, mas retarda esses processos. Nunca devemos congelar carcaças que serão submetidas à necropsia, pois o congelamento pode romper as membranas celulares, impedindo o diagnóstico histopatológico. O médico veterinário responsável pela necropsia deverá ser bem familiarizado com a anatomia da espécie em questão, bem como com suas particularidades. Na literatura, existem alguns trabalhos sobre a anatomia das principais espécies de serpentes utilizadas em pesquisa ou ensino no Brasil, que são ferramentas de grande auxílio nessa atividade (KOLESNIKOVAS *et al.*, 2007; FUNK, 2005; GOMES & PUORTO, 1993; GOMES *et al.*, 1989). Equipamentos de proteção individual, como avental, luvas e máscaras devem sempre ser utilizados durante a necropsia.

Antes da necropsia propriamente dita, deve-se pesar, medir e examinar externamente a serpente: condições gerais, orifícios naturais, presença de ectoparasitos, feridas e fraturas. Feito isso, coloca-se a serpente em decúbito dorsal e faz-se uma pequena incisão nas escamas ventrais, no meio do corpo, cortando, em seguida, na direção cranial e depois na direção caudal. Após aberta, a pele da serpente pode ser rebatida e presa em uma tábua de necropsia com alfinetes. Todos os órgãos internos devem ser cuidadosamente verificados em relação à anatomia topográfica, aspecto, presença de parasitos, secreções, etc. As amostras de tecido podem ser coletadas nos mais diferentes tipos de soluções e reagentes, dependendo da finalidade do estudo, em frascos apropriados e identificados. Na maioria das vezes, utiliza-se formol 10%. Após a necropsia, uma ficha deve ser preenchida com todas as informações a respeito da serpente e uma detalhada descrição necroscópica.

5.7 Destino das carcaças

As serpentes que vierem ao óbito natural ou que forem submetidas à eutanásia e que puderem ser aproveitadas em atividades de ensino ou pesquisa, em universidades ou coleções, devem ser armazenadas em *freezer* até

o seu uso ou fixadas (FRANCO *et al.*, 2002). Serpentes que vierem a óbito e que forem descartadas devem ser acondicionadas em saco branco leitoso apropriado para resíduos biológicos (grupo A)(no caso das serpentes peçonhentas de importância em saúde, deve-se tomar a precaução de terem a boca fechada com fita crepe, pois as presas ainda podem ter resíduos de veneno com atividade lesiva, tanto para a pessoa que está efetuando o acondicionamento da carcaça, como para os funcionários responsáveis pelo transporte do lixo). Se o saco com a carcaça não for imediatamente encaminhado para a coleta apropriada do lixo, o mesmo deve ser congelado até o momento da coleta. As carcaças devem ser tratadas pelo método de incineração (TAMBOURGI *et al.*, 2010).

6 ÉTICA E BEM-ESTAR ANIMAL NO USO DE SERPENTES EM LABORATÓRIO

Assim como para outros animais, devemos nos preocupar com o bem-estar das serpentes que estão sendo utilizadas na produção, manutenção ou utilização em atividades de ensino ou pesquisa científica. Pessoal treinado e capacitado para o manejo das serpentes é condição imprescindível, principalmente quando se trata de serpentes de importância em saúde. Muitas pessoas, por medo dos animais, acabam não tendo os devidos cuidados na manipulação, podendo causar sérias lesões nas serpentes. A sala de manutenção das serpentes não pode ser utilizada para outros fins, como laboratório ou escritório, e o tempo de permanência na sala deve-se restringir ao mínimo necessário. Algumas serpentes demonstram claramente, por meio da vibração da cauda ou de posturas defensivas, o quanto a presença humana é incômoda e estressante. Locais com muito barulho ou vibração, ao lado de marcenarias ou serralherias, por exemplo, também são desconfortáveis para as serpentes.

Quando machos forem colocados juntos para realização da disputa antes do acasalamento, é necessário que seja em um espaço amplo que permita ao perdedor se refugiar, caso contrário, a disputa pode não se encerrar, levando um ou os dois indivíduos à estafa e até a morte. Deve-se tomar cuidados especiais no manejo de fêmeas prenhes. Devido à mudança do estado fisiológico, elas se mostram mais agressivas e, devido aos filhotes ou ovos, possuem seu centro de gravidade deslocado. Quando da manipulação com gancho, laço de Lutz e outros para evitar o soerguimento da serpente por um único ponto.

A investigação e o registro de questões de bem-estar animal são de responsabilidade de cada indivíduo envolvido. Cada instituição deve desenvolver métodos de relato e investigação de indicadores de bem-estar animal, e todos os funcionários devem estar cientes da importância e dos mecanismos para o registro e os relatos de questões de bem-estar animal. A responsabilidade pela revisão de tais relatórios é do responsável técnico e das Comissões de Ética no Uso de Animais. A resposta a tais relatórios incluem a comunicação dos achados aos funcionários envolvidos, as medidas corretivas se cabíveis. Todos os relatórios e ações corretivas devem ser registrados de forma permanente (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2011).

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, D. V.; ABE, A. S. Water collection by the body in a viperid snake, *Bothrops moojeni*. *Amphibia Reptilia*, v. 21, n. 4, p. 485-492, 2000. ISSN 0173-5373.

AUSTWICK, P. K. C.; KEYMER, I. F. Fungi and actinomycetes. In: COOPER, J. E.; JACKSON, O. F. (eds), *Diseases of the Reptilia*. v. 1, 1981. p. 193-231.

BENNETT, R. A. A review of anesthesia and chemical restraint in reptiles. *J. Zoo Wildl. Med*, v. 22: 282-303, 1991.

BOUTS, T.; GASTHUYS, F. Anesthesia in Reptiles. Part 1: Injection anesthesia. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 71: 183-194, 2002.

CAMPAGNER, M. V. Manejo de serpentes em cativeiro: manejo clínico-sanitário e avaliação da microbiota. Tese de doutorado Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

CARE, C. C. O. A. *Guide to the Care Use of Experimental Animals*. Ottawa: CCAC, 1980-1984. 208.

DANIEL, L. A. *et al.* Processos de desinfecção e desinfetantes alternativos na produção de água potável. Rio de Janeiro: Programa de Pesquisas em Saneamento Básico – PROSAB, 2001.

DYER, S. M.; CERVASIO, E. L. An overview of restraint and blood collection techniques in exotic pet practice. *Vet Clin Exot Anim* 11: 423-443, 2008

FRANCO, F. L.; SALOMÃO, M. G.; AURICCHIO, P. (2002). Répteis. In: AURICCHIO, P.; SALOMÃO, M. D. G. *Técnicas de coleta e preparação de vertebrados para fins científicos e didáticos*. São Paulo: Instituto Pau Brasil de História Natural, p. 75-125, 2002.

FUNK, R. S. Snakes. In: Mader, DR (ed) *Reptile Medicine and Surgery* (2nd edition). Elsevier Saunders, p. 42 - 58, 2006.

FUNK, R. S.; DIETHELM, G. Reptile formulary. In: Mader, DR (ed) *Reptile Medicine and Surgery* (2nd edition). Elsevier Saunders, p. 1119-1140, 2006.

GOMES, C. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Microhabitat use by species of the genera *Bothrops* and *Crotalus* (Viperidae) in semi-extensive captivity. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 18(4) p. 393-398, 2012.

GOMES, N.; PUORTO, G. Atlas anatômico de *Bothrops jararaca* Wied, 1824. *Mem. Inst. Butantan*, 55 (1): 69 - 100, 1993.

GOMES, N.; PUORTO, G.; BUONONATO, M. A.; RIBEIRO, M. de F. M. Atlas anatômico de *Boa constrictor*. *Monografias Instituto Butantan*, 2: 1-59, 1989.

GREGO, K. F.; ALBUQUERQUE, L. C. R. de; KOLESNIKOVAS, C. K. M. Ordem Squamata–Subordem Ophidia (Serpente). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (2. ed.) *Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária*. São Paulo: Roca, v. 1: 186-218, 2014.

HEARD, D. J. Principles and techniques of anesthesia and analgesia for exotic practice. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract*, v. 23, n. 6, p. 1301-1327, 1993.

JACOBSON, E. R. Snakes. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract*. v. 23: 1179-1212, 1993.

JACOBSON, E. R. Metabolic scaling of antibiotics in reptiles: basis and limitations. *Zoo Biology*: 15:329-339, 1996.

JACOBSON, E. R. Infectious diseases and pathology of reptiles: color atlas and text. CRC Press, Boca Raton, FL. 2007. 716p.

JACOBSON, E. R.; GASKIN, J. M.; WELLS, S.; BOWLER, B. S.; SCHUMACHER, J. Epizootic of ophidian paramyxovirus in a zoological collection: pathological, microbiological and serological findings. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, n. 23, p. 318-327, 1992.

JHO, Y. S.; PARK, D. H.; LEE, J. H.; CHA, S. Y.; HAN, J. S. Identification of bacteria from the oral cavity and cloaca of snakes imported from Vietnam. *Laboratory Animal Research*, 27(3): 213-217, 2011

KOLESNIKOVA, C. K. M.; GREGO, K. F.; ALBUQUERQUE, L. C. R. de. Ordem Squamata–Subordem Ophidia (Serpente). In: CUBAS Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (ed) *Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária*. São Paulo: Roca(2007): 68-85.

LELOUP, P. Various aspects of venomous snake breeding on a large scale. *Acta Zool. Pathol. Antverp*, v. 78, p. 177-198, 1984.

LOCK, B. Venomous Snake Restraint and Handling. *Journal of Exotic Pet Medicine*, v. 17, n. 4, p. 273-284, 2008.

MADER, D. R. Reptile medicine and surgery. California: Elsevier Saunders Company. 2006. 1242p.

MATUSHIMA, E. Técnicas Necroscópicas. CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (ed) *Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária*. São Paulo: Roca. 2007. p. 980-990.

MELGAREJO-GIMENEZ, A. R. Criação e manejo de serpentes. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. (eds). *Animais de laboratório*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2006. p. 175-99.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, USA, 2011. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. Disponível em: <<http://www.nap.edu/catalog/12910/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals-eighth>>

NORBERG, A. N.; PILE, E. P.; RIBEIRO, P. C.; BRITO, P. L. X.; CONSORTE, L. B. S.; SANCHES, F. G.; SERRA-FREIRE, N. M. Mucormicose em *Crotalus durissus terrificus* mantidas em cativeiro. *Revista de Ciência e Tecnologia*, 11(2) 2011.

PARÉ, J. A.; JACOBSON, E. R. Mycotic diseases of reptiles. In: JACOBSON, E. R., editor. *Infectious diseases and pathology of reptiles*. CRC Press, Boca Raton, 2007; 527-547.

SÁ, I. V. A.; SOLARI, C. A. Salmonella em répteis de estimação nacionais e importados. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32(4): 293-297, 2001.

SAZIMA, I.; MARTINS, M. Presas grandes e serpentes jovens: quando os olhos são maiores do que a boca. Mem. Inst. Butantan, v. 52, n. 3, p. 73-79, 1990.

SCHUMACHER, J. & YELEN, T. Anesthesia and analgesia. In: MADER, D. R. (ed). Reptile Medicine and Surgery. Elsevier Health Sciences, p. 442-452, 2006.

TAMBOURGI, D. V.; BIZERRA, A. F. *et al.* Manual Prático sobre Usos e Cuidados Éticos de Animais de Laboratório, p. 45-61, Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo, 2010.

VITT, L. J.; CALDWELL, J. P. Herpetology: an Introductory Biology of Amphibians and Reptiles. Academic Press, 2009. 697.

WELDON, P. J.; DIVITA, F. M.; MIDDENDORF III, G. A. Responses to snake odors by laboratory mice. Behavioural Processes, v. 14, n. 2, p. 137-146, 1987.

ANEXO I

REQUISITOS MÍNIMOS PARA PRODUÇÃO, MANUTENÇÃO OU UTILIZAÇÃO DE SERPENTES PARA ATIVIDADES DE ENSINO OU PESQUISA CIENTÍFICA

NECESSIDADES ESSENCIAIS EM CATIVEIRO	
TEMPERATURA	Manter temperaturas ambientais adequadas à espécie mantida em cativeiro para que a mesma possa realizar as suas atividades fisiológicas e comportamentais.
UMIDADE	Oferecer umidade adequada à espécie mantida em cativeiro.
ILUMINAÇÃO	Oferecer um ciclo de luz semelhante ao ambiente natural da serpente ou, pelo menos, um ciclo de 12 h claro/12 h escuro.
ALIMENTAÇÃO	Pesquisas que mantiverem as serpentes por mais de 30 dias, devem alimentá-las com presas específicas da sua dieta, mensalmente, ou a cada 15 dias.
GAIOLA	As gaiolas de plástico são as mais indicadas por serem leves, fáceis de serem lavadas e difíceis de serem quebradas. Deve ser compatível com o tamanho da serpente. A serpente enrolada não pode ocupar mais do que 1/3 da área da gaiola. Para as serpentes arborícolas, a altura deve compreender no mínimo a metade do comprimento da serpente. Serpentes semiaquáticas devem ter um local que possam nadar ou banhar-se, mas ter a opção de um local que possam manter todo o seu corpo em ambiente seco.
SUBSTRATO	Deve ser trocado sempre que estiver sujo ou com excesso de umidade. Evitar substratos pequenos que possam grudar na presa e serem ingeridos pelas serpentes, causando estomatite ou mesmo obstrução do trato gastrointestinal.
ABRIGO	Oferecer abrigos para as serpentes que são mantidas em serpentários abertos (criação semi-intensiva)
ÁGUA	A água oferecida deve ser tratada, estar sempre à disposição do animal e ser trocada a cada 3 dias no mínimo.
SALA DE EXPERIMENTAÇÃO	A sala de experimentação não deve ser a mesma da manutenção.
CONTENÇÃO FÍSICA	A escolha do material de contenção deve ser feita de acordo com a espécie e finalidade. O tubo plástico deve ser utilizado quando se pretende realizar algum procedimento no 1/3 posterior da serpente; o laço deve ser confeccionado com espuma e tira de couro para não causar lesões nas serpentes e ser utilizado tanto para realizar procedimentos no 1/3 anterior como posterior do corpo.
BIOSSEGURANÇA	Todas as pessoas que trabalham com serpentes devem passar por treinamento adequado e utilizar os equipamentos de proteção individual.

ANEXO II

A) Características gerais das Serpentes

Anatomia

As serpentes possuem todo o corpo coberto por escamas, sendo que diferentes grupos apresentam diferentes tipos de escamas. Seu número, formato e disposição são utilizados como caractere taxonômico para diferenciação entre as espécies. Periodicamente, as serpentes realizam a ecdise ou “muda”, que é a troca da camada mais superficial da pele. Essa troca se inicia pelos lábios e se desprende do corpo numa peça única. Alguns dias antes da realização da ecdise, a serpente produz um líquido lubrificante entre a velha e a nova pele, deixando a coloração da serpente com aspecto opaco e leitoso. Os olhos das serpentes nessa fase tornam-se azulados e opacos também. Após a muda, as serpentes voltam a ter uma pele com aspecto brilhoso novamente.

O esqueleto das serpentes é formado basicamente por crânio, vértebras e costelas, sendo que apenas alguns grupos ainda possuem vestígios de cintura pélvica e membros posteriores reduzidos a um esporão (por exemplo, *Aniliidae*, *Boidae*, *Pythonidae*, *Tropidophiidae* e *Typhlopidae*) (BAUCHOT, 2006). As vértebras não possuem grande mobilidade entre si, tendo movimentação dorso-ventral e lateral restritas. No entanto, o grande número de vértebras (algumas espécies com mais de 400) permite uma grande flexibilidade do corpo (SHINE, 1995).

Muitas serpentes possuem adaptações cranianas para ingerir grandes presas: caixa craniana resistente, maxilas suspensas com grande mobilidade, ausência de sínfise mandibular e grande mobilidade do quadrado entre outras adaptações. Quatro tipos básicos de dentições são encontrados nas serpentes (HARTLINE, 1971). Dentição áglifa – não existe diferenciação entre os dentes para inoculação de peçonha (e.g., *Scolecophidae*, *Boidae*, *Pythonidae*, *Colubridae*). Essas serpentes não têm glândulas de veneno, mas algumas possuem saliva tóxica para suas presas. Dentição opistóglifa – existem dentes modificados na porção posterior da boca adaptados à inoculação da peçonha produzida por glândulas de Duvernoy (e.g. alguns *Dipsadidae*). As serpentes brasileiras que possuem esses tipos de dentições na maioria das vezes não são capazes de produzir um envenenamento grave nos seres humanos e são consideradas como serpentes sem importância em saúde (por exemplo *Oxyrhopus*, *Philodryas*, *Thamnodynastes*). Dentição proteróglifa – possuem dentes especializados para inoculação de peçonha na região anterior da boca (e.g. corais-verdadeiras, najas e mambas). Dentição solenóglifa – possuem um sistema de inoculação de peçonha altamente especializado. Além de ter grandes presas, a articulação do maxilar possibilita que durante o bote as presas sejam projetadas para frente (e.g. cascavéis e jararacas). Estes dois últimos tipos de dentições pertencem às serpentes causadoras de acidentes em seres humanos e são chamadas de serpentes peçonhentas de importância em saúde e, em caso de acidente, deve-se tomar soro antiofídico específico para combater a peçonha.

Os órgãos internos também possuem adaptações para se alojar no corpo cilíndrico das serpentes. Eles são alongados e, quando são pares, se apresentam deslocados em relação ao seu par (o direito mais cranial) ou então ausentes, como é o caso do pulmão esquerdo ausente ou reduzido em algumas serpentes (BAUCHOT, 2006). Algumas espécies possuem traqueia-pulmonar, ou seja, ao longo de quase toda a sua extensão, existe parênquima pulmonar (ver item 5.3 “Anestesia”). As serpentes não possuem diafragma, sendo que a respiração ocorre por movimentação da musculatura intercostal.

Órgãos dos sentidos

As serpentes não possuem ouvido externo e o ouvido médio é modificado. A columela tem o formato alongado e é articulada com o osso quadrado, dando-lhes a capacidade de amplificar as vibrações emitidas pelo substrato em contato com a cabeça (BAUCHOT, 2006). Embora a literatura indique que as serpentes são incapazes de perceber ondas sonoras aéreas, estudos recentes têm demonstrado que as serpentes respondem a sons aéreos (YOUNG e AGUIAR, 2002).

Algumas famílias têm os olhos atrofiados (*e.g. Typhlopidae, Leptotyphlopidae*), sendo conhecidas como cobras-cegas, enquanto outras possuem visão desenvolvida e enxergam em três dimensões (por exemplo a serpente arborícola *Aethusa* que tem 45° de visão binocular). A visão junto com outros órgãos dos sentidos desempenha importante papel no comportamento predatório.

Todas as serpentes possuem o sistema vomeronasal bem desenvolvido. A abertura do órgão vômero nasal ou órgão de Jacobson se dá no palato das serpentes. As partículas químicas do ambiente são captadas pela língua bífida ao dardejear e, quando entra na boca, encosta na abertura deste órgão, desencadeando o estímulo nervoso. O sentido vômero nasal é de fundamental importância para as serpentes, elicitando comportamentos predatórios, defensivos, reprodutivos, etc.

Alguns grupos de serpentes possuem órgãos termossensoriais, que podem ser em número par (um em cada lado da face), denominado fosseta loreal ou em maior número localizados nas escamas labiais (fossetas labiais). O primeiro tipo é encontrado nas serpentes crotalíneas (cascavel, jararaca, surucucu) e, o segundo, em serpentes da família dos bóideos (cobra-de-veado e cobra-papagaio) e pitonídeos (pítons). É um órgão extremamente sensível, diferenciando variações de até 0,05°C, sendo muito utilizado na captura de presas endotérmicas pelas serpentes que os possui (VITT e CALDWELL, 2009).

Fisiologia

Serpentes são animais ectotérmicos, sendo dependentes de fontes externas de calor para manutenção da sua temperatura corpórea dentro do intervalo térmico ideal. A temperatura corpórea nem sempre é constante. Dependendo da atividade da serpente, ela tende a procurar diferentes temperaturas (AVERY, 1982). Fêmeas vivíparas gestantes são exemplos de situações em que a serpente tem temperaturas preferenciais maiores (MING-CHUNG e HUTCHISON, 1994).

Alimentação

Todas as serpentes são carnívoras, sendo que a dieta é variável entre as espécies. Algumas espécies se alimentam de diversos itens, anfíbios, insetos, roedores; enquanto outras são especialistas se alimentando ou tendo preferência por um tipo de item (SANT'ANNA e ABE, 2007). Algumas serpentes, por outro lado, possuem variação ontogenética na dieta. Quando jovens se alimentam de presas ectotérmicas e, quando adultas, predam animais endotérmicos (MARTINS *et al.*, 2002). As serpentes não têm condições de partir seu alimento, portanto elas sempre ingerem suas presas inteiras e normalmente iniciam pela cabeça. São animais oportunistas, no sentido de poderem ingerir presas que foram encontradas mortas (necrofagia) (SAZIMA e STRUSSMAN, 1990).

Reprodução

A reprodução das serpentes pode ser basicamente dividida em dois tipos: as que botam ovos, denominadas ovíparas; e aquelas que parem os filhotes já completamente formados, as vivíparas. Nos dois casos, as fêmeas, antes do período reprodutivo, armazenam gordura e, quando entram no período de reprodução, transformam a gordura em vitelo que será depositado nos folículos ovarianos. Após a cópula, as serpentes fêmeas têm a capacidade de armazenar os espermatozoides, controlando o momento da fecundação (HALPERT *et al.*, 1982). Portanto, apesar de termos certeza do momento da cópula, não conseguimos definir o momento da fecundação. Após o nascimento (vivíparas ou ovíparas), os filhotes possuem em seu interior reservas de vitelo que podem durar alguns dias ou semanas.

No período reprodutivo, machos de algumas espécies realizam uma disputa pela fêmea (ALMEIDA-SANTOS e SALOMÃO, 2002). Esses combates tendem a ser ritualizados, normalmente não causam ferimentos nos oponentes, mas, em alguns casos, podem ocorrer mordidas ou picadas (ver item 6 – “Ética e Bem-Estar”).

B) Classificação

De acordo com o Reptile Database (UETZ, 2014), existem 27 diferentes famílias, com cerca de 3.500 espécies de serpentes no mundo. No Brasil encontramos 10 famílias (BÉRNILS e COSTA, 2012): *Anomalepididae* (7 espécies), *Typhlopidae* (6), *Leptotyphlopidae* (16), *Tropidophiidae* (1), *Aniliidae* (1), *Boidae* (12), *Colubridae* (34), *Dipsadidae* (244), *Viperidae* (30) e *Elapidae* (30), sendo que as duas últimas famílias correspondem às serpentes peçonhentas de importância em saúde.

C) Modelos de serpentes frequentemente utilizadas em pesquisa

No Brasil, existem cerca de 380 serpentes que podem ser mantidas em cativeiro para estudos relativos a comportamento, fisiologia, reprodução, patologia entre outros tópicos, mas também muitas serpentes podem ser mantidas em cativeiro para estudo dos venenos e sua utilização na produção de imunobiológicos. Os grupos mais comumente mantidos por períodos mais longos para pesquisa e ensino são as jararacas (*Bothrops*) e as cascavéis (*Crotalus*) entre as peçonhentas e as jiboias (*Boa*) entre as não peçonhentas (Tabela 1). Outras espécies são utilizadas na pesquisa e ensino, mas, normalmente, em menor número ou a manutenção, ocorre por tempo reduzido (até dois anos). Entretanto, as bases de manejo das serpentes em cativeiro aqui descritas servem como parâmetros para o grupo como um todo.

Tabela 1. Principais famílias e gêneros brasileiros de serpentes mantidas em cativeiro para pesquisa, produção e ensino.

FAMÍLIA	CARACTERÍSTICAS	GÊNERO	NOME POPULAR
Boidae	Vivíparas, matam por constricção, dentição áglifa	Boa	jiboia
		Epicrates	salamanta
		Eunectes	sucuri
Colubridae	Dentição áglifa ou opistóglifa, arborícolas ou terrícolas, geralmente ovíparas.	Spilotes	caninana
Dipsadidae	Dentição áglifa ou opistóglifa, arborícolas ou terrícolas, geralmente ovíparas. Grande variedade de formas, cores e <i>habitats</i> no Brasil	Oxyrhopus	falsa-coral
		Philodryas	cobra-verde, parelheira, cobra-cipó
		Sibynomorphus	dormideira
		Thamnodynastes	corre-campo
		Tomodon	cobra-espada
Viperidae	Dentição solenóglifa, presença de fosseta loreal	Bothrops	jararaca, jararacussu, urutu, caiçaca
		Crotalus	cascavel
		Lachesis	surucucu-pico-de-jaca
Elapidae	Dentição proteróglifa	Micrurus	coral-verdadeira

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA-SANTOS; SELMA, M.; SALOMÃO, M. G. Reproduction in neotropical pitvipers, with emphasis on species of the genus *Bothrops*. In: SCHUETT, G. W.; HÖGGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREENE, H. W. **Biology of the Vipers**, Eagle Mountain Publishing. p. 445-462, 2002.

AVERY, R. Field studies of body temperatures and thermoregulation. **Biology of the Reptilia**, v. 12, n. 4, p. 93-166, 1982.

BAUCHOT, R. **Snakes: A Natural History**. Sterling Publishing Company, Inc., 2006.

BÉRNILS, R. S.; COSTA, H. C. **Répteis brasileiros: Lista de espécies**. Versão 2012.1., Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2012. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/>>. Acesso em: 20 out. 2014.

HALPERT, A. P.; GARSTKA, W. R.; CREWS, D. Sperm transport and storage and its relation to the annual sexual cycle of the female red-sided garter snake, *Thamnophis sirtalis parietalis*. **Journal of Morphology**, v. 174, n. 2, p. 149-159, 1982.

HARTLINE, P. H. Physiological basis for detection of sound and vibration in snakes. **Journal of Experimental Biology**, v. 54, n. 2, p. 349-371, 1971.

MARTINS, M.; MARQUES, O. A.; SAZIMA, I. Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in Neotropical pitvipers of the genus *Bothrops*. In: SCHUETT, G. W.; HÖGGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREENE, H. W. **Biology of the Vipers**, Eagle Mountain Publishing, p. 307-328, 2002.

MING-CHUNG, T.; HUTCHISON, V. H. Influence of pregnancy on thermoregulation of water snakes (*Nerodia rhombifera*). **Journal of Thermal Biology**, v. 19, n. 4, p. 255-259, 1994.

SANT'ANNA, S. S.; ABE, A. S. Diet of the rattlesnake *Crotalus durissus* in southeastern Brazil (Serpentes, Viperidae). **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 42, n. 3, p. 169-174, 2007.

SAZIMA, I.; STRUSSMAN, C. Necrofagia em serpentes brasileiras: exemplos e previsões. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 50, p. 463-468, 1990.

SHINE, R. **Australian snakes: a natural history**. Cornell University Press, 1995. 229p.

UETZ, P. **The Reptile Database**. 2014. Disponível em: < <http://www.reptile-database.org> >. Acesso em: 20 out. 2014.

VITT, L. J.; CALDWELL, J. P. **Herpetology: an Introductory Biology of Amphibians and Reptiles**. Academic Press, 2009. 697p.

WANG, T.; FERNANDES, W.; ABE, A. S. Blood homeostasis upon CO₂ anesthesia in the rattlesnake (*Crotalus durissus*). *The Snake*, v. 25, p. 21-26, 1993.

YOUNG, B. A.; AGUIAR, A. Response of western diamondback rattlesnakes *Crotalus atrox* to airborne sounds. **Journal of Experimental Biology**, v. 205, n. 19, p. 3087-3092, 2002.

REQUISITOS MÍNIMOS PARA PRODUÇÃO, MANUTENÇÃO OU UTILIZAÇÃO DE ANFÍBIOS PARA ATIVIDADES DE ENSINO OU PESQUISA CIENTÍFICA

NECESSIDADES ESSENCIAIS EM CATIVEIRO	ANFÍBIOS ARBORÍCOLAS (PERERECAS)	ANFÍBIOS TERRESTRES	ANFÍBIOS SEMIFOSSÓRIOS E FOSSÓRIOS	ANFÍBIOS AQUÁTICOS	DENDROBATÍDEOS
Terrários	Caixas plásticas altas com tampa telada e bem vedada.	Caixas plásticas ou tanques azulejados com tampa telada e bem vedada.	Caixas plásticas com tampa telada e bem vedada, com substrato de terra em profundidade compatível com as dimensões da espécie.	Aquários ou tanques dotados de filtro para água e com tampa bem vedada.	Terrários de vidro com substrato de terra.
Exigências de água/umidade	Água em recipientes que possibilitem o mergulho total do corpo.	Água em recipientes que possibilitem o mergulho total do corpo.	Substrato sempre umedecido, porém não encharcado. Recipientes rasos com água da superfície.	Coluna de água com profundidade adequada para a natação.	Bandeja com profundidade (pequeno lago) contendo água corrente em circulação fechada.
Macroambiente	Temperatura média de 25°C			Temperatura média de 25°C	Temperatura média de 25°C
Alimentação	Grilos, baratas e tenébrios (vivos). Eventualmente camundongos neonatos (vivos) para espécies de grande porte.	Insetos vivos (grilos, baratas e tenébrios) e camundongos neonatos vivos (para sapos e grandes rãs)	Anuros: insetos vivos (grilos, baratas, tenébrios e cupins sem ferrão) e minhocas vivas.	Carne bovina e/ou de frango moída, lascas de peixe, minhocas (para os pipídeos e cecílias). Peixes vivos (somente para os pipídeos).	Moscas de frutas, cupins e formigas sem ferrão, grilos, baratas e tenébrios recém-nascidos (todos vivos).
Enriquecimento ambiental	Galhos, folhas artificiais ou naturais, pedaços de cano de PVC	Canos de PVC, telhas e tijolos furados de barro. Folhíço.	Folhíço, canos de PVC, cascas de coco seco cortadas ao meio, frutos de sapucaia.	Cecílias: cascalho e tocas de pedra, vegetação aquática.	Galhos e vegetação natural.
Contenção química	Banho em MS222 (tricaína metano sulfonato), a 0,1% - 0,2%				
Eutanásia	Dose intraperitoneal de tiopental (tiopentato de sódio) a 50 mg/kg.				



Ministério da
Ciência, Tecnologia
e Inovação

